

**MICORRIZAS ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE PAPA,
MANZANO Y NOGAL, EN EL ÁREA DE INFLUENCIA
INMEDIATA DE LA UAAAN**

Víctor S. Peña Olvera¹
Indira I. de la Rosa Alvarado²

¹ Profesor investigador del Depto de Suelos de la UAAAN

² Alumno tesista de la UAAAN

RESUMEN

Con la finalidad de encontrar raíces micorrizadas, observar sus estructuras y lograr su caracterización, cultivos de papa (*Solanum tuberosura*), manzano (*Pyrus malus*) y nogal (*Carya illinoense*) fueron sometidos a muestreos en los ciclos primavera-verano y otoño-invierno de 1998, en el área de influencia inmediata a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).

Palabras clave: manzano, nogal, papa, micorriza

ABSTRACT

Potato (*Solanum tuberosum*), apple (*Pyrus malus*) and pecan (*Pyrus rnalus*) cultures were sampled in spring-summer and fall-winter cycles on 1998 at the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro's immediate area of influence, in order to find mycorrhiza associated to roots, to observe its structures, and to determine the types and characterization of the mycorrhizae found.

Key words: apple, pecan, potato, mycorrhiza.

INTRODUCCIÓN

Actividades como la ganadería, la agricultura intensiva y el uso inmoderado de fertilizantes químicos han sido los responsables de que, en sólo unas décadas, se hayan modificado substancialmente las características del suelo.

Hoy en día se propone el uso de los fertilizantes orgánicos, agricultura sustentable y algunas otras alternativas como el uso de microorganismos para mejorar la fertilidad del suelo sin fomentar su deterioro.

Existen algunas asociaciones de mutualismo o simbiosis entre ciertos microorganismos y las plantas que benefician a ambas partes de la asociación, tal es el caso de las micorrizas, que constituyen una asociación entre raíces y determinados hongos del suelo, la cual ocurre en aproximadamente el 97% de las plantas vasculares.

No es muy difícil demostrar el impacto que las micorrizas pueden tener sobre la producción de las cosechas, especialmente en los suelos con bajo nivel de nutrimentos. La importancia principal de las asociaciones micorrícicas es que permiten a las plantas aumentar la absorción mineral tanto en los suelos fértiles como en los no fértiles, principalmente en lo que respecta a la absorción de los macro y microelementos presentes en el suelo, lo que reduce, en gran medida, el uso de fertilizantes químicos, y también disminuye la incidencia del ataque de patógenos y contribuye a la formación de agregados en los suelos, lo que mejora sus propiedades físicas y disminuye, por ende, su erosión.

Por otra parte, el efecto de las MVA no solamente se restringe a campo, ya que también se ha reportado el mejoramiento de la calidad, sobrevivencia y crecimiento de las

plántulas en vivero, después de la formación de la micorriza.

Existen evidencias que sugieren que la asociación micorriza ejerce diversos efectos benéficos sobre la planta en cuanto a su crecimiento (Gerdemann 1968; Harley, 1968, 1969; Mosse 1963), entre los que se pueden citar los siguientes:

1. Mejoran la nutrición de las plantas.
2. Proporcionan estabilidad a los ecosistemas
3. Mejoran la capacidad de sobrevivencia y crecimiento de las plantas, así como la productividad de los suelos de baja fertilidad.

La finalidad de este trabajo es determinar la presencia de las micorrizas en algunos cultivos de importancia económica en el área de influencia inmediata a la UAAAN, como son los cultivos de papa, manzana y nogal, así como lograr su caracterización.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en los ciclos primavera-verano y otoño-invierno de 1998, en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Suelos de la UAAAN, y en el de Citogenética del Departamento de Fitomejoramiento de la misma institución, con el material recolectado en una serie de muestreos del sistema radical y de suelo en diferentes sitios.

Se realizaron muestreos del sistema radical y del suelo en plantas de manzano y papa en Los Llanos, El Bayonero, San Antonio de las Alazanas, Los Lirios y Jamé; de nogal

en el área denominada El Bajío, En la Universidad Autónoma Antonio Narro, en Derramadero y en General Cepeda. Los muestreos se realizaron en huertos de agricultores de las zonas mencionadas, escogidos al azar. Se realizaron tres muestreos en cada lugar; se muestrearon diez plantas por sitio, las cuales presentaban mejor desarrollo visual. Se tomó en cuenta el follaje (frondosidad), la altura, el color de hojas, etc.; no así, el número ni tamaño del fruto.

Muestreo de suelo

Las muestras se tomaron del suelo localizado en la rizosfera de las plantas (alrededor de la raíz), que fueron seleccionadas por su vigor. La muestra recolectada está integrada por la zona correspondiente a 5-10 cm de profundidad desde el nivel del suelo, aunque en las especies vegetales con raíces más profundas, el manzano y el nogal, por ejemplo, puede ser de hasta 20 cm de profundidad, dependiendo del estado de desarrollo de la planta y de las características del suelo. Para la toma de la muestra fue necesario limpiar o eliminar de la superficie los residuos orgánicos o de vegetales antes de la extracción. Posteriormente, con una pala recta, se cavó un hoyo en la porción del suelo ubicada bajo la zona de goteo y se tomó el suelo que estaba justo en torno a las “raicillas” de la planta. Las muestras se colocaron en doble bolsa: primero en bolsas de papel, luego en bolsas de polietileno, que se mantuvieron en hieleras hasta su procesamiento en el laboratorio.

Muestreo del sistema radical

Se muestrearon diez plantas por sitio en el área de crecimiento radical de cada

uno de los cultivos en cuestión; la toma de la muestra se realizó de manera conjunta con la de suelo; las raíces se extrajeron con mucha precaución, para evitar que se perdieran las “raicillas” por daño mecánico. De igual manera fueron colocadas en bolsas de papel y polietileno y trasladadas en una hielera al laboratorio.

Procesamiento de la muestra

Una vez en el laboratorio, las muestras se dividieron, para su estudio, en dos partes: las del suelo y las del sistema radical.

Las muestras de suelo se utilizaron con el propósito de obtener suspensiones de esporas, para lo cual se utilizó el método de tamizado y decantación de Gerdemann y Nicolson (1963), que consiste en utilizar una serie de tres tamices de calibres 77m, 63m y 44m., colocados uno encima del otro, de menor a mayor número de mallas, respectivamente. Se hizo una suspensión de esporas con 100g de suelo y 1000 ml de agua, aproximadamente, se agitó durante 5 min y se dejó reposar durante 3 min, con la finalidad de eliminar las partículas más grandes por sedimentación. Enseguida se hizo pasar la muestra a través de los tamices, ordenados en forma decreciente, y se lavó con agua corriente hasta que el agua que pasaba a través de cada tamiz era clara. La suspensión de esporas se obtuvo de los residuos contenidos en el último tamiz. Dichos residuos fueron transferidos a tubos de centrifuga de 40 ml con 20 ml de agua. Una vez en los tubos, se les adicionó 10 ml de una solución de glucosa al 70% (70 g de glucosa disueltos en 100 ml de agua), la cual se inyectó en el fondo del tubo, con la ayuda de una jeringa de 10 ml, en la que la aguja fue remplazada por

un tubo de plástico de 5-10 cm de longitud y un diámetro de 0.5 cm, para establecer un gradiente de concentración en los tubos de la centrífuga. Enseguida la muestra se centrifugó a 1,500-2000 rpm. durante 1.5-2 min. Durante este proceso las partículas de suelo se fueron depositando en el fondo del tubo, mientras que las esporas permanecieron sobre la superficie del gradiente de azúcar. Las esporas fueron extraídas del gradiente con la ayuda de una pipeta Pasteur y colocadas en un vial con agua destilada. Posteriormente fueron separadas y depositadas en viales, según su morfología y color, para proceder a su caracterización con la ayuda de claves sinópticas y pictóricas.

Las muestras del sistema radical se dividieron a su vez en dos partes. Una parte se sometió a tinción y otra se utilizó para hacer cortes histológicos.

En el proceso de tinción se utilizó la técnica de Phillips y Hayman (1970), con ligeras modificaciones, la cual consta de los siguientes pasos: 1. clareo, 2. blanqueo, 3. acidificación, 4. tinción y 5. decoloración.

A esta técnica se le hicieron algunas modificaciones dependiendo del tipo de raíz que se estuviera manejando; así, para las raíces de los frutales como el nogal y manzano en el que las raíces son más gruesas y más pigmentadas, se aumentó la concentración del KOH de 10 al 15% y el tiempo de clareo bajo presión de 10 a 15 minutos, mientras que el de tinción se disminuyó a 8. En el caso de las raíces de papa, se utilizaron las soluciones originales, pero el tiempo de tinción también se redujo a 8 minutos.

Una vez terminada la tinción, las raíces clareadas y teñidas se fijaron en un portaobjetos para realizar la observación de las estructuras a través del microscopio. Para esto, con la ayuda de una aguja de disección se tomaron fragmentos de raíces de

aproximadamente 1 cm, y se colocaron sobre el portaobjetos con una gota de lactoglicerol y se taparon con un cubreobjetos. Las observaciones se realizaron en 10X y 40X. De cada laminilla se eliminaron las burbujas de aire y se sellaron con esmalte.

Cortes histológicos

La otra parte del material radical se incluyó en parafina, con la finalidad de preparar cortes histológicos en microtomo y obtener fotografías de las raíces micorrizadas en cortes longitudinales. Esta técnica de inclusión consiste en los siguientes pasos: 1. fijación, 2. deshidratación, 3. infiltración e inclusión en parafina, 4. corte en microtomo, 5. fijación de los cortes en portaobjetos y 6. coloración.

Fijación. El propósito de la fijación es “matar y conservar” los tejidos con un mínimo de alteraciones. Para esto, se utilizó el fijador FAA cuya fórmula es 10% de formaldehído, 35% de agua, 5% de ácido acético y 50% de alcohol etílico. El tiempo que permanecieron las raíces en esta solución fijadora fue de 24 h, a temperatura ambiente.

Deshidratación. Su finalidad es quitar el agua de los tejidos fijados y endurecidos. Este procedimiento consistió en pasar las raíces por diferentes agentes deshidratantes, de mayor a menor concentración. Esto se realizó en intervalos de una hora, con una serie de soluciones de alcohol etílico al 50, 60, 70, 85 y 96 por ciento más eosina; se continuó con alcohol etílico absoluto I, alcohol etílico absoluto II, alcohol etílico absoluto más xilol a razón de 3:1, alcohol etílico absoluto más xilol en una solución 1:1, y

alcohol etílico absoluto más xilol en proporción 1:3. Finalmente se pasaron las raíces en xilol puro, para dejarlas listas para la infiltración.

Infiltración e inclusión. Para el proceso de la infiltración e inclusión en la parafina, primero se colocaron las raíces en frascos (un frasco por cada muestra que se iba a incluir) que contenían hasta la mitad de su capacidad de xilol, a los cuales se les agregaron periódicamente pequeñas cantidades de parafina en escamas. Posteriormente se taparon y se metieron a la estufa a 30°C y se les agregaba parafina conforme se iba disolviendo; los frascos se dejaron a esa misma temperatura durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se elevó la temperatura de la estufa a 45°C y se agregó parafina hasta saturar el xilol, luego se elevó nuevamente la temperatura a 55°C y se esperó a que la parafina se licuara. Una vez disuelta, se decantó la mezcla xilol y parafina de los frascos que contenían las raíces, para agregar únicamente parafina pura.

Para realizar la inclusión del tejido se utilizaron moldes de papel aluminio de 5 X 12 X 2.5 cm. Para hacer los bloques de parafina con la inclusión de la raíz, se yació la muestra con parafina en el molde hasta quedar casi lleno, luego, con la aguja de disección caliente, se orientó el material de tal forma que quedara acomodado para poder hacer los cortes de forma longitudinal, no olvidando dejar el margen inferior más grueso que el superior. Para evitar que la parafina solidificara, se realizaron todas estas maniobras con el calor de un mechero guiado por un popote metálico. Cada molde fue etiquetado en el extremo superior izquierdo. Después se dejaron solidificar para posteriormente poder retirar los moldes de papel aluminio.

Corte en microtomo. Se removió cuidadosamente el bloque de parafina, con el material, del molde de papel aluminio. Con la ayuda de una navaja se realizaron cortes del bloque con las raíces, de tal forma que se retirara todo el exceso de parafina, posteriormente se montó el pedazo, ya resacado, sobre la platina del microtomo. Para montarlo se calentó la platina y la base del corte de parafina para poder unir ambos lados, después se dejó enfriar. luego se colocó la platina en el microtomo, de tal manera que la cuchilla quedara paralela al corte. Posteriormente se realizaron los cortes a 15u.

Fijación de los cortes en portaobjetos. Los portaobjetos se pusieron a desengrasar en alcohol etílico durante 10 min; posteriormente se secaron y se untaron uniformemente con adhesivo de Hampt (un g de gelatina, 15 ml de glicerina y dos g de metabisulfito de sodio por cada 100 ml de agua destilada); sobre éste se aplicó una gota de formalina y se le colocaron de tres a cuatro cortes. Posteriormente se retiró el exceso de adhesivo del portaobjetos con un lienzo y se pasó suavemente por la flama del mechero con la finalidad de que el tejido se extendiera y se fijara totalmente. Esto se hizo cuidadosamente considerando que el calor no derritiera la parafina. La preparación fue pasada varias veces por la flama hasta lograr que el exceso de formalina se removiera y el tejido quedara bien extendido. Después con una aguja de disección se cercioró de que los cortes ya no se movieran.

Coloración. Para la coloración se preparó una serie de alcoholes y xiloles en frascos de Coplin con capacidad para ocho preparaciones cada uno. Las preparaciones

fueron colocadas de tal forma que el tejido quedara orientado del lado derecho, con el objeto de identificar la preparación y no maltratarla o deshacerla. Con la ayuda de unas pinzas de disección se fueron pasando las laminillas de una en una por los reactivos, empezando con una serie de tres xiloles (desparafinador), Xilol I, Xilol II y Xilol III, por un periodo de 10 min, respectivamente. Acto seguido se pasaron por una serie de alcoholes, empezando con alcohol etílico absoluto I y alcohol etílico absoluto II, después alcohol etílico al 96, 85, 70, 60 y 50 por ciento, respectivamente, por un lapso de 3-5 min. cada uno. El siguiente paso fue enjuagar las preparaciones haciéndolas pasar por agua destilada. Posteriormente pasaron al primer colorante que fue safranina, en solución acuosa al 1%, durante 30 min. Una vez cumplido este tiempo, las preparaciones se pasaron nuevamente por agua, para enjuagarlas, usando para ello agua corriente, primero, y agua destilada, después; luego volvieron a pasar por otra serie de alcoholes, pero ahora de manera inversa, es decir, empezando en alcohol de 50, 60, 70, 85 y 96 por ciento por tiempos de 3-5 min cada uno, para seguir con el segundo colorante, que fue verde rápido preparado en etanol al 0.5%, por espacio de 5 seg. A continuación se enjuagaron las preparaciones en alcohol etílico al 96%, que pasaron después por alcohol absoluto I, alcohol absoluto II de 3-5 min., y enseguida por una solución saturada de carbol xilol, también durante 5 mm, la cual se utilizó como diferenciador, para finalmente pasar por otra serie de xiloles, xilol I, xilol II y xilol III. Por último, se sacó la preparación del xilol, se escurrió e inmediatamente después se colocó una gota de bálsamo de Canadá sobre los tejidos ya coloreados y se cubrieron con un cubreobjetos. El exceso del bálsamo se retiró con una toalla de papel y se dejó secar a temperatura ambiente. Los tejidos se observaron al microscopio a 10X, 40X y 100X y se les tomaron microfotografías.

Caracterización de las micorrizas (MVA)

La caracterización de las micorrizas se hizo de acuerdo a la morfología de sus esporas, para lo cual se utilizaron las claves de la taxonomía de Gerdeman y Trappe (1993) así como también una serie de claves pictóricas y descripciones de Glomales, la cual consta de una recopilación de varios autores en la página de Internet: <http://www.mycorrhizainformationexchange.html>.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se organizaron como se presentan a continuación:

Papa

Número de muestreos por sitio: 3

Número de muestras por sitio: 10

Sitio 1: El Bayonero

Sitio 2: Los llanos

Sitio 3: San Antonio de las Alazanas

Nº de Muestreo	Sitio 1 Plantas Micorrizadas	Sitio 2 Plantas Micorrizadas	Sitio 3 Plantas Micorrizadas
1	9	8	9
2	9	9	9
3	8	9	10

Manzano

Número de muestreos por sitio: 3

Número de muestras por sitio: 10

Sitio 1: San Antonio de las Alazanas

Sitio 2: Los Lirios

Sitio 3: Jamé

Nº de Muestreo	Sitio 1 Plantas Micorrizadas	Sitio 2 Plantas Micorrizadas	Sitio 3 Plantas Micorrizadas
1	9	8	9
2	9	9	9
3	8	9	10

Nogal

Número de muestreos por sitio: 3

Número de muestras por sitio: 10

Sitio 1: UAAAN

Sitio 2: Derramadero

Sitio 3: Gral. Cepeda

Nº de Muestreo	Sitio 1 Plantas Micorrizadas	Sitio 2 Plantas Micorrizadas	Sitio 3 Plantas Micorrizadas
1	8	9	9
2	9	10	10
3	9	9	9

De acuerdo con los datos obtenidos, se encontró que el 88.8% de las plantas de papa que se muestrearon están micorrizadas; el 93.3% de las de manzano, y el 91.1% de las de nogal. Por lo que, en promedio, el 91% de las plantas que se muestrearon

presentan la asociación micorrícica. Cabe mencionar que el tipo de micorrizas encontradas en todos los cultivos fueron del tipo vesículo-arbuscular.

De las micorrizas encontradas se tomaron algunas microfotografías que se presentan a continuación:

A partir de las observaciones microscópicas de las laminillas y de las esporas, se hizo la caracterización de los hongos micorrícicos con base a las claves taxonómicas (Gerdeman y Trappe, 1993) y a las claves taxonómicas pictóricas (página del Internet, ver materiales y métodos); se encontraron esporas y esporocarpos de dos géneros de micorrizas, *Sclerocystis* y *Glomus*.

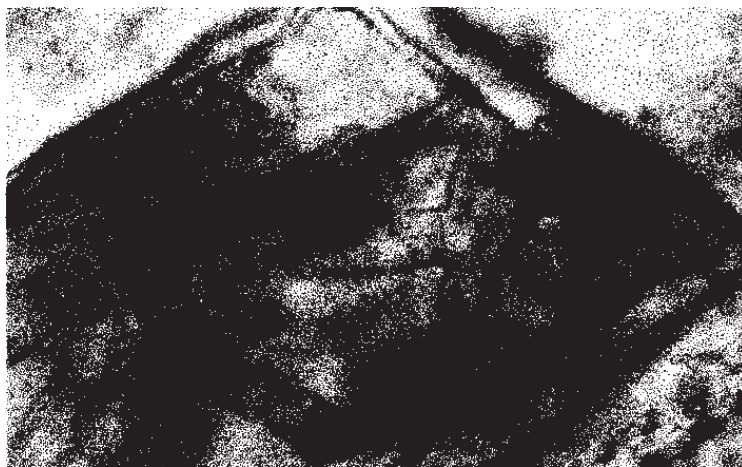


Figura 1. Microfotografía tomada a 100X del micelio de una endomicorriza de papa dentro de una célula, teñida con azul de tripano.

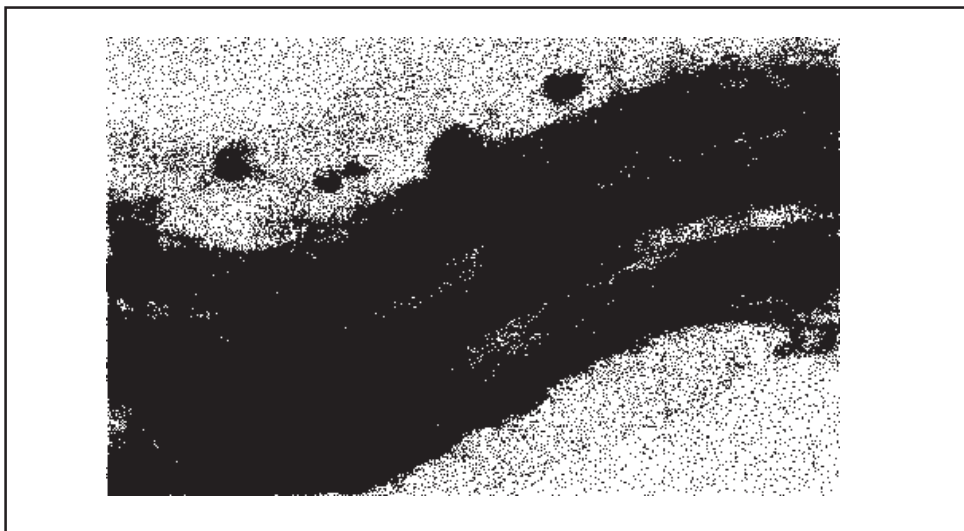


Figura 2. Microfotografía tomada a 10X de una micorriza VA en manzano con la misma tinción que la anterior. Se observan hifas y vesículas.

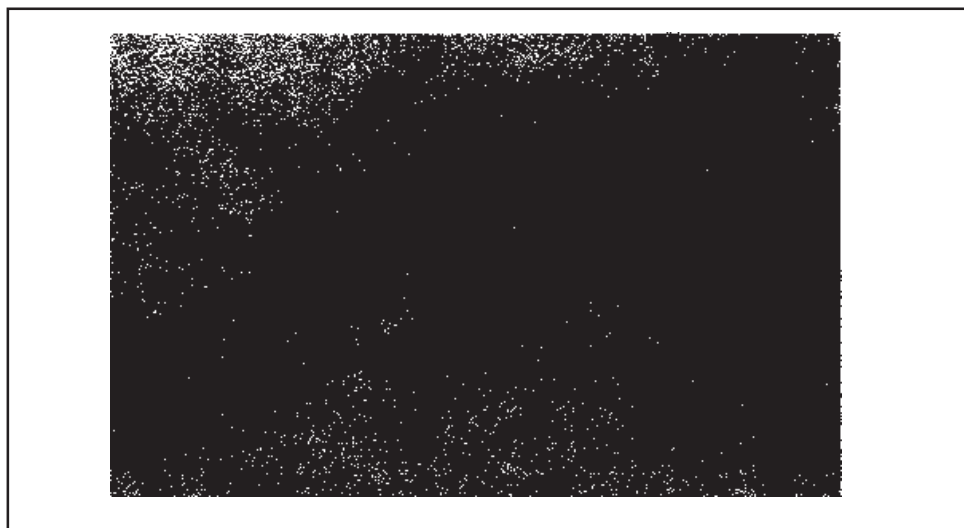


Figura 3. Tomada a 40X de una raíz de nogal micorrizada, teñida con azul de tripano. Se aprecian el micelio del hongo dentro de la raíz.

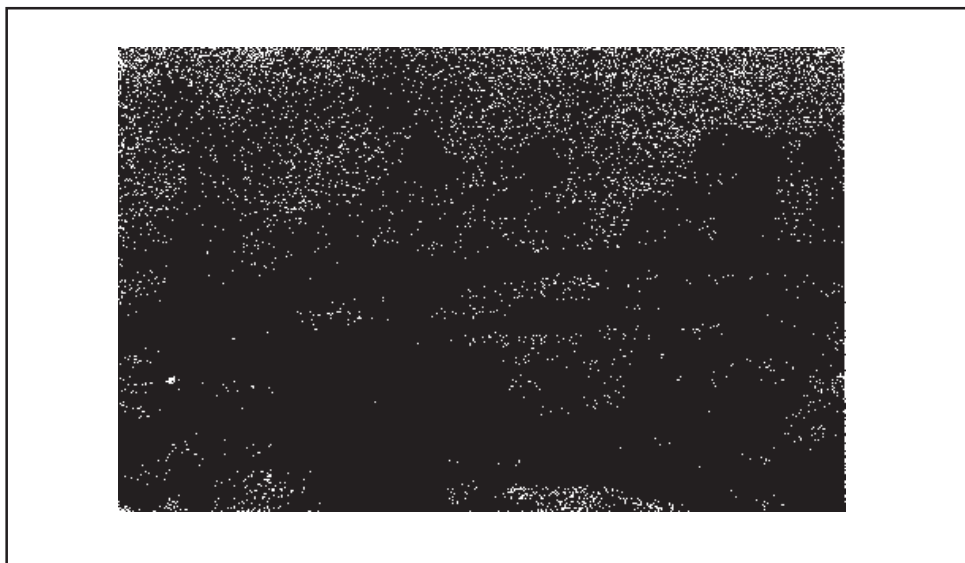


Figura 4. Tomada a 40X de un corte en microtomo a 15 u de una micorriza VA. Se observan los puntos de entrada del hongo y arbuscúlos.

Se hizo la caracterización de los hongos micorrícicos de cada cultivo por separado. Se detectó la presencia de *Glomus* y *Sclerocystis* en manzano (*Pyrus malus*), de *Glomus* en nogal (*Carya illinoense*), y de *Scierocystis* en papa (*Solanum tuberosum*).

Cabe señalar que, no obstante, el cultivo de papa presentó el número más bajo de plantas micorrizadas, el porcentaje sigue siendo alto tomando en cuenta que el cultivo es de ciclo anual, en comparación de los frutales cuya raíz permanece en el suelo durante períodos más largos. Este patrón de crecimiento probablemente pueda explicar el número más bajo de plantas micorrizadas en papa con respecto del nogal.

El cultivo del manzano fue el que presentó mayor número de plantas micorrizadas, probablemente debido a que en este cultivo se encontró la presencia de los dos géneros

fúngicos. Esto contrasta con el porcentaje de plantas micorrizadas en papa y nogal en las cuales sólo se detectó un género en cada uno.

CONCLUSIONES

-Existen microorganismos asociados a las raíces de las plantas, conocidos como micorrizas, en los cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), nogal (*Carya illinoense*) y manzano (*Pyrus malus*) en el área de influencia citada en el trabajo.

-Las micorrizas encontradas corresponden a los géneros de *Glomus* y *Sclerocystis*.

-Este trabajo es sólo el inicio de una línea de investigación sobre el tema. Con los datos obtenidos se puede proseguir con trabajos con el aislamiento y propagación del inóculo inicial y una serie de tratamientos, buscando los efectos sobre la reducción de la fertilización fosfórica, ya que se cita que el fósforo es el elemento que mejor toman las plantas micorrizadas.

LITERATURA CITADA

Abbott, L.K, et al. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas.

Agr. Ecosys. Environ 35:121-150. (1991)

Ferrara, C.R. Manual de Agromicrobiología. Tril1as. México 1993 142 p.

Gerdeman, J. W y J.M Trappe. 1993. The taxonomy of the endogonaceae. Mycologia 2 pp 36-51.

- Gianinazzi, S. Vesicular-arbuscular (endo) mycorrhizas: Cellular, bioquimical and genetics aspects. *Agr. Ecosys. Environ* 35:105—119 (1991)
- Mosse, B. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiological Plant Pathology* 5:215-223 (1995)
- Nicolson, T.H. Vesicular-arbuscular mycorrhiza a universal plant simbiosis. *Sci. Prog. Oxf* 55:561—568 (1997).
- Phillips J., and D. Hayman. 1970. Improved procedures for Clearing Roots and Staining Parasitic and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Assesment of Infection. *Trans. Brt. Mycol. Soc.* 55 pp 158-162.