



**UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO"
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**"Eficiencia de la multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares
(HMA), nativos en *Zea mays* L. en condiciones de invernadero,
mayo–diciembre, 2014"**

TESIS

**Para Optar el Título Profesional de:
LICENCIADO EN
BIOLOGÍA–MICROBIOLOGÍA–PARASITOLOGÍA**

Presentado por:

Br. BUSTAMANTE CUBAS ANSELMO

Br. ZAMBRANO ESPINOZA WILMA NATALI

LAMBAYEQUE–PERÚ

2014

“Eficiencia de la multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), nativos en *Zea mays* L. en condiciones de invernadero, mayo–diciembre, 2014”

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA–MICROBIOLOGÍA–PARASITOLOGÍA**

APROBADO POR:

Dr. Eduardo Julio Tejada Sánchez

PRESIDENTE

M.SC. Consuelo Rojas Idrogo

SECRETARIO

Dra. Gianina Llontop Barandiarán

VOCAL

Dra. Carmen Carreño Farfán

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2014

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	4
2.1 Antecedentes de la investigación	4
2.2 Micorrizas	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Materiales	11
3.1.1 Población y muestra.....	11
3.2 Métodos.....	11
3.2.1 Variables en estudio.....	11
3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis	11
3.2.3 Lugar de muestreo	12
3.2.4 Obtención de muestras de suelo.....	12
3.2.5 Obtención de esporas de HMA	12
3.2.6 Identificación de esporas de HMA.....	25
3.2.7 Multiplicación de esporas de HMA	31
3.2.8 Determinación de la infectividad de los HMA nativos.....	32
3.2.9 Determinación de la efectividad de los hongos HMA nativos...	37
3.2.10 Análisis de datos	37
IV. RESULTADOS	38
4.1 Esporas de HMA obtenidos e identificados	38
4.2 Hongos micorrízicos arbusculares multiplicados en <i>Zea mays</i> L.	45
V. DISCUSIÓN.....	55
VI. CONCLUSIONES.....	62

VII. RECOMENDACIONES	63
VIII.RESUMEN.....	64
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
X. ANEXOS.....	70

Índice de tablas

Tabla 1.	Campo agrícola de ubicación de los puntos de muestreo de suelo cultivado con <i>Zea mays</i> L. durante mayo–agosto, 2014.....	14
Tabla 2.	Posición de los puntos de muestreo de suelo cultivado con <i>Zea mays</i> L. durante mayo–agosto, 2014.....	15
Tabla 3.	Análisis físico–químico de muestras de suelo cultivado con <i>Zea mays</i> L. en Reque, Lambayeque, 2014*	18
Tabla 4.	Frecuencia de géneros de HMA identificados en muestras de suelo cultivado con <i>Zea mays</i> L. en Lambayeque, 2014	40
Tabla 5.	Incremento (%) de esporas de <i>Glomus</i> spp. en suelo cultivado con <i>Zea mays</i> L.	46
Tabla 6.	Incremento (%) de esporas de <i>Acaulospora</i> spp. en suelo cultivado con <i>Zea mays</i> L.	47
Tabla 7.	Incremento (%) de esporas de <i>Archaeospora</i> spp. en suelo cultivado con <i>Zea mays</i> L.	48
Tabla 8.	Incremento (%) de esporas de <i>Gigaspora</i> spp. en suelo cultivado con <i>Zea mays</i> L.	49
Tabla 9.	Incremento (%) de esporas de <i>Entrophospora</i> spp. en suelo cultivado con <i>Zea mays</i> L.	49
Tabla 10.	Porcentaje de micorrización de raíces de <i>Zea mays</i> L. infectado con diferentes géneros de HMA	50
Tabla 11.	Frecuencia de muestras de suelo cultivado con <i>Zea mays</i> L. donde se incrementaron las esporas de HMA..	51
Tabla 12.	Número promedio e incremento de esporas de cinco géneros de HMA en <i>Zea mays</i> L.....	51
Tabla 13.	Índice de efectividad de HMA en el cultivo de <i>Zea mays</i> L...	54

Índice de figuras

Figura 1.	Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque. http://maps.google.com.pe/maps?hl=es&tab=ll	13
Figura 2.	Ubicación de los puntos de muestreo de suelo cultivado con <i>Zea mays</i> L. en el distrito de Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque.	16
Figura 3.	Cultivo de <i>Zea mays</i> L. en pre-floración.....	17
Figura 4.	Extracción de suelo cercano a la rizósfera de <i>Zea mays</i> L.	17
Figura 5.	Muestras de suelo cultivado con <i>Zea mays</i> L.	18
Figura 6.	Muestra de suelo sobre un papel para separar el material no deseado.....	19
Figura 7.	Técnica de cuarteo y amontonamiento de suelo.....	19
Figura 8.	Submuestra de suelo para la obtención de esporas de HMA.....	21
Figura 9.	Vertido de agua potable sobre submuestra de suelo.	21
Figura 10.	Sedimentado de suspensión de muestras de suelo.	22
Figura 11.	Vertido del sobrenadante de suspensión de suelo en tamices superpuestos.....	22
Figura 12.	Vertido de tamizado en vaso de precipitación.....	23
Figura 13.	Embudos Bushner modificados para la recuperación de esporas de HMA.....	23
Figura 14.	Anillo plástico de PVC, para embudos Bushner.....	24
Figura 15.	Papel filtro Watman en el interior de embudos Bushner modificados.....	24
Figura 16.	Vertido del tamizado de suelo en tubo de centrifuga.	26
Figura 17.	Adición de sacarosa al tamizado de suelo.	26
Figura 18.	Sobrenadante de suelo tamizado vertido en tamiz.	27
Figura 19.	Sobrenadante de suelo depositado sobre papel filtro de embudo Bushner modificado.	27

Figura 20.	Papel filtro seco y con esporas de HMA.....	28
Figura 21.	Observación microscópica de esporas de HMA.....	28
Figura 22.	Vertido del tamizado de suelo en tamiz de 45 micrones.	29
Figura 23.	Tamizado de suelo en placa de Petri.	29
Figura 24.	Recuperación de esporas de HMA.	30
Figura 25.	Inoculo de HMA listo para su multiplicación.	30
Figura 26.	Germinación de semillas de <i>Zea mays</i> L.	33
Figura 27.	Homogenización del insecticida con las semillas de <i>Zea mays</i> L.	33
Figura 28.	Inoculación de esporas de HMA en suelo experimental.	34
Figura 29.	Suelo experimental inoculado con esporas de HMA y sembrado con <i>Zea mays</i> L.	34
Figura 30.	Raíces de <i>Zea mays</i> L. pigmentadas y conservadas en lactoglicerina.....	36
Figura 31.	Fragmentos de raíces de <i>Zea mays</i> L. pigmentados listos para la observación microscópica.....	36
Figura 32.	Observación microscópica (40X) de esporas de <i>Glomus</i> (a) <i>Acaulospora</i> (b), <i>Archaeospora</i> (c), <i>Gigaspora</i> (d), <i>Entrophospora</i> (e).....	39
Figura 33.	Espora de <i>Glomus</i> sp. con hifa de sustentación recta.	40
Figura 34.	Espora de <i>Glomus</i> sp. con hifa de sustentación curva.	41
Figura 35.	Espora de <i>Glomus</i> sp. con hifa de sustentación en forma de embudo.....	41
Figura 36.	Espora de <i>Acaulospora</i> sp. formada en la parte lateral y externa del sáculo globoso.	42
Figura 37.	Espora de <i>Entrophospora</i> sp. formada en la parte interna y apical del sáculo globoso.....	42
Figura 38.	Espora madura de <i>Acaulospora</i> sp.	43
Figura 39.	Cicatriz visible en espora madura de <i>Acaulospora</i> sp.....	43
Figura 40.	<i>Archaeospora</i> sp. con sáculo esporífero.....	44

Figura 41.	<i>Gigaspora</i> sp. con hifa de sustentación en forma de bulbo....	44
Figura 42.	Germinación de espора de HMA sobre pelo radicular de <i>Zea mays</i> L.	52
Figura 43.	Espora de HMA germinando y atravesando el pelo radicular de <i>Zea mays</i> L.	52
Figura 44.	Hifas formadoras de arbusculos en tejido radicular de <i>Zea mays</i> L.	53
Figura 45.	Altura de plantas de <i>Zea mays</i> L. con HMA (a) en comparación con el testigo (b).....	53

I. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P), después del nitrógeno (N) es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos. En el suelo, el P es un factor determinante del desarrollo vegetal, a pesar que es abundante, tanto como formas orgánicas e inorgánicas (Rico, 2008). En las zonas áridas se encuentran 557–729 kg Pha⁻¹; no obstante, solo 2,4–3,9% está como formas solubles, disponibles para las plantas. El resto, son formas orgánicas (15–20%) e inorgánicas (77–82%), no solubles e inaccesibles como fuentes de fósforo (Rao & Tarafdar, 2002). El P soluble o absorbido es el anión ortofosfato (PO₄)³⁻, que según el pH de la mayoría de los suelos, se encuentra como ión [(H₂PO₄)⁻; (H₂PO₄)²⁻]; no obstante, puede precipitar a las formas insolubles fosfatos de calcio, a pH alcalino y fosfatos de hierro y aluminio, a pH ácido (Lara *et al.*, 2011).

Para satisfacer los requerimientos de P de los cultivos agrícolas como *Zea mays* L. “maíz” se aplican fertilizantes químicos fosforados; sin embargo, los costos de producción se incrementan día a día porque las reservas mundiales no renovables se encuentran en agotamiento (Cordero *et al.*, 2008), la eficiencia de recuperación o porcentaje del nutriente aplicado que es absorbido por la planta es un promedio 30% (SAGARPA, 2010) y el fertilizante no utilizado se pierde por los procesos de fijación (Cordero *et al.*, 2008). El término “fijación” hace referencia a la transformación de los fosfatos del suelo en formas no asimilables a través de dos mecanismos: El primero incluye la formación de fosfato de calcio y adsorción a la superficie de las partículas del suelo y el segundo, que es

el más importante es la adsorción por óxidos de hierro, hidróxidos, minerales y diversos complejos de aluminio y hierro (Aguado, 2012).

Las formas insolubles de fosfatos inorgánicos y orgánicos pueden ser transformadas a formas solubles, a través de los procesos microbianos de solubilización y mineralización respectivamente, destacando los hongos micorrízicos arbusculares, HMA. Las micorrizas son una asociación simbiótica, mutualista, entre raíces de plantas superiores y ciertos hongos del suelo. Estos hongos dependen de la planta, para el suministro de carbono, energía y un nicho ecológico. A su vez, facilitan a la planta la disponibilidad de nutrientes minerales poco móviles como el P, además de sintetizar sustancias reguladoras del crecimiento, aumentar la fijación de nitrógeno por bacterias simbióticas y asociativas e incrementar la resistencia a las condiciones desfavorables.

Las micorrizas se clasifican en base a su estructura, morfología y modo de infección en ectomicorrizas y endomicorrizas. Las endomicorrizas son poco específicas, de modo que una especie puede infectar gran número de especies vegetales, son menos sensibles a las agresiones externas, sus esporas germinan con facilidad alejadas de las raíces vivas y pueden crecer considerablemente en contacto con alguna raíz, lo que permite localizarlas y sobrevivir aún en fragmentos de raíces. Viven en el interior de la raíz, en los espacios intercelulares y emiten hifas al interior de las células, que se subdividen, formando estructuras en árbol o arbusculos, constituyendo el grupo de hongos micorrízicos, HMA más conocido.

Los HMA constituyen una alternativa como biofertilizantes; sin embargo, son simbioses obligados y por tanto no se pueden cultivar *in vitro*; pero si se puede incrementar masivamente en huéspedes susceptibles como el maíz. Este cultivo es de crecimiento rápido

y desarrolla un sistema radical amplio, característica que debe tener una planta para que sea fácilmente micorrizada. Sus semillas son fáciles de manipular, tiene exigencia moderada de riego, es relativamente resistente a enfermedades y plagas y susceptibles a un amplio rango de HMA (Martínez *et al.*, 2010).

La caracterización de hongos micorrízicos arbusculares y su multiplicación permitirá obtener un inoculo con una diversidad de microorganismos fúngicos endófitos nativos, adaptados al sistema agroecológico, que posteriormente puede ser evaluado en los distintos cultivos agrícolas bajo las condiciones edáficas y climáticas de la región, incrementando la productividad y sobrevivencia de manera sostenible.

Por lo expuesto se planteó el siguiente problema ¿Cuál es la eficiencia de la multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares HMA, nativos en *Zea mays* L. en condiciones de invernadero? Para resolver este problema el objetivo general fue: Determinar la eficiencia de la multiplicación de HMA nativos en maíz en invernadero. Los objetivos específicos fueron obtener e identificar esporas de HMA en suelo cultivado con maíz, multiplicar las esporas de HMA y determinar la infectividad y efectividad en maíz. La hipótesis fue: La eficiencia de la multiplicación de HMA en maíz es mayor de 60% en la infectividad y 50% en la efectividad.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Antecedentes de la investigación

Se efectuó un ensayo para multiplicar esporas de HMA en *Brachiaria decumbens*. En un terreno cubierto de *Pennisetum clandestinum* dedicado al pastoreo bovino, se tomaron muestras de suelo rizosférico en los primeros 10–15cm de profundidad y se depositaron en maceteros con plantas de *B. decumbens*. Después de 2 meses, se realizó la extracción de las esporas presentes en el suelo y se obtuvo el “pool” de micorrizas arbusculares. Se realizaron montajes permanentes con polivinil lactoglicerol y se identificaron diez morfotipos de HMA, dos pertenecientes al género *Acaulospora* y ocho a *Glomus*, evidenciándose el predominio de este último género en el suelo investigado (Sosa *et al.*, 2006).

Con el objetivo de identificar plantas y sustratos para la multiplicación de HMA, se colectaron muestras de suelo y raíces de plantas de *Musa* sp. y mediante el método de decantado, tamizado y centrifugación se determinó un nivel basal de dos esporas por gramo de suelo. Los sustratos sólidos fueron preparados con este suelo y tres tipos de materiales inertes: Arena, cascarilla de arroz y vermiculita en proporciones 70, 30 y 50 (p/p). Las plantas trampa fueron *Brachiaria decumbens* (B), *Pueraria phaseoloides* (K), *Sorghum vulgare* (S) y *Tagetes erecta* (T). Después de 5 meses, se determinó que la asociación general expresada en porcentaje de los HMA sobre las plantas hospederas fue de $37,76 \pm 21,86\%$. *B. decumbens* y *S.vulgare*, presentaron los mayores porcentajes de colonización, con $46,61 \pm 19,41$ y

44,84 ± 18,67 %, respectivamente. El sustrato que más favoreció la asociación fue suelo 50: arena 50 y suelo 50: vermiculita 50, con porcentajes de 49,97 ± 16,37 y 43,52 ± 23,64% respectivamente. El sustrato suelo–arena resultó más ventajoso para la multiplicación de los HMA (Úsuga *et al.*, 2008).

Se realizó una investigación con el objetivo de caracterizar morfológicamente los hongos formadores de micorrizas arbusculares aisladas de la rizósfera de plantas de *Trifolium repens* L. “trébol” desarrolladas en condiciones naturales. Las muestras de suelo se tomaron en los primeros 20cm de profundidad y las esporas de los HMA obtenidos mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación, se multiplicaron en plantas de trébol durante 6 meses. Los géneros predominantes fueron *Glomus*, *Entrophospora* y *Acaulospora*, caracterizados por capas continuas en una sola pared, dos capas y tres capas, respectivamente. También se identificó *Sclerocystis* formador de clamidosporas en el extremo de las hifas (Franco, 2008).

Con el objetivo de multiplicar HMA nativos del cultivo de *Theobroma cacao* “cacao” se colectaron muestras de suelo y raíces de árboles de 1–30 años. Para la obtención e identificación de esporas se utilizó el método de tamizaje, flotación-filtración y para el pre–inóculo el tamizado fue deshidratado, macerado y fraccionado en porciones de 10g. El sustrato estuvo constituido por una mezcla esterilizada de suelo (2) y cascarilla (1) y se sembraron cuatro semillas de maíz por maceta, aplicando 10g de pre–inóculo a 5cm de profundidad. Se identificaron los géneros *Glomus*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Archaeospora* y *Scutellospora*, predominando *Glomus*. El mayor porcentaje de infección para arbusculos fue de 2,3% y para vesículas 15,5%. En las plantas inoculadas la biomasa se incrementó, alcanzando 1,8 g en la parte aérea

y 0,296 en la radical, en comparación con 0,7g y 0,1g en el testigo, respectivamente. Se concluyó que las plantas de maíz son adecuadas para la multiplicación de HMA (Dávila *et al.*, 2009).

La aplicación de los HMA está limitada por aspectos relacionados con la biotrofia de estos hongos, la cual impone retos en la producción de inoculantes de calidad. En este contexto, se investigaron tres métodos de producción de inóculo. Con la técnica de la “película nutritiva” las raíces de las plantas, se mantuvieron suspendidas en una capa poco profunda de solución nutritiva que fluía constantemente. Con la “aeroponía” la solución nutritiva fue intermitentemente pulverizada sobre las raíces con ayuda de un atomizador. En ambas técnicas se necesitó una fase de preinfección de las plantas, antes de entrar al sistema y se realizó en recipientes con arena o suelo esterilizado, procurando que la inoculación fuera al momento de la aparición de las primeras raíces. La tercera técnica fue “cultivo *in vitro*” con uso de raíces transformadas por *Agrobacterium tumefaciens*, lográndose reproducir el hongo, aunque con un costo elevado. La técnica de la “película nutritiva” es excelente para la producción de inoculante, por la cantidad y rapidez de propágulos (Manjarrez *et al.*, 2010).

Los hongos micorrízicos arbusculares posibilitan a las plantas una mayor resistencia al estrés salino. Se realizó una investigación para aislar, identificar y multiplicar HMA nativos provenientes de suelos salinos, con el fin de contar con un cepario que pueda ser utilizado en los cultivos agrícolas. Se tomaron muestras en suelo (CE = 5,55 dS cm⁻¹), cultivado con *Lycopersicon esculentum* L. “tomate” y las esporas de micorrizas se extrajeron empleando el método de decantado húmedo y tamizado modificado, a través de dos tamices de 400 y 40 μ m y centrifugado con solución de sacarosa 2M–Tween 80, decantándose luego la fracción líquida con los compuestos fúngicos. Las esporas obtenidas se

propagaron en plantas de sorgo y se identificaron los géneros *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*, predominando *Glomus*. El 35% de los morfotipos presentaron características no descritos en la literatura por lo que se consideraron como posibles especies nuevas, cuya identificación debe realizarse por técnicas moleculares (Medina *et al.*, 2011).

Los hongos micorrízicos arbusculares estimulan la producción de hormonas del crecimiento, incrementan la resistencia a patógenos y condiciones desfavorables y facilitan el aprovechamiento de nutrientes proporcionados por la fertilización. Se realizó un muestreo en diferentes lotes de plantaciones de *Musa paradisiaca* “banano” para aislar, identificar y cuantificar las esporas de HMA. Se seleccionaron los suelos con la mayor población micorrízica y las esporas se propagaron en un sustrato constituido por una mezcla de 50% de inóculo, 20% de turba y 30 % de suelo franco-arenoso previamente esterilizado. Como plantas huésped se cultivaron *Brachiaria toledo* y *B. decumbens*. El número de esporas por gramo de suelo se incrementó de 2,8 a 36,6 esporas g⁻¹ de suelo, con un porcentaje de colonización de 77% a los 200 días, demostrando que se logró la estandarización de una técnica eficaz, sencilla y de bajo costo para la multiplicación de micorrizas del banano (Tufiño *et al.*, 2011).

Se realizó una investigación para aislar e identificar hongos formadores de micorrizas arbusculares asociadas a sistemas agroforestales con *Theobroma cacao* L. “cacao”. Las muestras de suelo y raíces de colectaron en la época seca. Para el aislamiento y conteo de esporas se utilizó el método de tamizado (425, 90 y 25 μ m) y decantación en húmedo con centrifugación modificado. El porcentaje de colonización micorrízica se determinó mediante el método de despigmentación y tinción de raíces. La concentración de esporas osciló entre 71 y 2028 esporas 100g⁻¹ de suelo húmedo. La mayor cantidad de esporas se

obtuvo en el tamiz de 25 μm . Se identificaron *Glomus*, *Scutellospora*, *Acaulospora* y *Gigaspora* spp., correspondiendo el mayor número de especies (1199 esporas 100 g^{-1} de suelo húmedo) a *Glomus* y el menor (7 esporas 100g^{-1} de suelo) a *Gigaspora*. El porcentaje de diversidad de colonización osciló entre 0,9 y 3,5%. La prevalencia de *Glomus* en todos los suelos muestreados demostró su potencial para constituir un fertilizante para el cultivo de cacao (Prieto *et al.*, 2012).

2.2 Micorrizas

Las micorrizas se definen en términos estructurales como asociaciones simbióticas entre raíces de plantas superiores y ciertos grupos de hongos del suelo. Esta asociación fue descrita por primera vez por el patólogo forestal alemán Albert Bernard Frank en 1885, como “mykorrhiza”, que literalmente significa “hongo-raíz” (Monroy, 2004).

Las micorrizas contribuyen a la nutrición de la planta, particularmente en la absorción de fósforo, tanto en ecosistemas agrícolas como naturales. Esta relación simbiótica también mejora la captación de agua y otros nutrientes, además de la transferencia de nitrógeno a partir de distintas fuentes. La simbiosis micorrízica no solo influye en el ciclado de nutrientes en el sistema suelo-planta, sino que también mejora la sanidad vegetal, a través de una protección incrementada contra las condiciones desfavorables, sean bióticas (patógenos) o abióticas (sequía, salinidad, metales pesados, contaminantes orgánicos) y mejoran la estructura del suelo a través de la formación de microagregados, necesarios para un estado natural e hídrico del suelo (Barea *et al.*, 2005).

Los hongos micorrizógenos pueden representar la fracción mayor de la biomasa del suelo, alcanzando hasta 20% del total de masa seca de la micorriza. Su función clave radica en que, su abundante micelio intra y extracelular, constituye un enlace o puente entre las plantas y el suelo.

Los iones poco móviles de la solución de suelo como NO_3 , son más fácilmente accesibles para las raíces absorbentes, que los poco móviles P, Zn, Cu y Mo y en menor grado K y S. La micorriza tiene ventaja sobre la raíz no micorrizada porque el micelio se extiende a mayor distancia que los pelos radicales se estima que 1 cm de raíz micorrizada, contiene entre 80 y 3000 cm de micelio extraradical. Éste puede extenderse más allá de los 9 cm desde la raíz, en contraste con los 2–5 mm de rizósfera (Blanco y Salas, 1997; Medina *et al.*, 2011).

Las micorrizas se clasifican con base en su estructura, morfología y modo de infección en ectomicorrizas y endomicorrizas. Estas últimas se dividen en ectendomicorrizas, arbutoides, monotropoides, ericoides, orquidáceas y arbusculares. Las micorrizas arbusculares (HMA), conocidas también como micorrizas vesículo arbusculares son los más comunes. El nombre vesículo arbuscular se deriva de las estructuras características: arbuscúlos, que son bifurcaciones repetidas de hifas intracelulares y las vesículas que a menudo son ovoides, contienen lípidos y se forman inter o intracelularmente. La colonización de la raíz con HMA no cambia drásticamente la morfología externa, pero si la interna de la raíz, que puede ser observada con el microscopio, una vez que se han teñido las estructuras del hongo con colorantes especiales (Salas, 2004).

Los hongos formadores de micorriza arbuscular, HMA pertenecen al Phylum Glomeromycota, clase Glomeromycetes con cuatro órdenes: Glomerales (Familia Glomeraceae: *Glomus*), Paraglomerales (Familia Paraglomeraceae: *Paraglomus*), Archaesporales (Familia Archaesporaceae, Género *Archaeospora*) y Diversisperales (Familia Acaulosporaceae, Género *Archaeospora*) y Diversisperales (Familia Acaulosporaceae: *Entrophospora* y *Acaulospora*), Gigasporaceae: *Gigaspora* y *Scutellospora*, Diversisporaceae: *Diversispora* y

Pacisporaceae: *Pacispora* (Walter, 2004, mencionado por Dávila *et al.*, 2009).

Los hongos que forman micorriza arbuscular, HMA, establecen asociación simbiótica mutualista con la mayoría de las plantas vasculares. En el proceso de multiplicación, el carácter de simbionte obligado por parte del hongo, implica el uso de plantas hospedadoras con las que pueda completar su ciclo de vida y finalmente producir esporas u otros propágulos. La planta hospedadora debe sembrarse en un sustrato adecuado, buscando obtener alta versatilidad, buena capacidad de intercambio catiónico aireación y retención de humedad. El sustrato además, debe permitir producción abundante de propágulos, debe ser de fácil manipulación, fácilmente disponible en la zona y no costoso (Úsuga *et al.*, 2008).

Existen varios métodos para producir inóculo de HMA. El cultivo en macetas es el más común y confiable, en el cual se deposita una pequeña cantidad de fragmentos de raíces o esporas tamizadas del suelo, en una maceta con un sustrato esterilizado y se siembra una planta hospedadora. Después de 3 a 6 meses, el hongo habrá colonizado las raíces y producido nuevas esporas. La maceta contendrá, además del sustrato, raíces infectadas, fragmentos de hifas y esporas. También se utilizan turba, vermiculita y agregados de arcilla expandida. Otros métodos incluyen sistemas hidropónicos y sistemas modificados llamados “nutrient film technique”, en los que las raíces de plantas inoculadas son bañadas por una delgada película de nutrientes en solución, permitiendo una buena aireación. También se ha modificado el método de cultivo aeropónico, donde se aplica una niebla fina de una solución nutritiva en las raíces colonizadas, obteniéndose una gran cantidad de esporas de hongos y fragmentos de raíces, que permanecen infectivos por más de 23 meses (Salas y Blanco, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Suelo cultivado con *Zea mays* L. y hongos micorrízicos arbusculares, HMA.

3.1.1 Población y muestra

La población estuvo constituida por los hongos formadores de micorriza, HMA, de los suelos cultivados con maíz, en el distrito de Reque. La investigación se realizó con los HMA obtenidos de 54 unidades de muestreo, colectadas durante mayo–agosto de 2014. El número de muestras fue calculado según la fórmula mencionada por Alvitres (2000), con una prevalencia de 90%, determinada por los investigadores en un muestreo piloto.

3.2 Métodos

3.2.1 Variables en estudio

La variable cuantitativa fue la infectividad y efectividad de los HMA.

3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación fue descriptivo y transeccional (Hernández *et al.*, 2003) y para contrastar la hipótesis (Alvitres, 2000) se utilizó el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt para obtener e identificar las esporas y el diseño en sucesión y línea, para determinar la infectividad y efectividad de los HMA.

3.2.3 Lugar de muestreo

En 18 campos comerciales de maíz, en el distrito de Reque, región Lambayeque (Figura 1), se colectaron 54 muestras de suelo cercano a la rizósfera, determinándose la posición de los puntos de muestreo (Tablas 1, 2, figura 2) con un GPS GARMIN e Trex Vista HCx. El distrito de Reque tiene una superficie de 47,03 Km² y se ubica entre los paralelos 06° 52' 00" latitud sur y 79° 49' 27" longitud oeste (Municipalidad de Reque, 2013).

3.2.4 Obtención de muestras de suelo

En cultivos de maíz, en fase de pre-floración (Figura 3), no regados, se colectaron aproximadamente 2kg de suelo cercano a la rizósfera (Figura 4), se depositaron en bolsas de polietileno (Figura 5), debidamente identificadas e inmediatamente después, se transportaron en una caja térmica (10±1°C) para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. En simultáneo al muestreo de suelo, se colectó una muestra representativa de 1kg, para realizar el análisis físico-químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Estación Experimental Vista Florida de Chiclayo. Según los resultados (Tabla 3), el suelo es ligeramente alcalino (pH 7,6) y ligeramente salino (CE= 2,24 dSm⁻¹), con textura franco arenoso-arcilloso, niveles bajos de materia orgánica (2,3%), nitrógeno (0,103%), fósforo disponible (5,9 ppm), y contenido medio de potasio (300,0 ppm).

3.2.5 Obtención de esporas de HMA

Las muestras de suelo fueron depositadas sobre un papel Kraft, para separar las piedras y restos de tejido vegetal (Figura 6). A continuación, se realizó el submuestreo, siguiendo el método de cuarteo y amontonamiento (Figura 7) descrito por Carreño (2014).

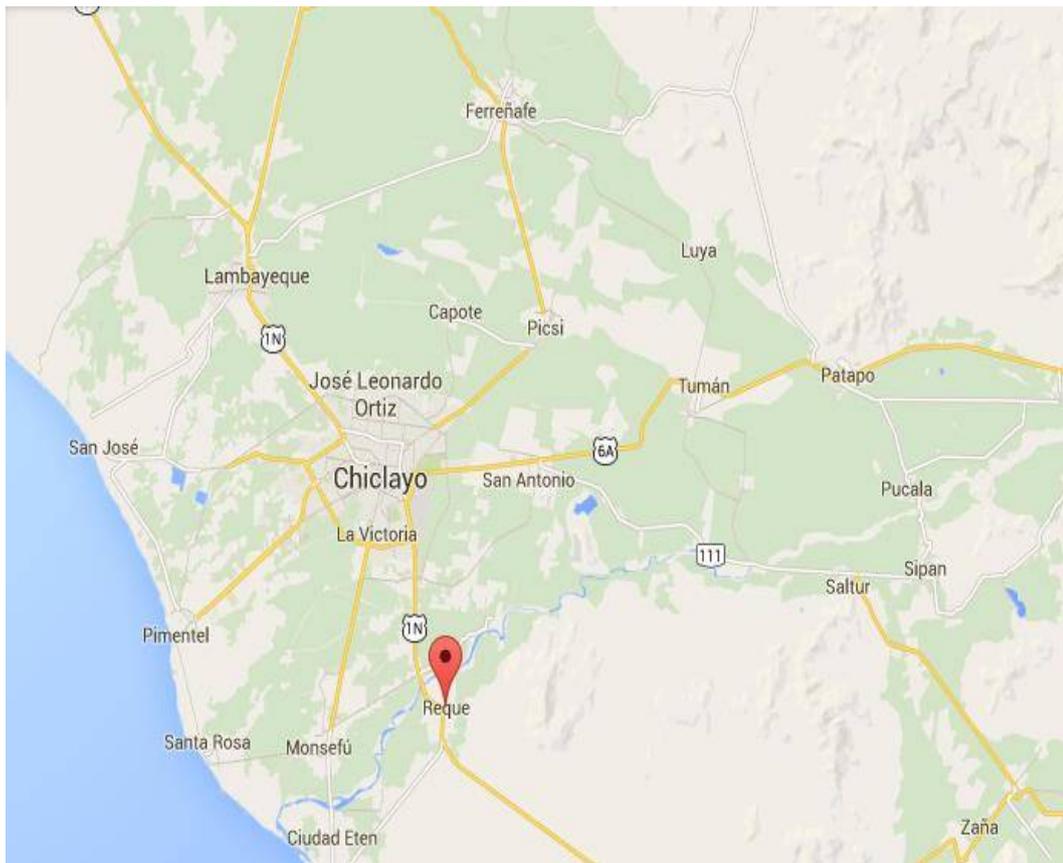


Figura 1. Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque. <http://maps.google.com.pe/maps?hl=es&tab=ll>.

Tabla 1. Campo agrícola de ubicación de los puntos de muestreo de suelo cultivado con *Zea mays* L. durante mayo–agosto, 2014

Campo agrícola	Puntos de muestreo
1	4,5,6
2	16,17,18
3	10,11,12
4	7,8,9
5	21,22,23
6	13,14,15
7	1,2,3
8	54,55,56
9	33,34,35
10	39,40,41
11	24,25,26
12	30,31,32
13	48,49,50
14	27,28,29
15	36,37,38
16	42,43,44
17	51,52,53
18	45,46,47

Tabla 2. Posición de los puntos de muestreo de suelo cultivado con *Zea mays* L. durante mayo–agosto, 2014

Punto	Posición	Punto	Posición
1	17 M 633473 9255420	28	17 M 633313 9255418
2	17 M 633466 9255411	29	17 M 633306 9255414
3	17 M 633458 9255406	30	17 M 633307 9255430
4	17 M 633374 9255408	31	17 M 633369 9255362
5	17 M 633376 9255398	32	17 M 633366 9255372
6	17 M 633379 9255384	33	17 M 633356 9255376
7	17 M 633440 9255415	34	17 M 633354 9255414
8	17 M 633434 9255408	35	17 M 633360 9255427
9	17 M 633425 9255407	36	17 M 633357 9255439
10	17 M 633457 9255412	37	17 M 633271 9255446
11	17 M 633454 9255424	38	17 M 633268 9255432
12	17 M 633444 9255424	39	17 M 633244 9255399
13	17 M 633389 9255368	40	17 M 633353 9255386
14	17 M 633380 9255363	41	17 M 633351 9255396
15	17 M 633369 9255362	42	17 M 633359 9255401
16	17 M 633414 9255416	43	17 M 633331 9255444
17	17 M 633407 9255418	44	17 M 633330 9255428
18	17 M 633397 9255408	45	17 M 633320 9255422
19	17 M 620649 9255720	46	17 M 633304 9255444
20	17 M 633481 9255412	47	17 M 633294 9255450
21	17 M 633480 9255419	48	17 M 633297 9255460
22	17 M 633288 9255402	49	17 M 633254 9255395
23	17 M 633296 9255413	50	17 M 633281 9255382
24	17 M 633287 9255380	51	17 M 633288 9255389
25	17 M 633354 9255455	52	17 M 633280 9255490
26	17 M 633344 9255464	53	17 M 633271 9255413
27	17 M 633337 9255454	54	17 M 633265 9255459

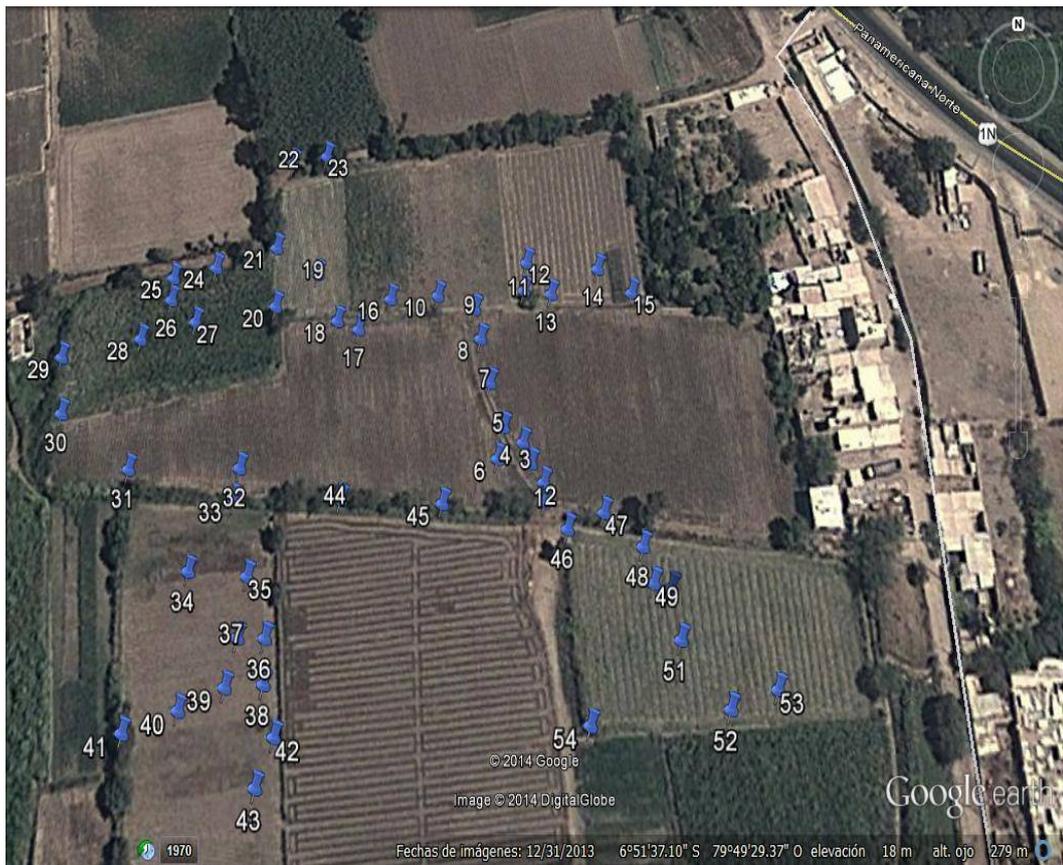


Figura 2. Ubicación de los puntos de muestreo de suelo cultivado con *Zea mays* L. en el distrito de Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque.



Figura 3. Cultivo de *Zea mays* L. en pre-floración.



Figura 4. Extracción de suelo cercano a la rizósfera de *Zea mays* L.



Figura 5. Muestras de suelo cultivado con *Zea mays* L.

Tabla 3. Análisis físico-químico de muestras de suelo cultivado con *Zea mays* L. en Reque, Lambayeque, 2014*

Clase textural	pH	CE (dSm ⁻¹)	MO (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)
Fr.Ar.Ao	7,69	2,24	1,9	0,103	5,9	200,0

*Laboratorio de Suelos, Estación experimental Vista Florida

Instituto Nacional de Innovación y Extensión agraria, Lambayeque



Figura 6. Muestra de suelo sobre un papel para separar el material no deseado.



Figura 7. Técnica de cuarteo y amontonamiento de suelo.

El volumen de suelo del extremo inferior derecho se mezcló cinco veces con el superior izquierdo, el inferior izquierdo con el superior derecho, el superior con el inferior y el derecho con el izquierdo, formando un montón con el suelo, en cada cambio de posición. Una vez homogenizada la muestra, se tomaron trece submuestras de 100 g cada una, totalizando 1,3 Kg.

Para la obtención de esporas de HMA, según el método de tamizaje-flotación-filtración descrito por Dávila *et al.* (2009) y modificado por los autores, en un balde de 4L, se depositaron 100g de suelo (Figura 8), se agregó 1L de agua potable (Figura 9), se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se dejó sedimentar por 5 minutos (Figura 10). El sobrenadante se decantó sobre tamices de 120 y 45 micrones superpuestos entre si y se lavó con un chorro suave de agua potable, descartando las partículas del tamiz de 120 micrones y concentrando las del tamiz de 45 micrones (Figura 11). Estas fracciones se vertieron en un vaso de precipitación de 500 mL de capacidad (Figura 12), repitiendo el proceso con tres submuestras (0,300kg), requeridas para la obtención e identificación de las esporas y diez submuestras (1kg) para la obtención del inóculo, que posteriormente fue multiplicado en maíz.

En la obtención de esporas de HMA para su identificación, se acondicionaron diez recipientes para que funcionen como embudos Bushner modificados (Figura 13, anexo 4). Cada recipiente se higienizó con hipoclorito de sodio comercial (5%p/v), durante 30 minutos y en el extremo superior se colocó un anillo plástico de cloruro de polivinilo, PVC, de 4cm de ancho y 8 cm de diámetro. El extremo inferior del anillo fue cubierto con tela (tuld) y sobre ella se depositó un papel filtro Watman N°1, de 9 cm de diámetro (Figuras 14, 15).



Figura 8. Submuestra de suelo para la obtención de esporas de HMA.



Figura 9. Vertido de agua potable sobre submuestra de suelo.



Figura 10. Sedimentado de suspensión de muestras de suelo.



Figura 11. Vertido del sobrenadante de suspensión de suelo en tamices superpuestos.



Figura 12. Vertido de tamizado en vaso de precipitación.



Figura 13. Embudos Bushner modificados para la recuperación de esporas de HMA.



Figura 14. Anillo plástico de PVC, para embudos Bushner.



Figura 15. Papel filtro Watman en el interior de embudos Bushner modificados.

El tamizado proveniente del procesado de 0,300 kg de suelo se vertió en tres tubos de centrifuga (1/2 del contenido), se agregó una solución de sacarosa al 50% (1/4 del tubo), el contenido se mezcló y se centrifugó a 3000 rpm, durante 3 minutos (Figuras 16, 17). El sobrenadante se vertió en el tamiz de 45 micrones (Figura 18), rápidamente se enjuagó con agua potable, para eliminar el exceso de sacarosa y se vertió cuidadosamente sobre el papel filtro de cada embudo Bushner modificado (Figura 19). Después de 24–48 horas, el papel filtro completamente seco y conteniendo las esporas de HMA fue retirado y cortado en cuatro partes (Figura 20), para su observación e identificación bajo el microscopio compuesto (Figura 21), con objetivos de 10 y 40X.

En la obtención de esporas de HMA para su multiplicación, el tamizado de 1kg de suelo se vertió en el tamiz de 45 micrones para eliminar el exceso de agua (Figura 22) y el material retenido fue llevado a placas de Petri de 14 cm de diámetro (Figura 23), permaneciendo a temperatura ambiente durante 24-48 horas, para eliminar el exceso de humedad. Después, el suelo y esporas obtenidas se colectaron con un pincel (Figura 24) y se depositaron en sobres de papel de 5 x 12 cm, obteniendo en promedio 10 g (Figura 25), que constituyeron el inóculo de HMA para su multiplicación.

3.2.6 Identificación de esporas de HMA

Las esporas de HMA fueron observadas bajo el microscopio con aumentos de 10 y 40X, describiendo su forma, color, forma de hifa de sustentación, así como también su ubicación y características generales. Para la identificación se utilizó el catálogo de micorrizas arbusculares de la Amazonía Colombiana de Peña *et al.* (2006) e “International Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi–INVAM”, (2009). Una vez identificados los géneros de HMA, se cuantificó el número de esporas de cada inóculo previamente obtenido (Pi), expresando el resultado como número de esporas HMA por 100 g de suelo.



Figura 16. Vertido del tamizado de suelo en tubo de centrifuga.

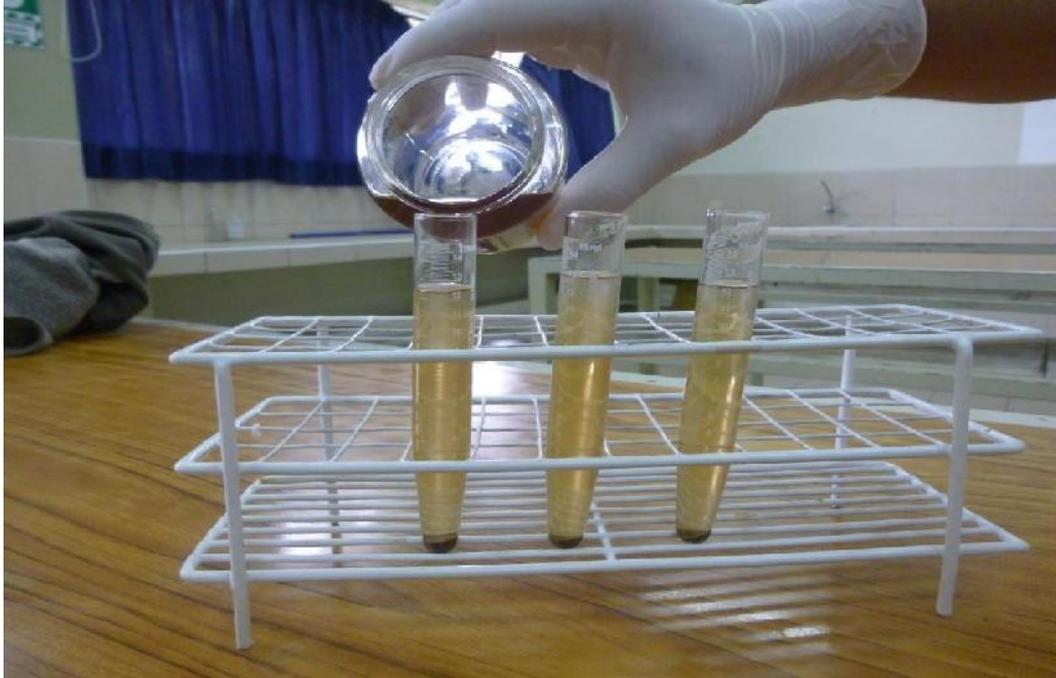


Figura 17. Adición de sacarosa al tamizado de suelo.



Figura 18. Sobrenadante de suelo tamizado vertido en tamiz.

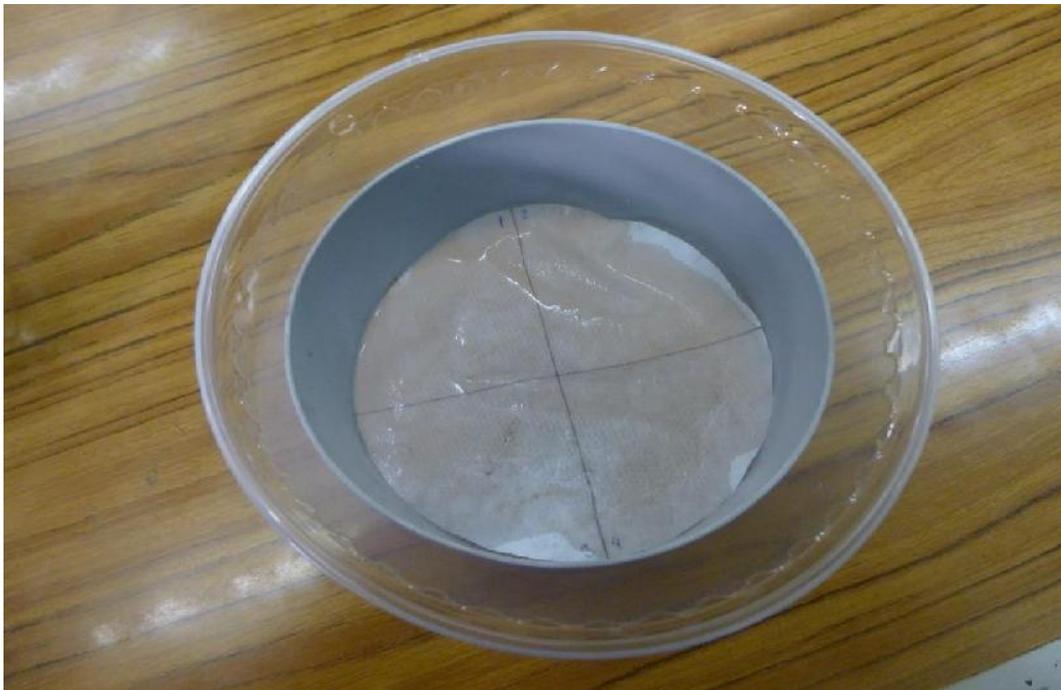


Figura 19. Sobrenadante de suelo depositado sobre papel filtro de embudo Bushner modificado.



Figura 20. Papel filtro seco y con esporas de HMA.



Figura 21. Observación microscópica de esporas de HMA.



Figura 22. Vertido del tamizado de suelo en tamiz de 45 micrones.



Figura 23. Tamizado de suelo en placa de Petri.

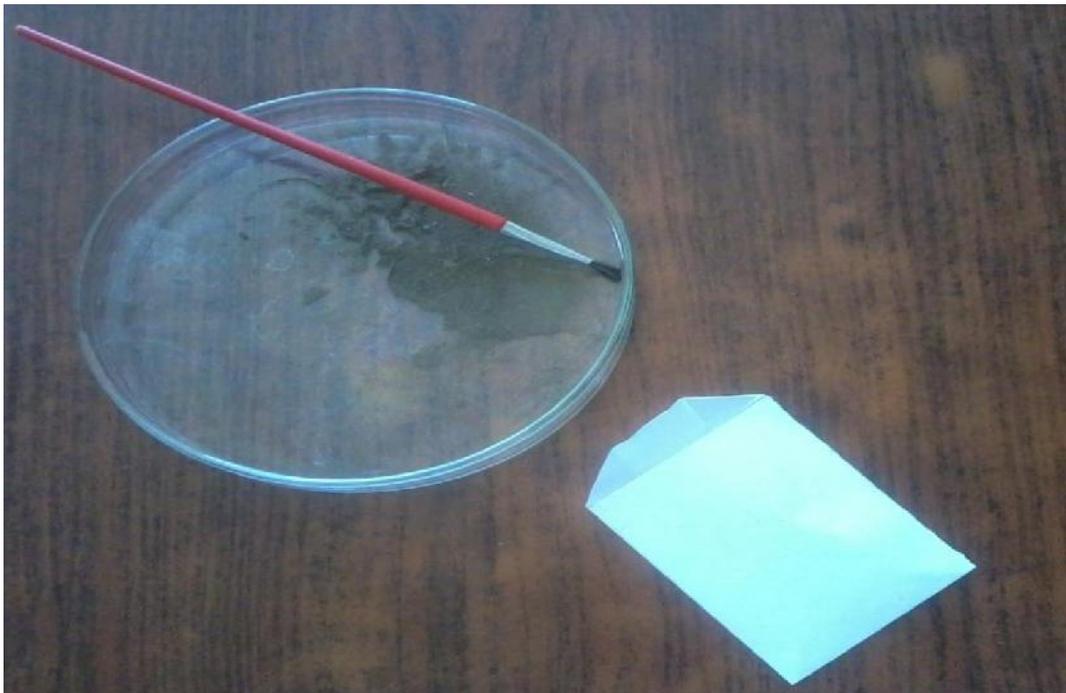


Figura 24. Recuperación de esporas de HMA.



Figura 25. Inoculo de HMA listo para su multiplicación.

3.2.7 Multiplicación de esporas de HMA

Las esporas de HMA, obtenidas mediante procesamiento del suelo, se incrementaron en plantas de maíz según Dávila *et al.* (2009), en condiciones de invernadero.

a. Ubicación e instalación del cultivo

El cultivo de maíz amarillo duro híbrido simple AGRI-144 y la inoculación de esporas de HMA, se realizó en el invernadero de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, en Lambayeque. El ensayo fue conducido entre 6 de setiembre al 6 de octubre de 2014, con una temperatura mínima de 18 °C y una máxima de 26 °C.

b. Características de la especie vegetal

El maíz amarillo duro AGRI -144, es un híbrido simple precoz, con un periodo vegetativo de 115 días. El número de plantas por hectárea es de 55 000, con un potencial de rendimiento de 14 000 kg ha^{-1} . Las plantas alcanzan 1,90 m de altura y requieren cinco riegos, después del abonamiento, a los 30 días después de la siembra, a “lomo negro”, antes que aparezca la primera flor y al llenado de la mazorca (Casos & Santiago, 2013).

c. Acondicionamiento del suelo experimental

El suelo experimental estuvo constituido por 82,5 kg de una mezcla de suelo agrícola, arena y compost, en la proporción 2,5: 2,0: 0,5, que se solarizó por 30 días. A continuación, la mezcla de suelo experimental se distribuyó en 54 bolsas de polietileno negro de 16,5 x 3,5 cm, a razón de 1,5 Kg por bolsa.

d. Porcentaje de germinación

Para determinar el porcentaje de germinación de las semillas de maíz, en cinco bandejas de tecnopor de 20 x 14 cm, en cuyo fondo se colocaron cuatro capas de papel toalla esterilizado, humedecido con agua destilada esterilizada y con ayuda de pinzas esterilizadas, se depositaron

20 semillas de maíz por bandeja, distribuidas en dos hileras, a razón de diez por hilera. Las bandejas se taparon y se mantuvieron a temperatura ambiente (28°C), humedeciéndolas interdiariamente, hasta observar el máximo de germinación (Figura 26), que fue 98%, después de 7 días.

e. Tratamiento de la semilla

Las semillas de maíz se depositaron en una bolsa de plástico, donde se agregó el insecticida en polvo soluble Acephate O, S–dimethylacetylphosphoramidothioate, (Orthene 75PS) en la dosis de 4,8 g kg⁻¹ de semillas). El contenido fue homogenizado, por movimientos de rotación durante 2 minutos, para que el insecticida se distribuya uniformemente sobre las semillas (Figura 27) y después, las semillas fueron extendidas en el interior de la bolsa y llevadas sobre una bandeja hacia la estufa a 30°C, para disminuir el exceso de humedad.

f. Inoculación de las esporas de HMA

En 54 bolsas de polietileno negro, conteniendo el suelo experimental se realizaron dos agujeros de 5 cm de profundidad, se depositaron 5g de inóculo de esporas de HMA en cada agujero y se cubrieron con una capa de 0,5 cm de suelo experimental (Figura 28). Después, se sembró una semilla de maíz en cada agujero y se realizaron los riegos correspondientes, según los requerimientos del cultivo. Se incluyó un control en el que se aplicó agua destilada (Figura 29).

3.2.8 Determinación de la infectividad de los HMA nativos

La infectividad de los HMA se determinó contando el número de esporas por 100g de suelo (Pf) y calculando el porcentaje de micorrización de raíces, 60 días después de la inoculación de HMA. Para contar el número de esporas, 1Kg de suelo fue procesado mediante el método de tamizaje–flotación y filtración descrito en el ítem 3.2.5. El número de esporas obtenidas constituyó la población final (Pf) y tomando en cuenta la población inicial (Pi), se calculó el porcentaje de incremento.



Figura 26. Germinación de semillas de *Zea mays* L.



Figura 27. Homogenización del insecticida con las semillas de *Zea mays* L.



Figura 28. Inoculación de esporas de HMA en suelo experimental.



Figura 29. Suelo experimental inoculado con esporas de HMA y sembrado con *Zea mays* L.

Para contar el número de esporas, 1Kg de suelo fue procesado mediante el método de tamizaje–flotación y filtración descrito en el ítem 3.2.5. El número de esporas obtenidas constituyó la población final (Pf) y tomando en cuenta la población inicial (Pi), se calculó el porcentaje de incremento.

La micorrización de raíces se determinó con la metodología del clareo y tinción descrita por Sieverding *et al.* (1998) y Vierheling *et al.* (1998), modificada por los autores. Para el clareo o despigmentación, las raíces se lavaron con agua de caño, para eliminar el suelo adherido (Anexo 5), se cortaron en fragmentos de aproximadamente 2cm y se depositaron en tubos de 13 x 100 mm, a razón de 12 fragmentos por tubo. Se agregaron 10 mL de hidróxido de potasio, KOH 10%, v/v, cubriendo totalmente las raíces y se llevaron a baño maría, a 87°C, durante 20 minutos. Las raíces se enjuagaron con agua destilada, se adicionaron 10 mL de ácido clorhídrico, HCl 10%, v/v, se dejaron reposar a temperatura ambiente por 5 minutos y después se eliminó el exceso de ácido con agua destilada, obteniéndose raíces despigmentadas.

Para la tinción sobre las raíces despigmentadas, se vertieron 10 mL de solución colorante–tinta china (Anexo 3) y se llevaron a baño maría, por 15 minutos. Se enjuagaron con agua destilada y se depositaron en placas de Petri con lactoglicerina, para su observación posterior bajo el microscopio óptico (Figura 30).

El porcentaje de micorrización de raíces se determinó mediante el método de interceptos de McGonigle *et al.* (1990), modificado por los autores. Los segmentos de raíces fueron extendidos en láminas portaobjetos, cinco en el extremo superior y cinco en el inferior, depositando sobre cada grupo un cubreobjetos y presionando suavemente para evitar la formación de burbujas (Figura 31).



Figura 30. Raíces de *Zea mays* L. pigmentadas y conservadas en lactoglicerina.



Figura 31. Fragmentos de raíces de *Zea mays* L. pigmentados listos para la observación microscópica.

Los preparados de raíces se examinaron bajo el microscopio compuesto, considerando como raíces micorrizadas aquellas donde se observaron hifas en el interior del tejido y el resultado se expresó como porcentaje de micorrización.

3.2.9 Determinación de la efectividad de los hongos HMA nativos

La efectividad de HMA en maíz, se determinó según Guerra (2011). Se midió la altura de las plantas en cm, considerando desde la base del tallo, hasta el extremo final de la hoja bandera. El índice de efectividad se calculó según la fórmula mencionada por Carreño (2009).

$$\text{IEI \%} = \frac{\text{Tratamiento con } \textit{inoculación} - \text{Control sin } \textit{inoculación}}{\text{Control sin } \textit{inoculación}} \times 100$$

3.2.10 Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y figuras que permitieron determinar la eficiencia de la multiplicación de los HMA en maíz. Se utilizaron los programas Microsoft Office Word y Excel, versión 2013.

IV. RESULTADOS

4.1 Esporas de HMA obtenidos e identificados

En el 100% de muestras de suelo cultivado con maíz se obtuvieron esporas de HMA de formas globosa, subglobosa, elíptica e irregular y de color amarillo, marrón y amarillo pálido. En las HMA obtenidas se identificaron los géneros: *Glomus*, *Acaulospora*, *Archaeospora*, *Gigaspora* y *Entrophospora* (Figura 32), con una frecuencia de 100% para *Glomus* y *Acaulospora*, 85% para *Archaeospora*, 28% para *Gigaspora* y 11% para *Entrophospora* (Tabla 4).

En las esporas de *Glomus* spp. la hifa de sustentación se observó recta (Figura 33), curva (Figura 34) y en forma de embudo (Figura 35). En *Acaulospora* spp. y *Entrophospora* spp., la hifa de sustentación se visualizó como un sáculo globoso, en donde se observaron las esporas formadas en la parte externa y lateral, en *Acaulospora* (Figura 36) y en la parte interna y apical, en *Entrophospora* (Figura 37). A su vez, en las esporas maduras (Figura 38), se observaron las cicatrices dejadas por el colapso del sáculo globoso, siendo una en *Acaulospora* (Figura 39, anexo 3) y dos en *Entrophospora*.

En *Archaeospora* spp. la hifa de sustentación se observó recta, ligeramente curva, similar a *Glomus* sp. o como sáculo globoso o esporífero, similar a *Acaulospora* sp. (Figura 40). En *Gigaspora*, las esporas se observaron en el ápice de la hifa de sustentación, ensanchada como bulbo o perilla (Figura 41).

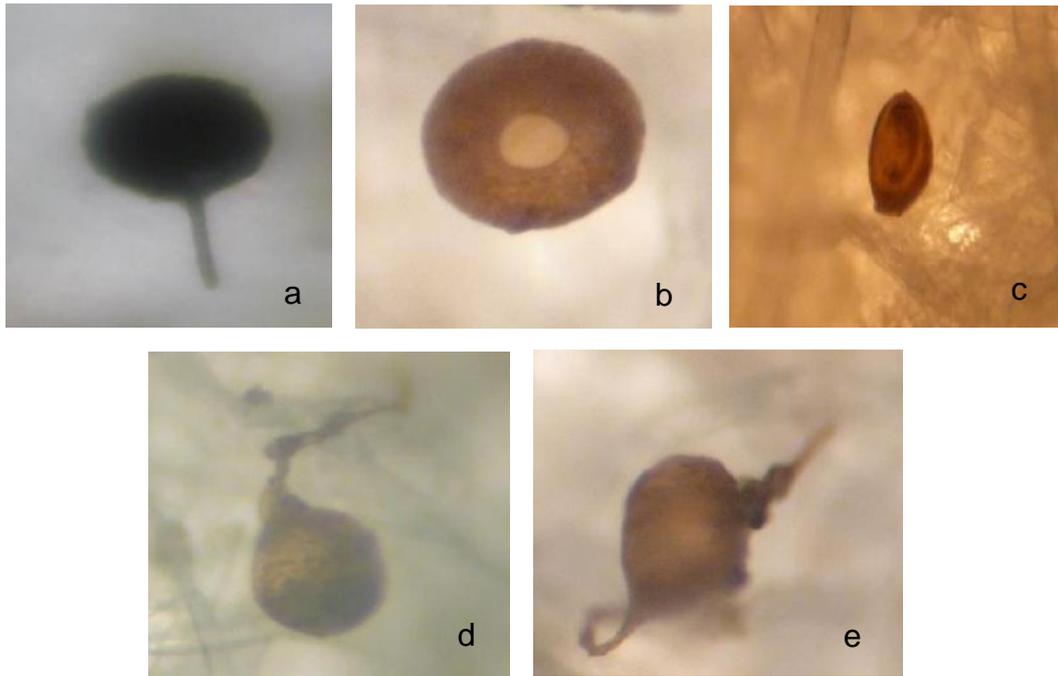


Figura 32. Observación microscópica (40X) de esporas de *Glomus* (a) *Acaulospora* (b), *Archaeospora* (c), *Gigaspora* (d), *Entrophospora* (e).

Tabla 4. Frecuencia de géneros de HMA identificados en muestras de suelo cultivado con *Zea mays* L. en Lambayeque, 2014

Géneros HMA	Muestras de suelo	
	Número	%
<i>Glomus</i> spp.	54	100
<i>Acaulospora</i> spp.	54	100
<i>Archaeospora</i> spp.	46	85
<i>Gigaspora</i> spp.	15	28
<i>Entrophospora</i> spp.	6	11

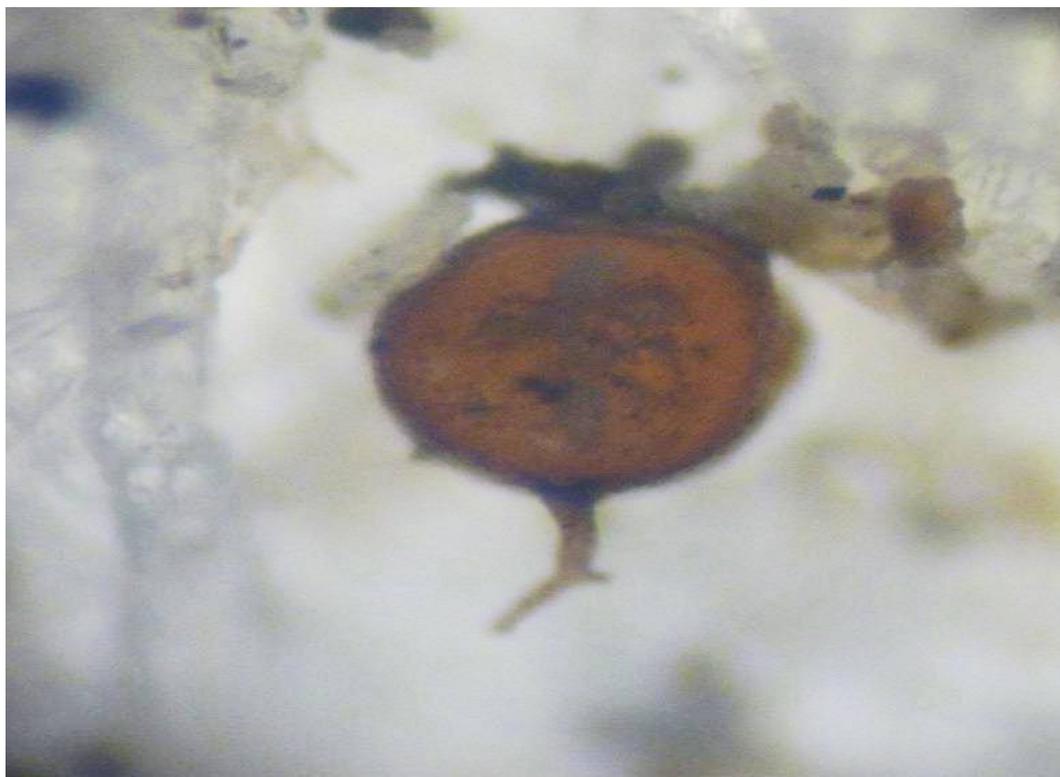


Figura 33. Espora de *Glomus* sp. con hifa de sustentación recta.



Figura 34. Espora de *Glomus* sp. con hifa de sustentación curva.



Figura 35. Espora de *Glomus* sp. con hifa de sustentación en forma de embudo.

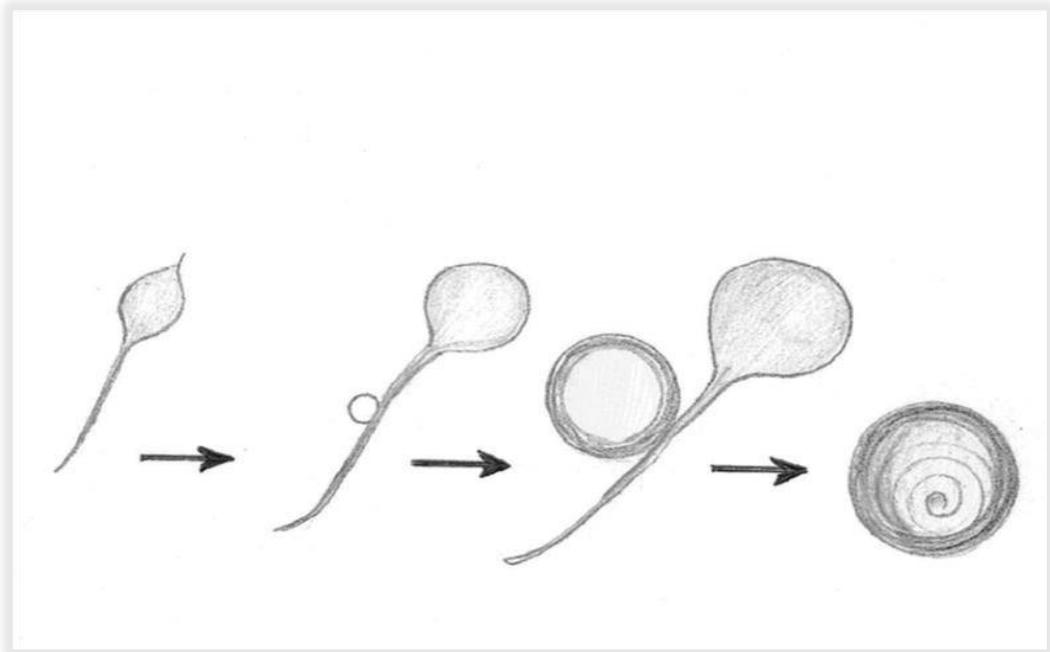


Figura 36. Espora de *Acaulospora* sp. formada en la parte lateral y externa del sáculo globoso.

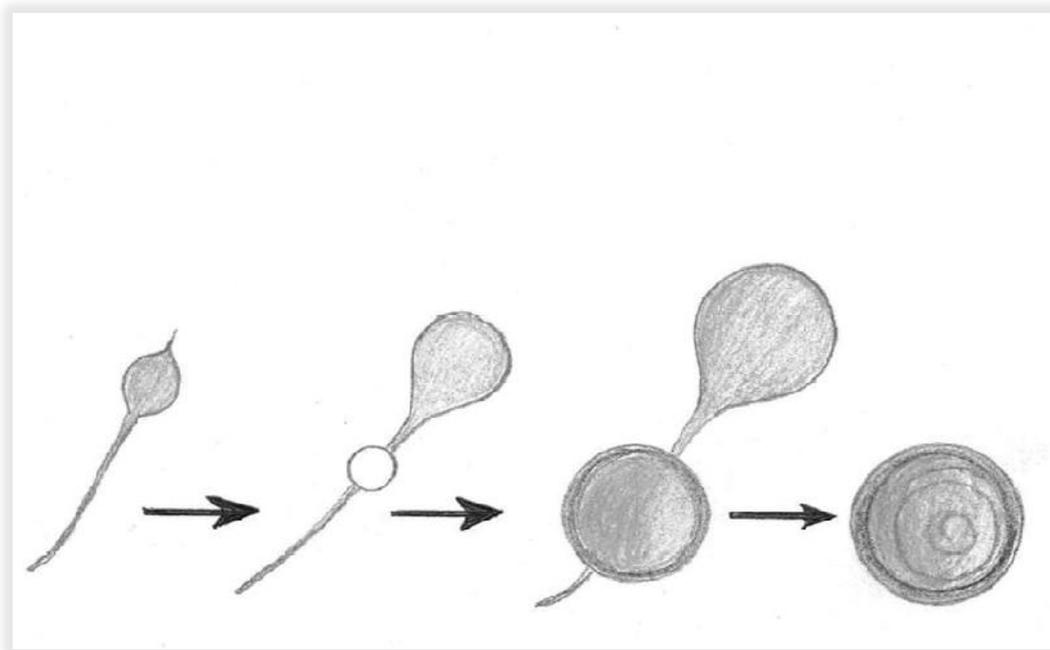


Figura 37. Espora de *Entrophospora* sp. formada en la parte interna y apical del sáculo globoso.



Figura 38. Espora madura de *Acaulospora* sp.

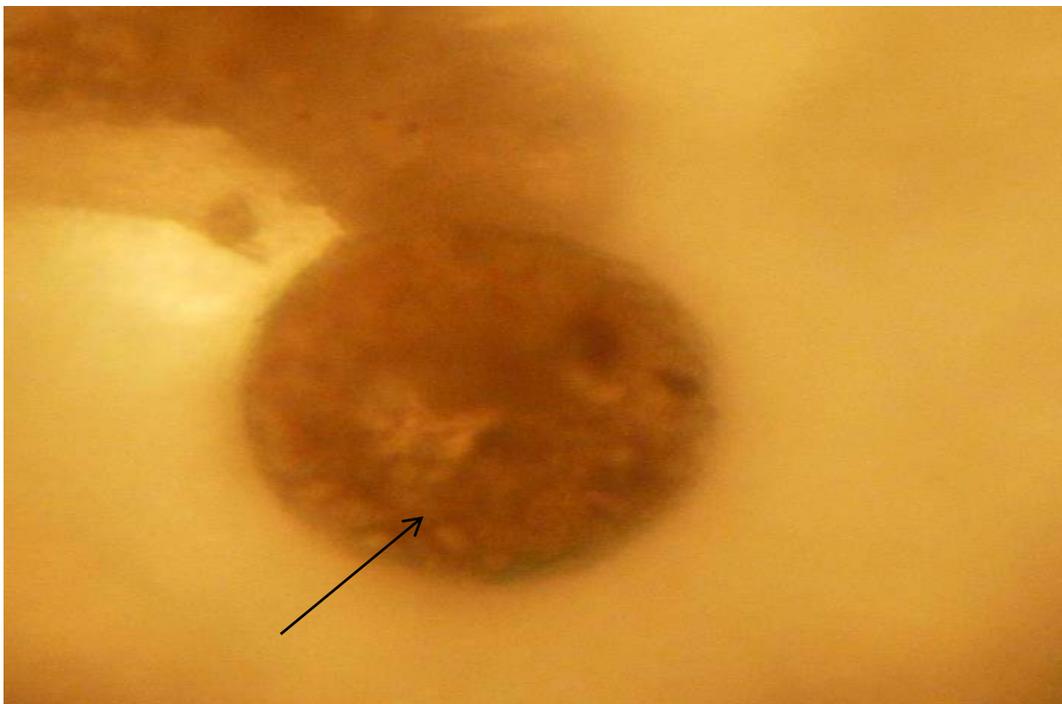


Figura 39. Cicatriz visible en espora madura de *Acaulospora* sp.

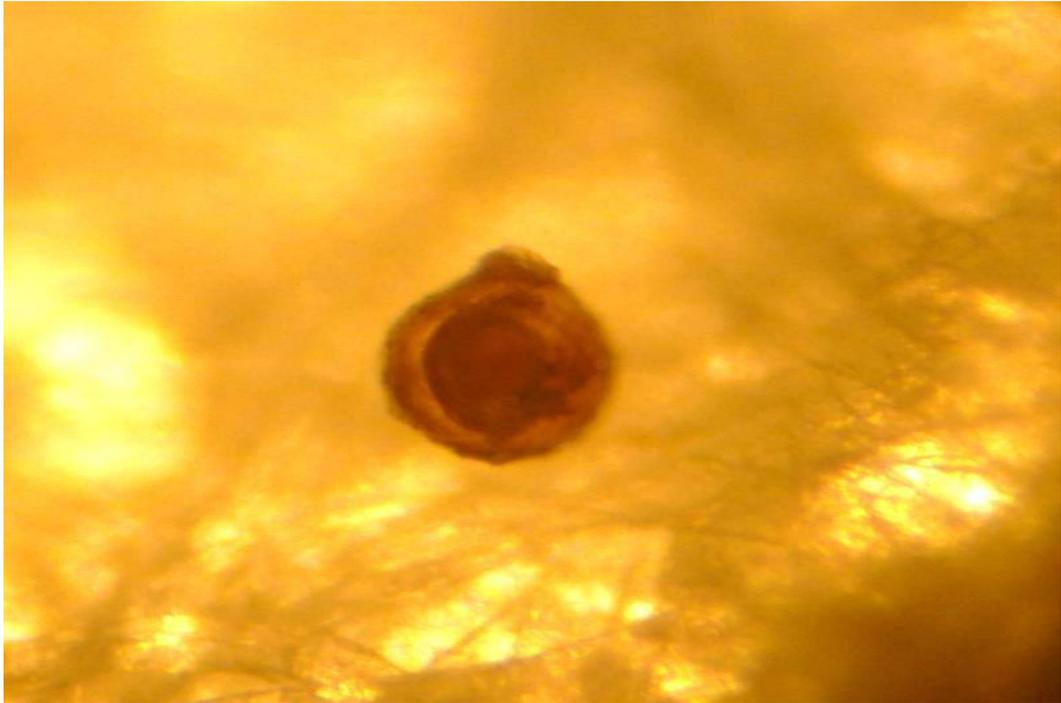


Figura 40. *Archaeopsora* sp. con sáculo esporífero.

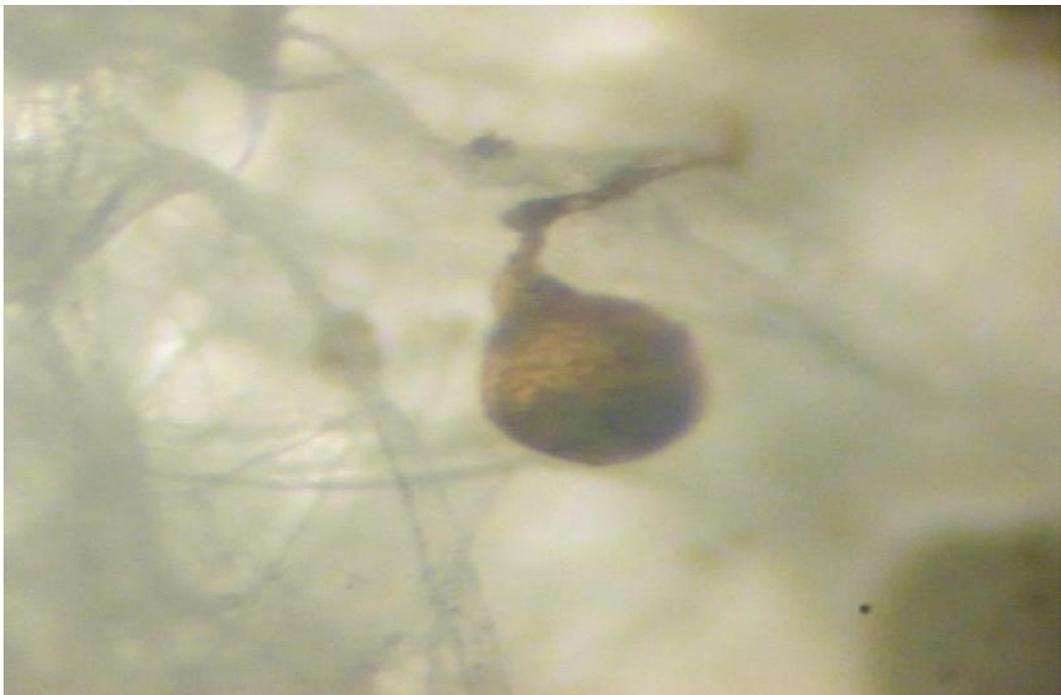


Figura 41. *Gigaspora* sp. con hifa de sustentación en forma de bulbo.

4.2 Hongos micorrízicos arbusculares multiplicados en *Zea mays* L.

Los HMA se multiplicaron en las plantas de maíz, determinándose infectividad y efectividad. La efectividad se evidenció con el incremento de esporas de los HMA en el suelo (Tablas 5, 6, 7, 8, 9) y la micorrización de raíces de maíz (Tabla 10).

Según el género de HMA la frecuencia de muestras de suelo cultivado con maíz donde se incrementaron las esporas fue 100% para *Glomus* y *Acaulospora*; 92,6% en *Archaeospora* 33,3% en *Gigaspora* y 18,5% en *Entrophospora* (Tabla 11). Los porcentajes de incremento fueron de 96,0–593,1%, en *Glomus*; 20,0–400% en *Acaulospora*; 100–400% en *Gigaspora*; 10,0–366,7% en *Archaeospora* y 100–200% en *Entrophospora* (Tablas 5 a 9). En promedio, el incremento fue de 278,7% en *Glomus*; 146,2% en *Acaulospora*; 140,1% en *Archaeospora*; 38,0% en *Gigaspora* y 11,1% en *Entrophospora* (Tabla 12).

En las raíces de maíz se observó micorrización, denotada por la presencia de esporas germinando sobre los pelos radiculares (Figuras 42, 43), hifas en el tejido radicular o hifas formando arbuscúlos en el tejido radicular (Figura 44). El mayor porcentaje de raíces micorrizadas (87,5%) se alcanzó en los tratamientos donde se identificaron los géneros: *Glomus*, *Acaulospora* y *Archaeospora*, con los que también se alcanzaron las mayores frecuencias en las esporas obtenidas de suelo cultivado en maíz (Tablas 4, 10).

La efectividad de los hongos micorrízicos multiplicados en maíz se evidenció con el incremento de la altura de las plantas, obteniéndose índices de efectividad que oscilaron entre 3,5 y 53,7 % (Figura 45; tabla 13).

Tabla 5. Incremento (%) de esporas de *Glomus* spp. en suelo cultivado con *Zea mays* L.

Tratamiento	Esporas/100 g de suelo		Incremento %	Tratamiento	Esporas/100 g de suelo		Incremento %
	Inicial	Final			Inicial	Final	
	42	29			201	593,1	
43	24	166	591,6	32	32	110	243,8
1	48	302	529,2	37	34	116	241,2
30	15	94	526,7	22	50	170	240,0
8	27	164	507,4	18	23	88	239,1
2	31	175	464,5	36	51	160	223,5
25	28	155	453,6	29	45	143	217,7
31	26	140	438,5	49	48	152	216,3
26	23	108	369,6	53	46	138	200,0
4	28	130	364,3	3	23	68	195,7
33	36	165	358,3	11	24	70	191,6
40	38	174	357,9	20	56	132	187,0
28	32	145	353,1	47	30	86	186,6
46	28	123	339,3	52	38	106	178,9
16	26	113	334,6	44	60	156	174,5
35	29	126	334,5	19	26	71	173,1
12	27	113	318,5	14	28	76	171,4
6	25	103	312,0	13	31	84	170,9
50	21	86	309,5	45	55	146	165,5
9	33	131	296,9	10	30	78	160,0
34	48	190	295,8	21	34	87	155,8
38	46	180	291,3	39	56	138	146,4
48	32	125	290,6	15	41	92	124,4
54	40	156	290,0	24	58	126	117,2
41	29	112	286,2	5	60	126	110,0
23	44	168	281,8	7	35	73	108,6
51	26	96	269,2	27	50	98	96,0

Tabla 6. Incremento (%) de esporas de *Acaulospora* spp. en suelo cultivado con *Zea mays* L.

Tratamiento	Esporas/100 g de suelo		Incremento %	Tratamiento	Esporas/100 g de suelo		Incremento %
	Inicial	Final			Inicial	Final	
42	3	14	366,7	10	6	14	133,3
30	10	46	360,0	28	12	28	133,3
26	12	51	325,0	51	21	45	114,3
4	3	12	300,0	45	18	38	111,1
15	4	15	275,0	3	7	14	100,0
2	15	55	266,7	35	9	18	100,0
40	14	50	257,1	41	8	16	100,0
17	4	14	250,0	39	20	38	90,0
33	13	45	246,2	34	14	26	85,7
18	11	38	245,4	37	13	24	84,6
31	12	40	241,7	27	7	12	71,4
9	8	26	225,0	46	7	12	71,4
43	8	26	225,0	29	10	17	70,0
12	5	16	220,0	16	9	17	66,7
53	6	19	216,7	24	12	20	66,7
13	7	22	214,3	19	12	18	50,0
25	8	25	212,5	22	8	12	50,0
11	4	12	200,0	7	12	17	41,6
49	6	18	200,0	36	10	14	40,0
48	15	43	186,7	52	13	17	30,8
32	15	42	180,0	38	12	17	25,0
8	14	39	178,6	5	15	18	20,0
1	13	35	169,2	14	10	12	20,0
20	7	18	157,1	21	10	12	20,0
50	6	15	150,0	23	14	16	14,28
54	12	30	150,0	44	15	17	13,3
47	12	29	141,7	6	10	11	10,0

Tabla 7. Incremento (%) de esporas de *Archaeospora* spp. en suelo cultivado con *Zea mays* L.

Tratamiento	Esporas/100 g de suelo		incremento %	Tratamiento	Esporas/100 g de suelo		Incremento %
	Inicial	Final			Inicial	Final	
2	2	10	400,0	53	3	7	133,3
30	2	10	400,0	38	10	21	110,0
12	2	9	350,0	1	12	26	100,0
11	2	8	300,0	9	4	8	100,0
42	5	20	300,0	20	3	6	100,0
35	4	15	275,0	22	1	2	100,0
8	3	11	266,7	23	1	2	100,0
15	6	22	266,7	37	6	12	100,0
31	3	11	266,7	6	5	9	80,0
3	2	7	250,0	19	4	7	75,0
21	2	7	250,0	26	11	19	72,7
4	2	6	200,0	5	6	10	66,7
18	1	3	200,0	14	5	8	60,0
24	1	3	200,0	47	18	26	44,4
32	4	12	200,0	40	16	23	43,8
34	4	12	200,0	10	5	7	40,0
43	3	9	200,0	49	8	11	37,5
50	4	12	200,0	54	8	10	25,0
52	2	6	200,0	25	4	6	20,0
33	10	28	180,0				
29	12	32	166,7				
28	8	21	152,5				
39	4	10	150,0				
44	4	10	150,0				
46	2	5	150,0				
48	4	10	150,0				
7	3	7	133,3				

Tabla 8. Incremento (%) de esporas de *Gigaspora* spp. en suelo cultivado con *Zea mays* L.

Tratamiento	Esporas/100 g de suelo		Incremento %
	Inicial	Final	
1	1	5	400
12	1	3	200
13	1	3	200
47	1	3	200
51	1	3	200
26	2	5	150
4	2	4	100
17	2	4	100
22	1	2	100
28	1	2	100
38	1	2	100
43	1	2	100
54	1	2	100
45	1	2	100
48	1	2	100

Tabla 9. Incremento (%) de esporas de *Entrophospora* spp. en suelo cultivado con *Zea mays* L.

Tratamiento	Esporas/100 g de suelo		Incremento %
	Inicial	Final	
25	1	3	200
54	1	3	200
1	1	2	100
14	1	2	100
33	1	2	100
43	1	2	100

Tabla 10. Porcentaje de micorrización de raíces de *Zea mays* L. infectado con diferentes géneros de HMA

Nº tratamientos	HMA en suelo	Tratamientos con raíces micorrizadas	
		Nº	%
32	<i>Glomus</i> <i>Acaulospora</i> <i>Archaeospora</i>	28	87,5
7	<i>Glomus</i> <i>Acaulospora</i> <i>Archaeospora</i> <i>Gigaspora</i>	5	71,4
3	<i>Glomus</i> <i>Acaulospora</i> <i>Archaeospora</i> <i>Gigaspora</i> <i>Entrophospora</i>	2	66,7
5	<i>Glomus</i> <i>Acaulospora</i> <i>Gigaspora</i>	3	60,0
4	<i>Glomus</i> <i>Acaulospora</i>	2	50,0
3	<i>Glomus</i> <i>Acaulospora</i> <i>Archaeospora</i> <i>Entrophospora</i>	1	33,3

Tabla 11. Frecuencia de muestras de suelo cultivado con *Zea mays* L. donde se incrementaron las esporas de HMA

Géneros HMA	Muestras de suelo	
	Número	%
<i>Glomus</i> spp.	54	100
<i>Acaulospora</i> spp.	54	100
<i>Archaeospora</i> spp.	50	92,6
<i>Gigaspora</i> spp.	18	33,3
<i>Entrophospora</i> spp.	10	18,5

Tabla 12. Número promedio e incremento de esporas de cinco géneros de HMA en *Zea mays* L.

Géneros HMA	Esporas/100 g de suelo		Incremento %
	Inicial	Final	
<i>Glomus</i> spp.	35,9	128,9	278,7
<i>Acaulospora</i> spp.	10,4	24,4	146,2
<i>Archaeospora</i> spp.	4,3	10,0	140,1
<i>Gigaspora</i> spp.	0,3	0,8	38,0
<i>Entrophospora</i> spp.	0,1	0,2	11,1



Figura 42. Germinación de espora de HMA sobre pelo radicular de *Zea mays* L.

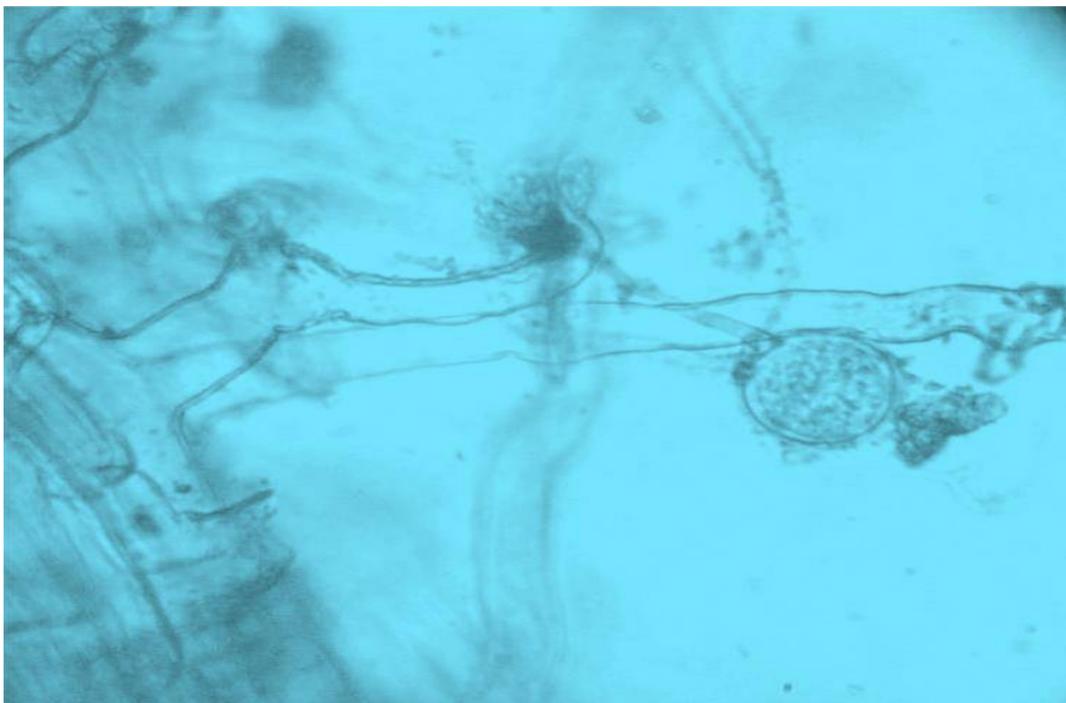


Figura 43. Espora de HMA germinando y atravesando el pelo radicular de *Zea mays* L.

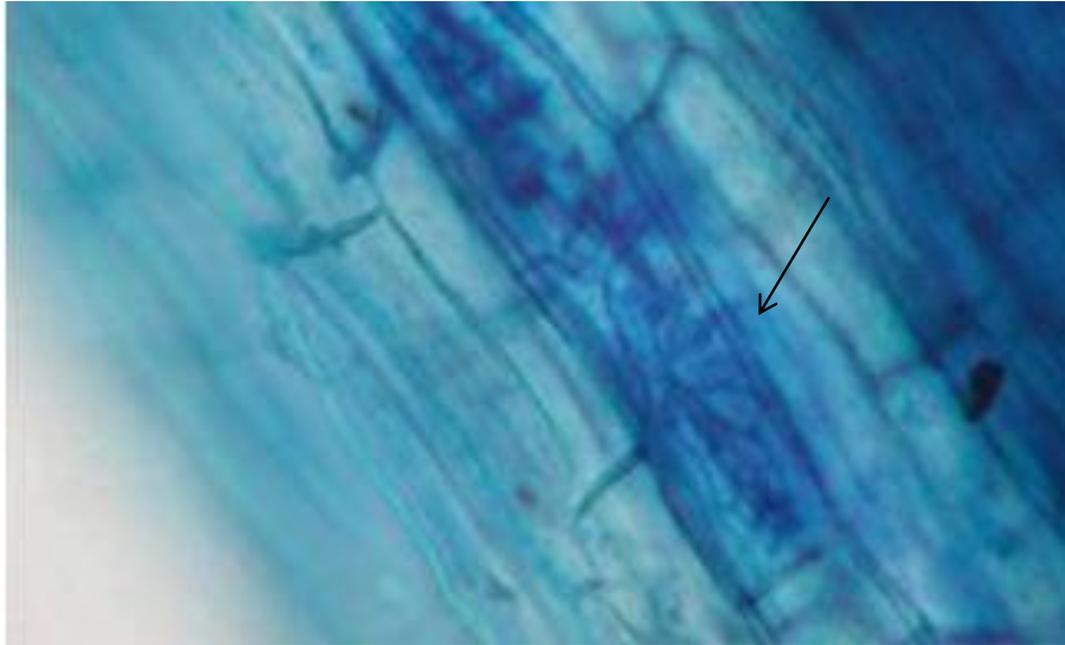


Figura 44. Hifas formadoras de arbusculos en tejido radicular de *Zea mays* L.



Figura 45. Altura de plantas de *Zea mays* L. con HMA (a) en comparación con el testigo (b).

Tabla 13. Índice de efectividad de HMA en el cultivo de *Zea mays* L.

Tratamientos	Altura *	IEI	Tratamientos	Altura *	IEI
	(cm)	(%)		(cm)	(%)
1	96,5	53,7	17	71,9	14,4
2	95,0	51,2	46	72,2	14,3
25	92,0	46,5	13	70,4	14,0
40	89,0	41,7	24	71,6	14,0
8	85,6	36,3	33	71,4	13,6
42	80,0	27,3	49	71,4	13,6
34	79,9	27,2	47	72,8	13,1
43	79,0	25,7	6	71,0	13,0
31	79,1	25,6	32	70,9	12,8
26	78,4	24,8	15	70,2	11,7
54	78,4	24,8	30	70,0	11,4
51	78,1	24,3	50	69,8	11,1
38	78,0	24,2	12	69,7	10,9
22	76,0	21,0	35	69,7	10,9
28	76,0	21,0	11	69,0	9,8
45	76,0	21,0	18	69,0	9,8
29	75,1	19,4	10	68,8	9,5
36	74,4	18,4	14	68,4	8,9
16	74,2	18,2	21	68,4	8,9
48	73,6	17,1	3	68,3	8,7
4	73,4	16,8	7	68,2	8,5
39	73,4	16,8	27	68,2	8,5
9	72,8	15,9	52	68,2	8,5
23	72,6	15,6	44	68,1	8,4
37	72,4	15,2	20	68,0	8,3
41	72,0	14,6	19	67,3	7,1
53	72,0	14,6	5	65,0	3,5
Control	62,8			62,8	

V. DISCUSIÓN

Las micorrizas se definen en términos estructurales como asociaciones simbióticas entre hongos del suelo y los órganos de absorción de las plantas. Según su estructura, morfología y modo de infección se clasifican en ectomicorrizas y endomicorrizas. En este último grupo, el subtipo mayoritario son las micorrizas vesículo arbusculares, HVA, u hongos micorrízicos arbusculares, HMA (Salas, 2004). En este contexto, se obtuvieron esporas de HMA en muestras de suelo circundante a la raíz, de plantas de maíz, coincidiendo con Guerra (2011).

Los HMA son simbioses obligados; sin embargo, sus esporas germinan con facilidad, alejadas de las raíces vivas y crecen considerablemente, sin contacto con alguna raíz, por la que se les puede aislar del suelo (Dávila *et al.*, 2009). Con base a las características morfológicas de las esporas obtenidas de suelo cultivado con maíz, se identificó el género de HMA, coincidiendo con Monroy (2004) y Dávila *et al.* (2009), quienes informaron que en la identificación de las esporas de HMA se consideran las características de la hifa de sostén y la forma y tamaño de las esporas, aunque también se investiga el número de capas y sus ornamentaciones (Franco, 2008).

Los HMA colonizan cerca del 80% de las especies vegetales, y han sido descritos en Briofitas, Pteridofitas, Gimnospermas y Angiospermas (Monroy, 2004). Se encuentran reportes de esporas de HMA obtenidas en suelo cultivado con banano (Úsuga *et al.*, 2008), cacao

(Dávila *et al.*, 2009; Prieto *et al.*, 2012), tomate (Medina *et al.*, 2011) y malezas (Monroy, 2004).

Las esporas de los HMA presentaron diversa forma y color. Al respecto, Morton (1988), mencionado por Dávila *et al.* (2009), explicó que las esporas de HMA tienen características muy variables, porque son afectadas por el medio ambiente físico donde se forman; no obstante, con excepción de *Sclerocystis*, en su mayoría las esporas son globosas y subglobosas. A su vez, la diferencia del color es producto de los pigmentos de la pared de la espora o del interior. Esporas de *Glomus*, *Acaulospora* y *Scutellospora* presentan un rango de color hialino o negro. A diferencia, las esporas de *Gigaspora* son hialinas y amarillas pálidas.

En el suelo circundante a la raíz de maíz, se identificaron *Glomus*, *Acaulospora*, *Archaeospora*, *Gigaspora* y *Entrophospora*, géneros de HMA que también fueron identificados en cacao (Dávila *et al.*, 2009). A su vez, *Acaulospora*, *Glomus* y *Entrophospora* se registraron en malezas (Monroy, 2004) y suelo bananero (Úsuga *et al.*, 2008). En los HMA identificados, predominó *Glomus* y *Acaulospora*. Medina *et al.* (2011) y Prieto *et al.* (2012) concluyeron que *Glomus* es el género de HMA predominante y más investigado. Los HMA se encuentran en suelos con pH 2,7–9,2; no obstante, *Glomus* y *Acaulospora* prevalecen en condiciones ácidas y neutrales. En este contexto, Monroy (2004) demostró que *Acaulospora* y *Scutellospora* representaron 60% del total de la población de HMA en suelo de malezas con pH 4,5–5,0.

Los HMA deben ser inoculados en suelos, donde el potencial de inóculo es bajo o donde los hongos nativos son inefectivos; no obstante, debido a que los HMA son simbioses obligados, el inóculo debe producirse multiplicando el hongo aislado, en raíces de plantas hospedantes susceptibles, cultivadas en sustrato o suelo esterilizado, tal

que después de 3 a 6 meses se logre la colonización en las raíces y su esporulación (Salas y Blanco, 2000). De esta manera, para multiplicar HMA, se colectaron esporas en suelo cultivado con maíz, aunque también se puede obtener micelios fúngicos, porque ambos son propágulos infectivos del suelo circundante a la raíz; sin embargo, los micelios mayoritariamente se encuentran en raicillas de plantas vivas o fragmentos de raíces infectadas (Dávila *et al.*, 2009).

Las plantas de maíz respondieron favorablemente a la infección por los HMA nativos, determinándose infectividad y efectividad. De igual manera Dávila *et al.* (2009), utilizaron el maíz para incrementar esporas de cacao. Según Martínez *et al.* (2010), la respuesta de la planta a la inoculación con HMA depende de la misma planta hospedadora, hongo MA y fertilidad del suelo. Plantas micrótrofas facultativas como el maíz puede crecer sin micorrizas en suelo fértil, pero se benefician de la infección micorrízica, incrementando su desarrollo y su rendimiento, cuando los niveles de P son bajos. El maíz es un cultivo de crecimiento rápido y desarrolla un amplio sistema radicular, característica que debe tener una planta para que sea fácilmente micorrizada.

La importancia de incrementar las esporas de HMA con maíz, radica en la obtención de inóculo con una diversidad de microorganismos fúngicos endófitos nativos, adaptados al sistema agroecológico, que posteriormente pueden ser investigados en diversos cultivos agrícolas, por cuanto las endomicorrizas son poco específicas, es decir una especie puede infectar un gran número de vegetales. De igual manera, esporas de HMA de *Brachiaria decumbens* se incrementaron en *Pennisetum clandestinum* (Sosa *et al.*, 2006), cacao en maíz (Dávila *et al.*, 2009), cacao y soya en arroz (Morales y Durango, 2008), tomate en sorgo. (Medina *et al.*, 2011) y banano en *Brachiaria decumbens* y *Pueraria phaseoloides* (Úsuga *et al.*, 2008).

La densidad inicial de esporas de HMA/100 g de suelo cultivado con maíz fue baja (1–60) y es explicada por el efecto negativo de los productos químicos aplicados frecuentemente en los campos agrícolas comerciales (Heijden *et al.*, 2004; Monroy, 2004). Corroborando el resultado, Monroy (2004) cuantificó 55–243 esporas de HMA/100 g de suelo en malezas y 63–72 esporas en suelo agrícola, correspondiente al testigo químico.

Heijden *et al.* (2004) mencionaron que en suelos cultivados, usualmente existe baja densidad de HMA, contrastando con las comunidades complejas y diversas de HMA de pastos y bosques tropicales. A su vez, Morales y Durango (2008) demostraron que la población fúngica y la simbiosis también es afectada severamente por las prácticas agrícolas, obteniéndose los mayores valores en campos con rotación de cultivos, sin labranza, en comparación con los sistemas agrícolas convencionales; no obstante, Medina *et al.* (2011), cuantificaron 800–1700 esporas/100 g de suelo cultivado con tomate.

Es necesario remarcar que el muestreo se realizó en campos cultivados con maíz, pero sin riego reciente, coincidiendo con Dávila *et al.* (2009). Según Monroy (2004), las condiciones desfavorables, principalmente sequedad favorecen la esporulación. Este investigador demostró que la densidad de esporas en suelos de malezas fue 12 % mayor en la época seca que en la lluviosa, señalando que los HMA forman un mayor número de estructuras de resistencia cuando las condiciones de humedad del suelo son adversas.

La infectividad de los HMA en maíz se evidenció con el incremento de esporas y la micorrización, coincidiendo con Monroy (2004) y Dávila *et al.* (2009). El incremento de las esporas alcanzó 593,1% con *Glomus*, superando 555,4%, reportado por Úsuga *et al.* (2008) para HMA

incrementados en plantas de banano. Prieto *et al.* (2012) alcanzaron 2566,7 % de incremento en las esporas de *Glomus* spp. La diferencia puede ser atribuida a condiciones edafoclimáticas. En el presente estudio, el clima fue seco, con una temperatura máxima de 26 °C. A diferencia, Prieto *et al.* (2012) trabajaron con esporas de inóculos comerciales, en sistemas agroforestales del trópico húmedo, que favorecieron ampliamente el desarrollo y multiplicación de los HMA.

La micorrización de la raíces de maíz se observó previa despigmentación y tinción coincidiendo con Monroy (2004), Morales y Durango (2008) y Mujica y Fuentes (2012). Al respecto Salas (2004) concluyó que la colonización de la raíz con HMA no cambia drásticamente su morfología externa, pero si la interna, la misma que puede ser observada bajo el microscopio; una vez que se han teñido las estructuras de los hongos dentro de las raíces. Algunas plantas como *Allium* y *Zea* sintetizan un pigmento amarillo cuando son colonizados por HMA; sin embargo, mayoritariamente se utiliza H₂O₂ o NaOCl, después del clareado de las raíces con KOH, previo a la tinción con azul de tripano o “clorazol black E”.

En las raíces de maíz se observaron esporas germinando, hifas y arbusculos. Según Dávila *et al.* (2009), los indicadores de infección micorrizal son hifas, arbusculos y vesículas; no obstante, Monroy (2004) también considera las esporas. El nombre vesículo arbuscular se deriva de las estructuras características: arbusculos y vesículas. Los arbusculos son bifurcaciones septadas de hifas intracelulares, que forman un enrollamiento o centro de intercambio bidireccional entre el hongo y la planta. Tienen un periodo de vida muy corto de 2–15 días y son remplazados por otras más jóvenes, mientras el intercambio de nutrientes este activo.

La colonización micorrizal promedio de los HMA en las plantas de maíz fue de 61,5% superior a 30,5 % reportado por Dávila *et al.* (2009) para HMA de cacao multiplicadas en maíz. Asimismo, es superior a los porcentajes de colonización, mencionados por Úsuga *et al.* (2008), para esporas de HMA obtenidas de suelo bananero y multiplicadas en *Brachiaria decumbens* y *Sorgum vulgare*, en las que se alcanzó $46,61 \pm 19,41$ y $44,84 \pm 18,67\%$, respectivamente.

La efectividad de los HMA se evidenció con el incremento de altura de las plantas de maíz, alcanzando 53,7 % y superando el porcentaje de incremento de 47,6 reportado por Dávila *et al.* (2009), en la altura de plantas de maíz inoculadas con HMA de cacao. Las micorrizas contribuyen a la nutrición, particularmente en la absorción de fósforo por las plantas, tanto en ecosistemas agrícolas como naturales. También mejoran la captación de agua y otros nutrientes, además de la transferencia de nitrógeno a partir de distintas fuentes, la sanidad vegetal a través de protección incrementada contra las condiciones desfavorables bióticas (patógenos) o abióticas (sequía, salinidad y metales pesados) y la estructura del suelo, por la formación de microagregados, necesarios para un buen estado nutricional e hídrico del suelo (Barea *et al.*, 2005).

Las plantas de maíz favorecieron la colonización micorrízica y la producción de esporas, coincidiendo con Dávila *et al.* (2009). Por su parte Úsuga *et al.* (2008), investigaron el inóculo HMA obtenido después de su multiplicación en diferentes plantas y determinaron que si el interés es producir raíces colonizadas debería utilizarse *Brachiaria decumbens* y si el objetivo es obtener esporas se deben elegir plantas de *S. vulgare*. Es importante resaltar que un inóculo de raíces colonizadas como propágulos infectivos es de excelente calidad, siempre y cuando se utilice de inmediato, porque sin la planta viva, el micelio colonizador muere

en pocas semanas, aun almacenado en un ambiente fresco (Hass y Krikum,1985, mencionado por Úsuga *et al.* (2008).

Con base a los resultados obtenidos el maíz es una planta hospedadora de HMA, en condiciones de invernadero, por lo que se puede utilizar en bancos de germoplasma, para incrementar y multiplicar poblaciones de hongos heterogéneos y homogéneos (Úsuga *et al.*, 2008; Dávila *et al.*, 2009).

VI. CONCLUSIONES

- ✓ En suelo circundante a la raíz de plantas de maíz se obtuvieron esporas de HMA, identificándose *Glomus* (100%), *Acaulospora* (100%), *Archaeospora* (85%), *Gigaspora* (28%) y *Entrophospora* (11%).
- ✓ Las plantas de maíz fueron eficientes para la multiplicación de HMA, evidenciándose infectividad y efectividad. En la infectividad se determinó hasta 593,1% de incremento en las esporas y 87,5% de micorrización de las raíces. En la efectividad se determinó hasta 53,7% de incremento en la altura de las plantas de maíz.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Determinar el efecto de las esporas de HMA multiplicados en el desarrollo vegetativo y rendimiento de maíz, en condiciones de campo.
- ✓ Determinar la cinética de la multiplicación de las esporas de HMA en plantas de maíz en diferentes tiempos.
- ✓ Comparar el incremento de poblaciones homogéneas y heterogéneas de HMA en maíz.

VIII. RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares, HMA, constituyen una alternativa como biofertilizantes; sin embargo, son simbioses obligados y requieren incrementarse en huéspedes susceptibles. Se investigó la eficiencia de la multiplicación de HMA nativos en *Zea mays* L., en condiciones de invernadero. Se colectaron 54 muestras de suelo circundante a la rizósfera de las plantas de maíz, se procesaron mediante el método tamizaje–flotación–filtración, se observaron e identificaron en base a su morfología y se multiplicaron durante 60 días en maíz amarillo duro. En todas las muestras de suelo se obtuvieron esporas de HMA, identificándose *Glomus* (100%), *Acaulospora* (100%), *Archaeospora* (85%), *Gigaspora* (28%) y *Entrophospora* (11%). Las plantas de maíz fueron eficientes para la multiplicación de HMA, evidenciándose infectividad y efectividad. En la infectividad se determinó hasta 593,1% de incremento en las esporas y 87,5% de micorrización de las raíces. En la efectividad se determinó hasta 53,7% de incremento en la altura de las plantas de maíz, demostrándose el potencial de maíz para la multiplicación de HMA.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado, S. (Ed.). (2012). Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la agricultura. México. Recuperado de www.inifap.gob.mx
- Alvitres, V. (2000). *Método científico. Planificación de la Investigación*. 2da ed. Lambayeque: Editorial Ciencia.
- Barea, J., Azcón, R. & Azcón-Aguilar, C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. En: Buscot, F., & Varma, A. (Eds.), *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. (pp. 195–212) Berlin: Springer.
- Blanco, F., & Salas, E. (1997). Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 21(1):55-67.
- Carreño, C., Escobar, C., García, F., Horna, Y., Mendoza, G., & Muñoz, H. (2010). *Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPRs)*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Casos, I. & Santiago, P. (2013). *Potencial promotor del crecimiento de las especies de Azospirillum aisladas de raíces de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Cordero, J., & Ortega, E. (2008). La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana Biotecnología*, X (1), 11–120.
- Dávila, L., Ramos, C., & Rosales, C. (2009). Multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares MA nativos de cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) en maíz (*Zea mays*) bajo distintos tratamientos agronómicos. (Tesis de Licenciatura). Universidad Popular del Cesar Valledupar, Colombia.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- Guerra, M. (2011). *Afinidad por colonización de dos hongos micorrízicos en plantas de maíz*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, Michoacán, México.
- Hernández, R., Fernández, C., & Batista, P. (2003). *Metodología de la Investigación*. México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A.
- International Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi. INVAM. (2009). *Identification to Genus*. Recuperado de <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/genuskey.htm>
- Lara, C., Villalba, M., & Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno en la zona agrícola de San Carlos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 6–14.
- Manjarrez, M., Alarcón, A., & Ferrera-Cerrato, R. (2000). Biotecnología de la producción de inoculo micorrízico arbuscular y su control de calidad. En Alarcón, A., & Ferrera-Cerrato, R. (Eds.), *Ecología, Fisiología y biotecnología de la Micorriza Arbuscular* (pp. 239-250). México: Mundi Prensa.

- Martinez, O., Jorquero, M., Crowley, D., Gojardo, G. & Mora, M. (2010). Mechanismos and practical considerations involved in plant generoz promotion by rizobacteria. *Journal of soil Science and Plant Nutrition*, 10, 293–319.
- Medina, L., Rodrigues, Y., Torres, Y., & Herrera, R. (2011). Aislamiento e identificación de hongos micorrízicos arbusculares nativos de la zona de las caobas, holguín. *Cultivos Tropicales*, 31(3), 2–4.
- McGonigle, T., & Fitter, A. (1990). Ecological specificity of vesicular arbuscular mycorrhizal associations. *Mycology Research*, 94, 120-122.
- Monroy, H. (2004). Caracterización de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) nativas, en seis coberturas de cítricos en el piedemonte del meta (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional de Colombia, Bogota.
- Morales, R., & Durango, W. (2008). Resultados en la obtención de inoculos nativos de hongos micorrízicos en cultivos de cacao (*Theobroma cacao*) y soya (*Glycine max*). *Establecimiento y mantenimiento de cepario de micorrizas nativas de cacao y soya SENACYT*, 6–7 .
- Mujica, Y., & Fuentes, A. (2012). Efecto a la biofertilización con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el cultivo del tomate en condiciones de estrés abiótico. *Instituto Nacional de Ciencia Agrícolas (INCA)*, 2–5.
- Peña, C., Cardona, G., Mazonra, A., Arguellez, J., & Arcos, A. (2006). Micorrizas arbusculares de la amazonía colombiana. *Catálogo ilustrado. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI*.

- Prieto, O., Belezaca, C., Mora, W., Garcés, F., Sabando, F., & Cedeño, P. (2012). Identificación de hongos micorrízicos arbusculares en sistemas agroforestales con cacao en el trópico húmedo ecuatoriano. *Revista Agronomía Mesoamericana*, 23(2), 233–239.
- Ramirez, R. (2013). Efecto de los fertilizantes y micorrizas en el vigor y producción del chile piquín (*capsicum annum var. glabriusculum*), en el noreste de México. Recuperado de: http://www.fcf.uanl.mx/sites/default/files/files/Ing_%20Roman%20Ram%C3%ADres%20Hern%C3%A1ndez,%203er_%20Nivel.pdf
- Rao, A., & Tarafdar, J. (2002). Microbial mobilization of phosphorus for higher crop production in arid soils. In *Biotechnology of Biofertilizers*. Kannaiyan, S. (Ed.). India: Narosa Publishing House.
- Rico, M. (2009). Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú (Tesis de licenciatura) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y alimentación, SAGARPA. (2010). Uso de fertilizantes. México. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/>.
- Sieverding, E. (1983). Manual de métodos de investigaciones en micorrizas vesículo arbusculares en el laboratorio. Palmira: *Centro Internacional de Agricultura Tropical* (CIAT).
- Salas, E. (2004). Las Micorrizas y su importancia para el manejo y conservación de los árboles del trópico. Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Costa Rica.
- Salas, E., & Blanco, F. (2000). Selección de plantas hospederas y efecto del fosforo para la producción de inoculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) por el método de cultivo en macetas. *Agronomía Costarricense*, 23(1): 11–17.

- Sosa, T., Sánchez, J., Morales, E. & Cruz, F. (2006). Interacción micorrizas arbusculares *Trichoderma harzianum* (Moniliaceae) y efectos sobre el crecimiento de *Brachiaria decumbens* (Poaceae). *Revista Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 43–54.
- Tufiño, A. (2011). *Efecto de la interacción de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y la fertilización, sobre el crecimiento y desarrollo de planta micropropagadas de banano (Musa paradisiaca) durante la fase de aclimatación.* (Tesis de Ingeniería). Escuela Politécnica del Ejército, Pichincha, Ecuador.
- Úsuga, C., Castañeda, D., & Franco, A. (2008). Multiplicación de hongos micorriza arbuscular (HMA) y efecto de la micorrización en plantas micropropagadas de banano (Musa AAA cv. Gran Enano) (Musaceae). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 61(1), 4279–4290.
- Vierheilig, H., Coughlan, A., Wyss U., Piche, Y., & Vinegar, A. (1998) Simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied Environment Microbiology*, 64(12), 5004–5007.

X. ANEXOS

ANEXO 1

Cálculo del número de muestras para la obtención de HMA (en Alvitres, 2000)

$$n = \frac{Z^2 (p \cdot q)}{T^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90 \cdot 0,10)}{(0,8)^2}$$

$$n = 54,02 \text{ muestras}$$

Dónde:

n= Tamaño de la muestra

Z= 1,96 ($\alpha = 0,05$) valor estándar

p= prevalencia o presencia de HMA (0,90).

q= 1-p, ausencia (0,10).

T= error estimado (0,08)

ANEXO 2

Reactivos (en Lara *et al.*, 2007; Cadena y Martínez, 2011)

- **Hipoclorito de sodio 5%**

Hipoclorito de sodio	5mL
Agua destilada	995 mL

- **Hidróxido de potasio al 10%**

Hidróxido de potasio	10 g
Agua destilada	1000mL

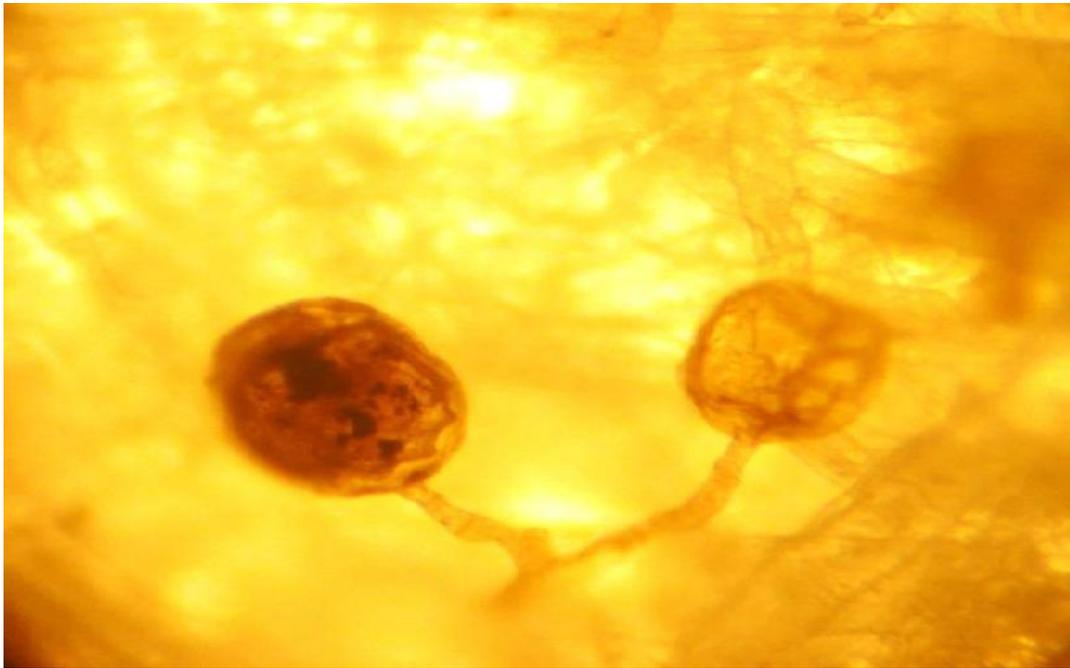
- **Ácido clorhídrico al 10 %**

Ácido clorhídrico	10mL
Agua destilada	990mL

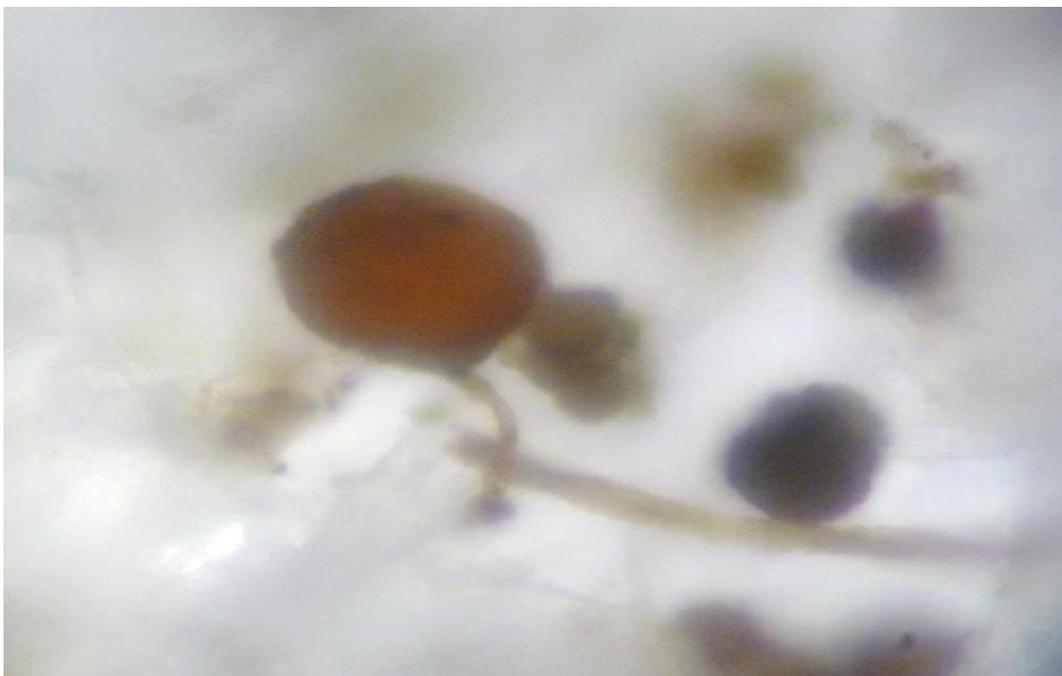
- **Solución colorante**

Ácido acético 5%	50mL
Tinta china azul "Rotring" 10%	50mL
Agua destilada	900 mL

ANEXO 3



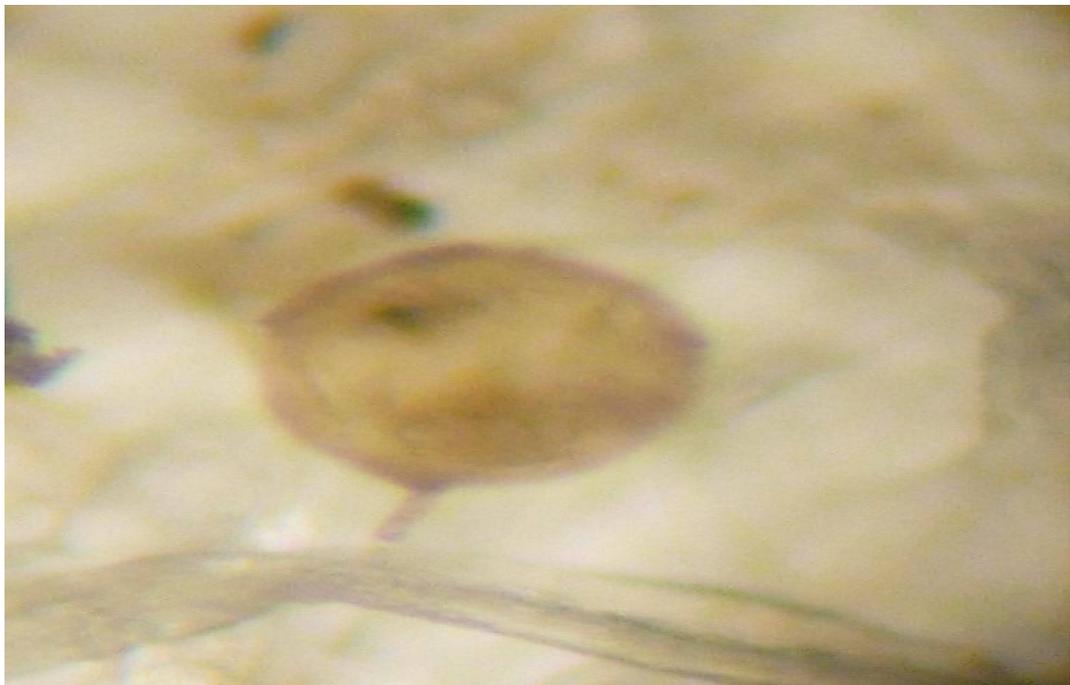
Esporas de *Glomus* sp.



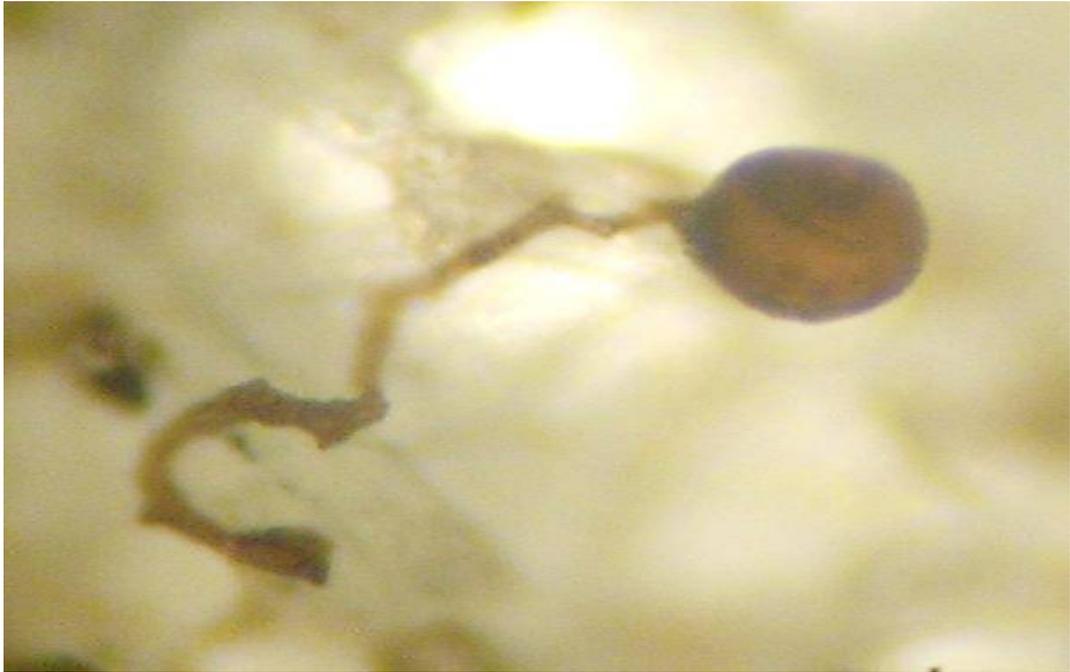
Espora de *Glomus* sp. con hifa de sustentación en forma de embudo.



Espora de *Glomus sp.* con hifa de sustentación en forma de embudo.



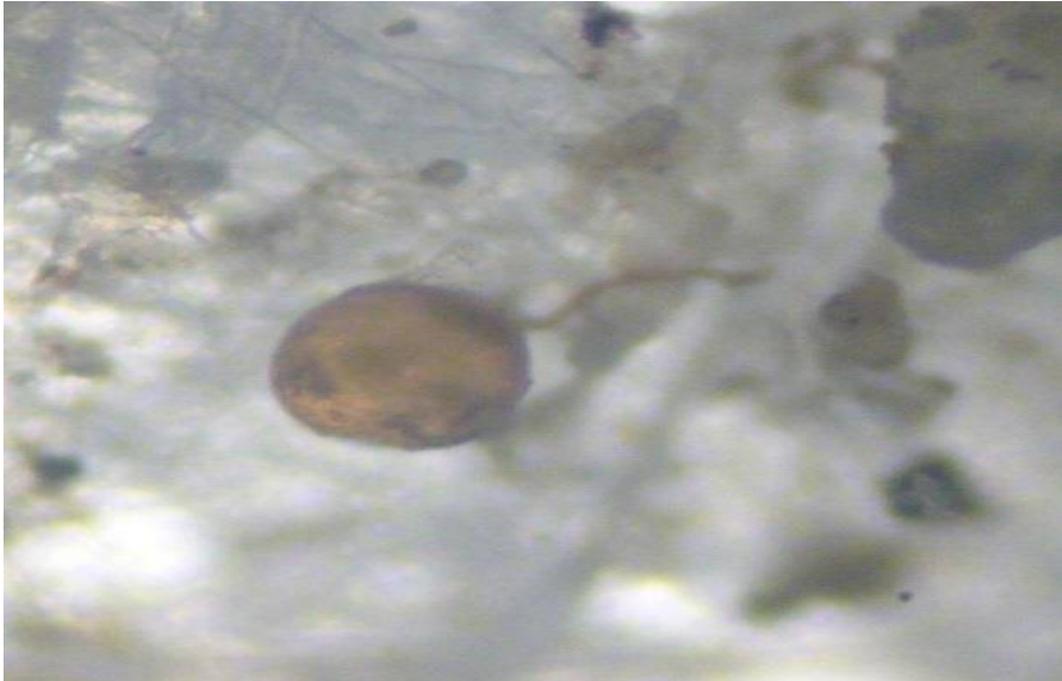
Espora de *Glomus sp.* con hifa de sustentación recta.



Espora de *Glomus sp.* con hifa de sustentación curva.



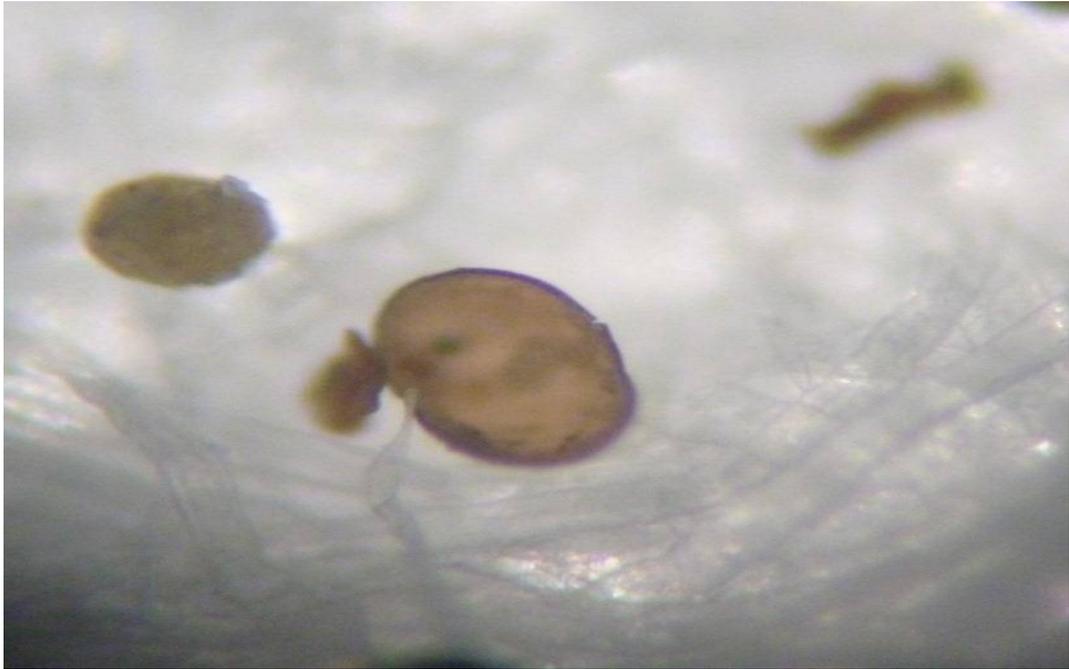
Espora de *Glomus sp.* con hifa de sustentación curva.



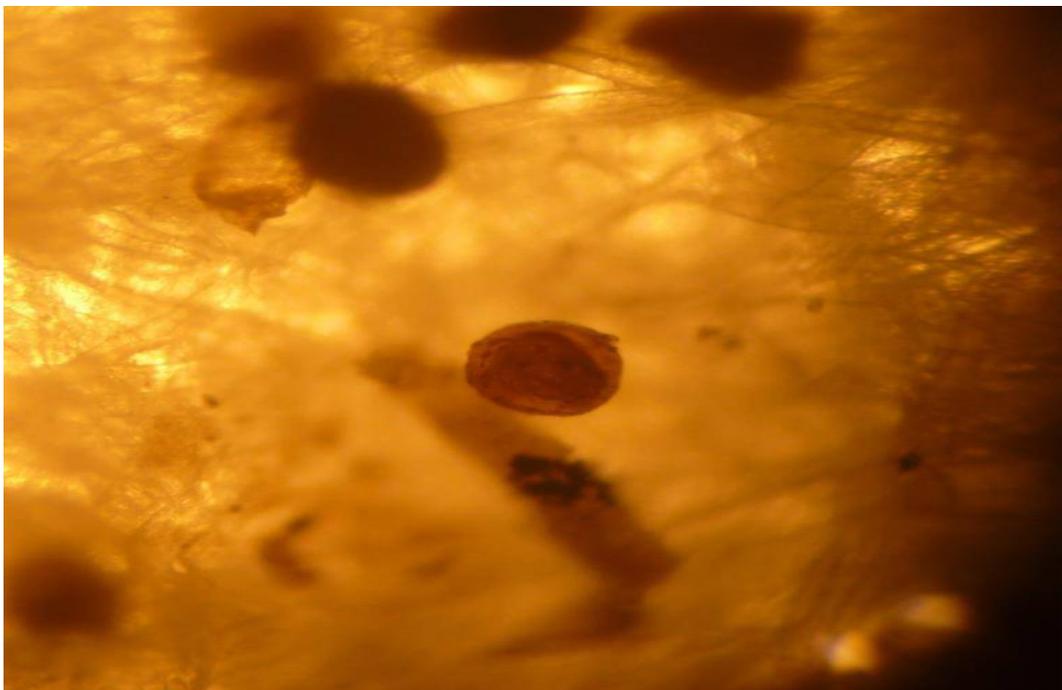
Espora de *Glomus* sp. con hifa de sustentación curva.



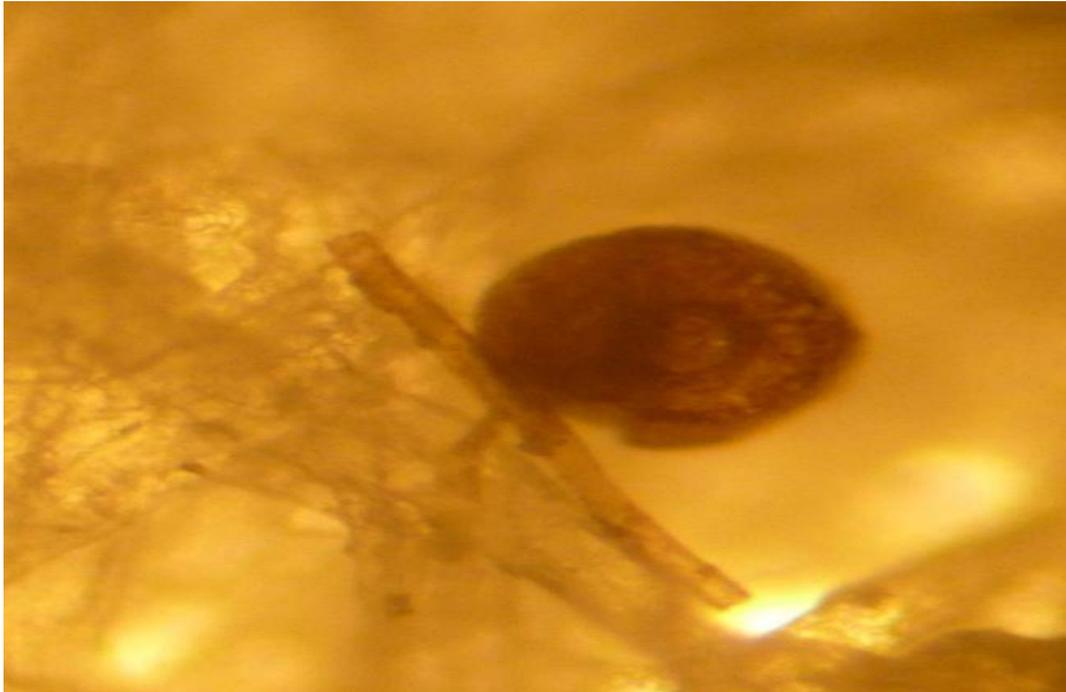
Espora de *Glomus* sp. con hifa de sustentación curva.



Espora de *Glomus* sp.



Espora de *Archaeospora* sp.



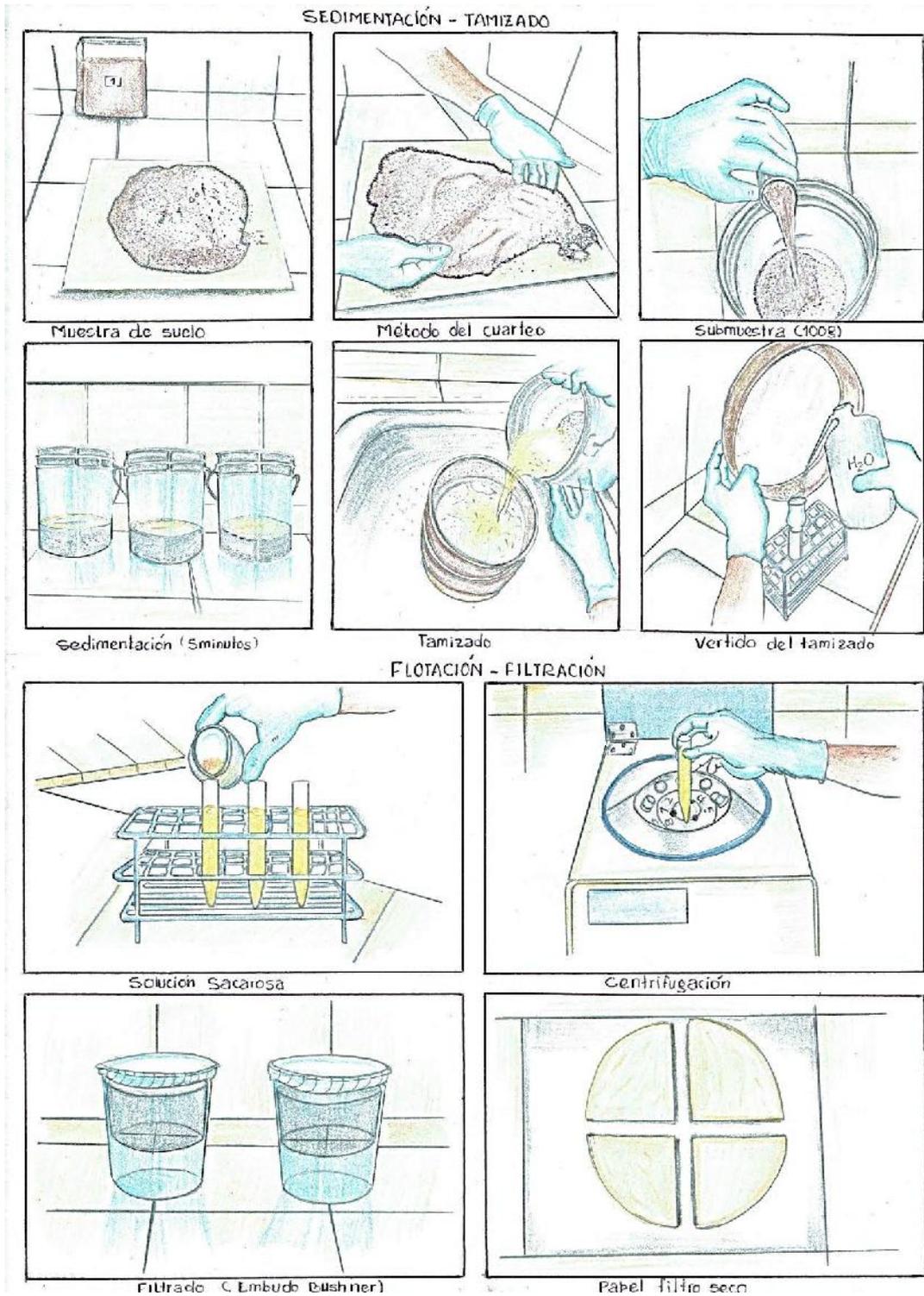
Espora de *Aculospora* sp. con hifa de sustentación sésil.



Espora de *Acaulospora* sp.

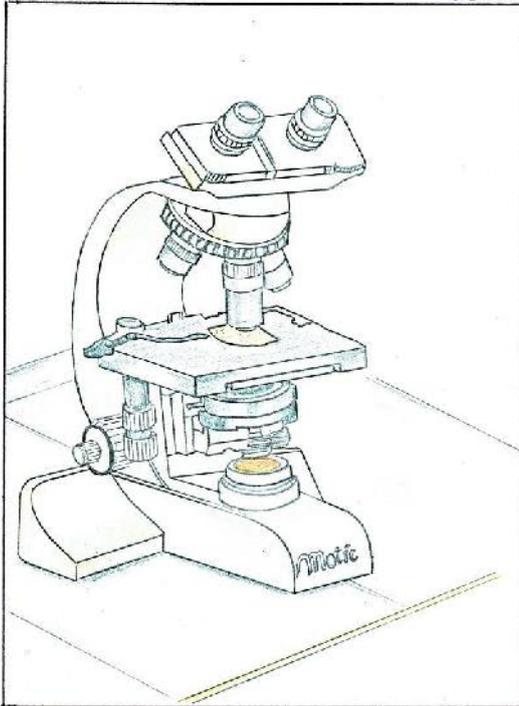
ANEXO 4

Proceso de identificación de esporas de HMA

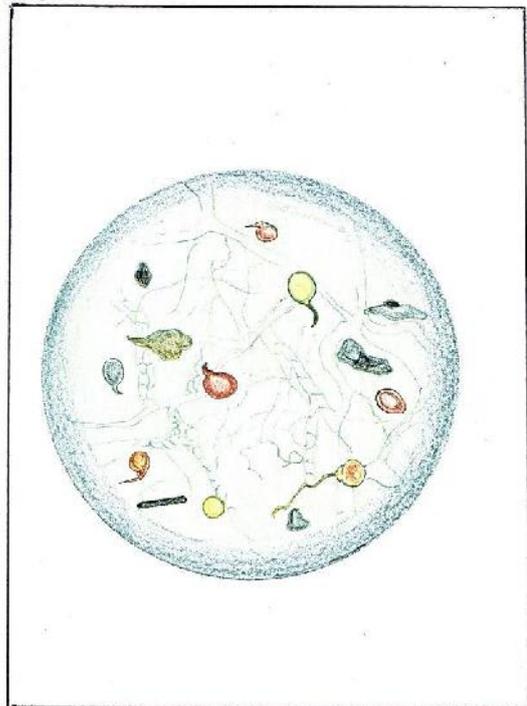


... Proceso de identificación de esporas de HMA

OBSERVACIÓN



Microscopio óptico

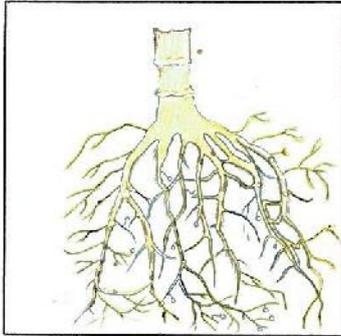


Esporas de HMA 40x

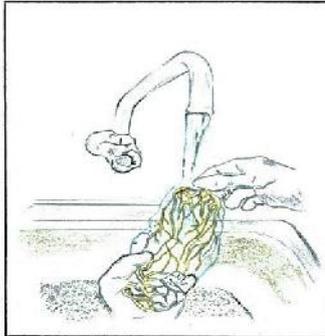
ANEXO

Proceso de tinción de raíces

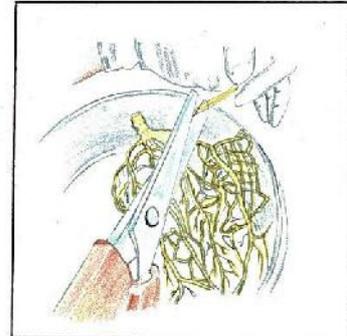
ACLAREO - DESPIGMENTACIÓN



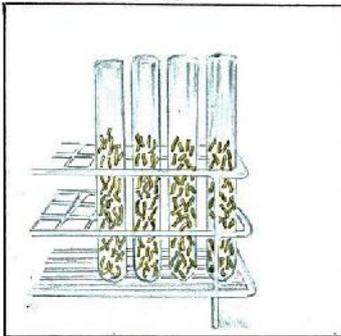
Raíz colonizada



Lavado de raíces



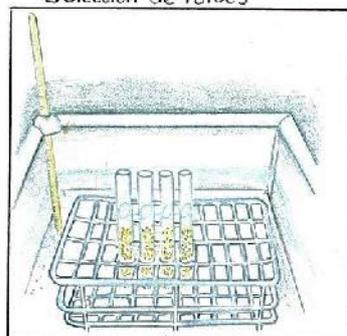
Selección de raíces



Fragmentos de raíces



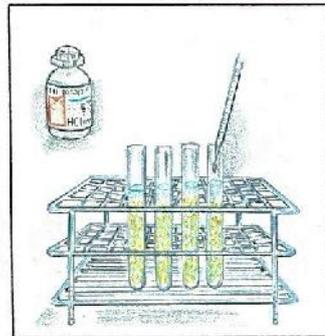
KOH (10%) - 30 mL
ACIDIFICACIÓN



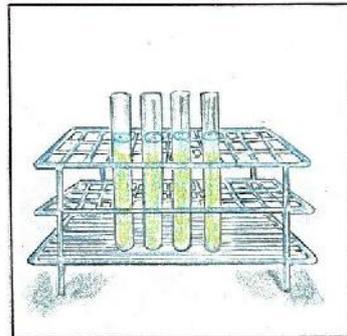
Baño maría 87°C



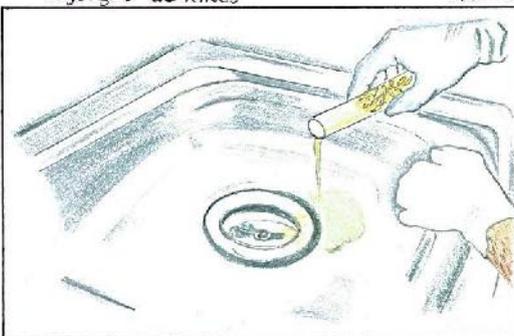
Enjuague de raíces



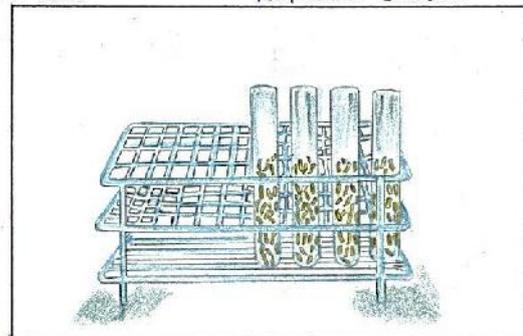
HCl (10%) - 10 mL



Temperatura ambiente



Eliminación del exceso de ácido



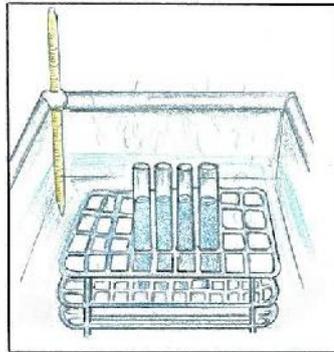
Raíces despiementadas

... Proceso de tinción de raíces

TINCIÓN



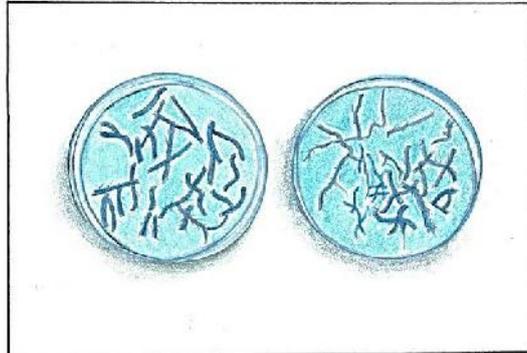
Colibrante tinta-china 10ml



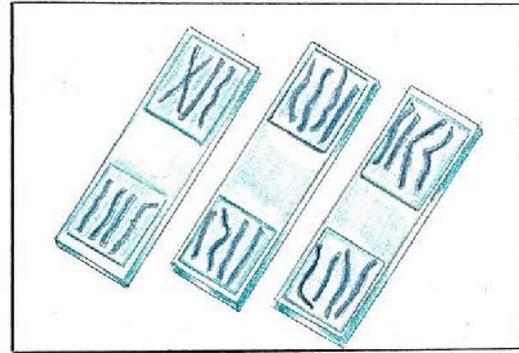
Baño maría 87°C



Lavado

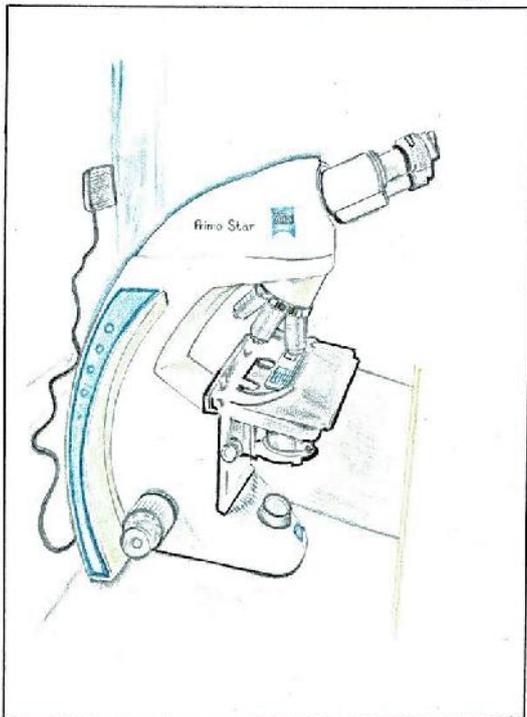


Raíces en placas petri

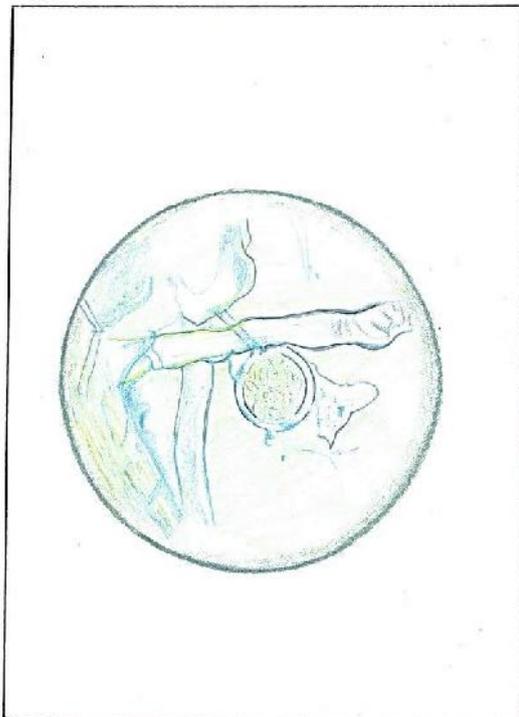


Extendido de raíces en lámina

OBSERVACIÓN



Microscopio óptico



Espora de HMA 40x