



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de producción agrícola y animal

Licenciatura en agronomía

Informe de conclusión

Nombre del proyecto:

Propuesta de una técnica de campo para la identificación de micorrizas

Modalidad:

Actividades relacionadas con la profesión

Alumna: García García Osiris

Matrícula: 2183028651

Asesora: Dra. Mariela Hada Fuentes Ponce

No. Económico: 34017

Firma:  _____

Índice

| | |
|---|----|
| Introducción..... | 3 |
| Justificación..... | 3 |
| Aporte a la sociedad..... | 4 |
| Marco teórico..... | 5 |
| Hongos Micorrízicos arbusculares | 5 |
| Tipos de micorrizas | 5 |
| Simbiosis | 6 |
| Uso agrícola | 7 |
| Las micorrizas como indicadores de calidad..... | 8 |
| Técnica formal de referencia para identificación de micorrizas | 9 |
| Objetivo general..... | 9 |
| Metodología..... | 9 |
| Actividades realizadas..... | 9 |
| Resultados | 11 |
| Técnica definitiva para la identificación de micorrizas en campo..... | 12 |
| Discusión..... | 17 |
| Conclusión..... | 18 |
| Bibliografía | 18 |

Introducción

El presente trabajo se centró en la búsqueda y estandarización de una técnica para la identificación de micorrizas en cultivos de interés agronómico, que sea accesible para todos y en condiciones de campo. Dicha técnica hará uso de productos adquiridos de manera fácil, económicos, procurando la menor contaminación.

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) es una asociación endosimbiótica que se encuentra en casi todas las plantas, los hongos que participan en esta “relación” son simbioses obligados y pertenecen al reino Glomeromycota (Ramos et al, 2011). Generan diversas ventajas que se pueden aprovechar con la finalidad de fertilizar el suelo y mejorar la absorción de nutrientes por las plantas, además de encontrarse en casi todos los suelos, no generan un impacto ambiental por ser biodegradables y presenta la capacidad de extraer y solubilizar el fósforo del suelo, convirtiéndolo en formas asimilables para las plantas (Liang et al. 2021). Coadyuva al crecimiento y desarrollo de las plantas ante el estrés al aumentar el rango de exploración de raíces para absorber nutrientes y agua. Este sistema de mejoramiento de suelo conserva la diversidad microbiana de los suelos, la cual mantiene el equilibrio, salud y productividad del sistema (Martínez, 2015).

Actualmente, con la creciente de demanda en alimentos, recursos naturales y la búsqueda de nuevas formas de producir más y en menor tiempo, y sumando la escasez de alimentos provocados por fenómenos naturales, sociales como son las guerras o conflictos políticos (Saldívar, 2023), es importante hallar una forma sustentable y accesible de producir alimento, por lo que el medir la calidad del suelo y saber los recursos con los que contamos es de suma importancia, en este caso las micorrizas pueden ser un gran aliado para acceder a todos los nutrientes disponibles del suelo para los cultivos. De igual manera significando una reducción del uso de fertilizantes.

Toda persona con el interés de generar una mejora en sus cultivos y utilizar de la mejor manera los recursos de los que puede disponer, así como monitorear la calidad del sistema agrícola, puede hacer uso de la técnica que se presenta en este trabajo, debido a su bajo costo y facilidad metodológica, de igual manera para conocer la calidad de sus suelos dedicados a la agricultura.

Justificación

En la actualidad con el creciente aumento de población, el aumento del precio de los fertilizantes, y una menor accesibilidad al agua, genera una mayor demanda

para la producción agrícola en alimentos y productos de origen vegetal, por lo tanto, se buscan nuevas formas de producir más con menos. Por lo que las micorrizas juegan un papel de suma importancia, ya que representan un beneficio para el desarrollo de los cultivos, pero también son indicadoras de la calidad del suelo, por ello medirlas en el tiempo sirven para monitorear como un sistema va cambiando acorde a las prácticas que se van realizando y así designar las mejores prácticas agrícolas para una producción viable y hasta reduciendo costo por el menor uso de fertilizantes.

El conocer, utilizar y desarrollar nuevas técnicas de identificación de micorrizas que sean accesibles para los agricultores y pueda aplicarse en campo, representa una estrategia para medir la calidad del suelo acorde al manejo agrícola y en base a esto tomar decisiones en beneficio al cultivo. Se busca el uso de reactivos y técnicas más accesibles para el agricultor, menos nocivas para el medio ambiente y con un costo menor. Todo bajo un análisis científico y con la debida experimentación.

Es importante medir los HMA, debido a que son fundamentales para el ciclo de los ecosistemas, además de promover un reciclaje eficiente de energía, lo cual influye en el mantenimiento de la diversidad vegetal porque evita la competencia por recursos.

Aporte a la sociedad

El uso de micorrizas es una alternativa positiva y orgánica de proporcionar los nutrientes necesarios a nuestros cultivos. Así que el desarrollo de una técnica sencilla para la identificación de micorrizas en campo abre nuevas posibilidades para medir la calidad de su sistema agrícola, que cualquier persona con interés pueda aplicarlo donde sea y cuando sea sin necesidad de un laboratorio en cualquier cultivo. Además, cabe resaltar que, al cambiarse los reactivos usuales por reactivos con mayor accesibilidad de compra facilita aún más su elaboración.

El uso adecuado de HMA es muy importante, ya que trae consigo ventajas muy importantes como la reducción del uso de fertilizantes sintéticos, estas asociaciones simbióticas reducen la necesidad de aplicar fertilizantes fosfatados sintéticos, ya que permiten aprovechar al máximo el fósforo presente naturalmente en el suelo. Debido a su capacidad para aumentar la disponibilidad de fósforo en el suelo, el cual es un nutriente esencial para las plantas, pero a menudo se encuentra en formas insolubles en el suelo, lo que dificulta su absorción por parte de las raíces (Liang et al. 2021).

Por otro lado, es importante resaltar los daños que se originan en el medio ambiente por el uso de fertilizantes sintéticos. Estos productos químicos contienen altas concentraciones de nutrientes, como nitrógeno y fósforo, que son distribuidos en el

suelo durante la aplicación. Pero una gran parte de estos no son absorbidos en su totalidad y se convierten en contaminantes. Según un informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2018), los fertilizantes sintéticos contribuyen a la eutrofización de cuerpos de agua, reduciendo el oxígeno presente. Además, los fertilizantes sintéticos también pueden dañar la estructura del suelo y reducir su capacidad para retener agua. Chen et al. (2019) menciona que el uso excesivo de fertilizantes puede alterar la composición microbiológica del suelo, disminuyendo así su calidad y fertilidad. Por otro lado, un estudio realizado por Galloway et al. (2013), los fertilizantes nitrogenados sintéticos también contribuyen a la emisión de gases de efecto invernadero, como el óxido nitroso, que tiene un potencial de calentamiento global mucho mayor que el dióxido de carbono. Al conocer las micorrizas que se encuentran en nuestro suelo del cultivo, se abren nuevas posibilidades de manejos para mejorar, aprovechar y optimizar las condiciones que propicien el desarrollo de las HMA, significando una reducción del uso de fertilizantes.

Marco teórico

Hongos micorrízicos arbusculares

Las micorrizas provienen del griego *myces*, hongo y *rhiza*, raíz, estas representan una asociación entre las raíces de las plantas y los hongos micorrízicos arbusculares, donde existe un mutuo beneficio y ventajas, mejorando la producción agrícola y utilizando con mayor eficiencia los recursos disponibles. Se trata de simbioses obligados, que pertenecen al reino Glomeromycota. Estas pueden presentarse de tres formas diferentes: ectomicorriza, ectendomicorriza y endomicorriza. Siendo este último el más abundante en la vegetación (Ramos et al., 2011). Los hongos son estrictamente dependientes de la planta, aportando agua y nutrientes, entre algunos beneficios, a cambio de azúcares derivados de la fotosíntesis. La simbiosis micorrízica ha sido una resolución y adaptación de la naturaleza dada durante mucho tiempo para perdurar y perpetuarse en diferentes entornos (Martínez, 2015).

Tipos de micorrizas

Endomicorrizas: se introducen las hifas de estos hongos dentro de las células de las raíces de la planta. Formando arbusculos, en estas estructuras se lleva a cabo el intercambio de sustancias nutritivas por carbono, entre el hongo y la raíz (Symborg, 2023).

Ectomicorrizas: se establece una especie de manto con sus hifas (filamentos microscópicos, ramificados o no, que forman el cuerpo del hongo, el micelio) alrededor de las raíces más delgadas de la planta, sin penetrar en sus células. Se

ubican y se desarrollan en las cavidades intercelulares de la corteza de las raíces (López y Barceló, 2010).

Ectendomicorrizas: Los hongos que las producen colonizan de forma dual las raíces, esto quiere decir, que vamos a encontrar de manera externa que forman un manto cortical y de forma interna penetran intracelularmente en el córtex (López y Barceló, 2010).

Simbiosis

La interacción de las plantas con los hongos micorrícicos es provocada por distintas señales bioquímicas que son específicas para ello, se encuentran presente en todas las fases del desarrollo de la simbiosis del hongo, realizando tareas tales como, reconocimiento, colonización y el intercambio de nutrientes (Bonfante, 2019). El ciclo de vida de los HMA consta de diferentes facetas, en las cuales la etapa de reconocimiento, señalización y comunicación entre la planta y el hongo y el proceso completo de colonización; es estrictamente con la presencia de una planta hospedante, en cambio la parte de la germinación de las esporas y el crecimiento inicial de las hifas no es necesario de la presencia de una planta para que lleven a cabo su función (Nazareno et al., 2020).

Las plantas que no cuentan micorrizas envían señales bioquímicas al hongo para establecer una simbiosis, es más probable que esta envíe una señal si la planta está creciendo en un ambiente que carece de fósforo, de igual manera si se encuentra bajo mucho estrés hídrico o con deficiencia de algún otro nutriente. Lo anterior abarca parte de la fase presimbótica o asimbiótica, aquí existen diferentes señales bioquímicas, las cuales están enlazadas con compuestos volátiles formando parte de los exudados de las raíces, como el CO₂. Intervienen factores como el entorno rizosférico, la presencia de microorganismos del suelo, el contenido de flavonoides, que pueden inducir la germinación de las esporas. Dependiendo de los exudados de la raíz se puede ver afectado el grado de ramificación de las hifas sobre la raíz, y a estas a su vez son importantes en las interacciones que implican a la planta y los microorganismos en la rizósfera (Karin et al., 2013).

Cuando la espora de un hongo germina, se comienza a ramificar en distintas direcciones la hifa germinal, con el propósito de aumentar las posibilidades y encontrar una raíz con la cual establecer simbiosis. Sin hospedante, la espora germinada tiene un periodo de vida de 20 a 30 días de acuerdo al entorno en el que se encuentre (Nazareno et al., 2020).

Los flavonoides (naringenina, quercitina, apigenina y las isoflavonas entre otros) inician y estimulan la interacción de las células en las primeras fases de la simbiosis

del hongo con la planta. Al desarrollarse el micelio presimbiótico se inicia la colonización de las raíces por parte del hongo, teniendo una respuesta inicial hacia las estrigolactonas (ES), en la cual empieza una actividad mitocondrial muy intensa y aumento de respiración para la ramificación de hifas (Nazareno et al., 2020).

Es de suma importancia el estímulo que se le da a las ES para la producción de los factores “Myc” y la activación de la expresión de genes ENDO11. De igual manera participan receptores DMI2/SYMRK y factores Nod para la simbiosis del hongo-planta.

Al momento de encontrarse la planta y el hongo se finaliza la interacción presimbiótica, esto ocurre cuando el extremo o ápice de la hifa alcanza una parte de la raíz. La planta logra localizar las células en las que la hifa hizo contacto por la activación de la expresión de algunos genes por parte de los HMA, posteriormente se comienza con la formación del apesorio y la penetración de la hifa en las células de la planta. Las hifas son intracelulares, hay enrollamientos y formación de arbusculos esto dando paso a la colonización de las raíces. Estos últimos son las estructuras principales donde se realizará el intercambio de nutrientes, tienen una vida útil de 4 a 7 días. Existen otras estructuras como las vesículas, se utilizan como almacenamiento de reserva, por lo general contienen lípidos en su interior, son de forma ovoide (Nazareno et al., 2020).

Posteriormente las hifas exploradoras comienzan a extenderse en el entorno en distintas direcciones, dando lugar a estructuras ramificadas de absorción (ERA), las cuales son semejantes a los arbusculos intrarradicales. Su función es incrementar el volumen explorado por las hifas, lo que le facilita a la planta la captación de sustancias nutritivas y agua del suelo (Nazareno et al., 2020).

Uso agrícola

Se ha observado que las plantas asociadas a hongos micorrízicos tienen algunas ventajas como: mayor captación de nutrientes, porque mejoran la absorción de macro y micro elementos; por lo que tienen una mayor protección contra patógenos o contra la falta o exceso de agua; mayor resistencia a metales pesados y contaminantes ambientales, mejor crecimiento y reproducción debido al aumento en la absorción de P, es el principal beneficio que obtiene del hongo. Mejoran la adquisición de nitrógeno a través de efectos indirectos, mayor eficiencia del uso del agua, aumento de la producción de clorofila, estabilización de lípidos en la membrana, incrementa la translocación de fotoasimilados, mejorar la conductancia estomática, el intercambio gaseoso y conductividad hidráulica de las raíces (Nazareno et al., 2020).

Desde el punto de vista ecológico, los HMA son necesarios para el ciclo de los ecosistemas, evita la competencia por recursos, son biodegradables y se encuentran de manera natural en los suelos. Viéndolo desde lo económico, las plantas al asociarse con estos hongos, obtienen mejoras para un establecimiento exitoso, supervivencia a un mayor nivel y aumento en la producción, por lo que hay menos bajas de plantas productivas, siendo un ahorro para el agricultor, y ayudando a cumplir con los requerimientos que se exigen de producción. Es muy importante para tener una agricultura sustentable en el campo (Ramos et al., 2011).

Las investigaciones hechas por el INIFAP sobre el uso de HMA como biofertilizante en plantas, promueve el uso de microorganismos benéficos o “biofertilizantes microbianos”, siendo una opción para que el agricultor aumente su productividad, una mejor nutrición de sus cultivos y reduzca costos de producción, además de reducir la contaminación en suelos y de mantos freáticos por la aplicación de fertilizantes químicos (SADER, 2020).

Las micorrizas como indicadores de calidad

La calidad del suelo se puede interpretar como la habilidad que posee un suelo para mantener de manera sostenida plantas productivas y en crecimiento continuo. Se considera saludable cuando tiene un ecosistema activo y productivo, favorece la calidad del aire y del agua.

Por lo que los indicadores son muy importantes, ya que son herramientas que simplifican la información sobre el estado del suelo, permitiendo evaluar su calidad y funcionamiento, por lo que deben ser confiables, económicos, sensibles a los cambios en el suelo, el clima y las prácticas agrícolas, y proporcionar información verificable. Con esta información, podemos desarrollar estrategias y evaluar prácticas agroecológicas (Jaizme, 2023).

Dentro de los indicadores de calidad del suelo, las micorrizas arbusculares son especialmente importantes. Estas asociaciones simbióticas entre hongos y raíces de plantas son indicativos de la salud del suelo. Las micorrizas ayudan a las plantas a obtener nutrientes esenciales y mejoran la estructura del suelo, facilitando la retención de agua y la resistencia a enfermedades. Por lo tanto, su presencia y estado pueden ofrecer información valiosa sobre la calidad del suelo (Jaizme, 2023).

Estas mismas determinan propiedades y procesos físico-químicos del ecosistema edáfico, afectando la productividad, salud y funcionalidad del suelo. Los principales usuarios de estos microambientes son los organismos del suelo en sus diferentes etapas de desarrollo y los microorganismos, como los hongos micorrícicos (Jaizme, 2023).

Medir las micorrizas de manera periódica o estacional podría establecer patrones de cambio en la salud del suelo a lo largo del tiempo. Esta medición permite identificar cambios en la calidad del suelo y ajustar las prácticas agroecológicas para mantener un entorno sostenible y productivo (Jaizme, 2023).

Técnica formal de referencia para identificación de micorrizas

La técnica formal de referencia fue la estipulada por Phillips y Hayman (1970). La cual consiste en recolectar las raíces y lavarlas con agua corriente para eliminar el resto de suelo e impurezas. Se seleccionan de manera aleatoria las raíces más blandas y no lignificadas, para mejorar la penetración de los reactivos. Después se clarifican con de KOH al 10% en la autoclave por 10 minutos a 10 libras de presión. Se continúa lavando las raíces con agua y se aplica H₂O₂ por 15 minutos. Posteriormente se enjuaga con agua destilada y se agrega HCl al 3% por 5 minutos. Finalmente se tiñen con azul de Tripano al 0.05% y lactoglicerol, con una proporción 70/30, se deja reposar por 1 hora. El colorante tiñe de color azul las estructuras del hongo que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de los HMA. Luego las raíces son enjuagadas y posteriormente montadas en un microscopio para ser observadas.

Objetivo General

Desarrollar una técnica de campo para la identificación de micorrizas a partir de una técnica convencional.

Metodología

Lugar de realización: Laboratorio de suelos y aguas, perteneciente al área de Ciencias biológicas y de la salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.

Fecha de inicio y finalización: Del 13 de junio 2023 al 13 de diciembre de 2023.

Actividades realizadas

Recopilación y análisis sobre información de hongos micorrícicos arbusculares, técnicas de cuantificación e identificación de micorrizas en cultivos de interés agronómico, con dicha información se realizó fichas y resúmenes con la finalidad de conocer a profundidad los HMA, agilizar los procedimientos de laboratorio, técnicas e identificar con mayor rapidez los HMA.

Estudio y repaso de los diferentes reactivos y manuales del laboratorio, en específico los que se usan para llevar a cabo la técnica de referencia para la identificación de micorrizas y sus diferentes formaciones físicas (arbúsculos, hifas, esporas, vesícula).

Preparación de suelo extraído de Oaxaca en el cual hay micorrizas, esto con la finalidad de garantizar dichos hongos en nuestro cultivo a sembrar, la preparación consistió en humedecer el suelo, retirar fragmentos de rocas y conseguir una estructura del suelo con un buen drenaje, para el cual se ocupó una base de tezontle. Posteriormente elegida la maceta y teniendo el suelo listo se sembraron semillas de trébol, se escogió este cultivo debido a su rápido crecimiento, la estructura y composición de sus raíces son idóneas para la visualización de HMA, además de ser recurrente la presencia de micorrizas en estos (citaNoda, 2009), de igual manera se utilizó esta planta para contabilizar HMA con la técnica de referencia.

Monitoreo y cuidado del cultivo de trébol para experimentación, se realizaron inspecciones sobre el cultivo, esto para mantener un control sobre su salud. Se hicieron riegos semanales y retiro de arvenses (**Figura 1**).



Figura 1. Trébol con un mes de crecimiento.

Preparación de reactivos para la técnica de referencia en laboratorio, para ello se desarrollaron las siguientes composiciones: KOH al 10%, H₂O₂, HCL al 3%, azul de tripano al 0.05%. Así como tener lista el agua destilada para los enjuagues, plumones para el etiquetado y autoclave acondicionada.

Detección y cuantificación con técnica de referencia, utilizando raíces de treboles con micorrizas, para esto se extrajeron con una pala recta una sección de plantas con la mayor cantidad posible de raíz. Se enjuagaron con agua corriente y con la ayuda de una tijera se cortan para mantener una cantidad homogénea en cada frasco donde se conservaron y se etiquetaron.

Cada uno de los frascos se llenó con KOH al 10% hasta tapar las raíces. Todos los frascos con las raíces son introducidos en la autoclave por 10 minutos a una presión de 10 libras.

Terminando este paso se enjuagan todas raíces con agua destilada, posteriormente se le agrega H₂O₂ al 3% por 15 minutos y se enjuaga.

Se agregó HCL al 3% por 5 minutos y se escurrieron pasando este tiempo sin enjuagar.

Se añadió el azul de tripano al 0.05 % y lactoglicerol en una proporción 70/30, y se dejó reposar por una hora.

Se enjuagó con abundante agua y estuvieron listas para ser seleccionadas y montadas para verse en el microscopio. Para este paso se seleccionaron 15 segmentos de raíces, las cuales fueron puestas en el portaobjetos de manera vertical, se agregó glicerina y se colocó el cubreobjetos.

Esta técnica se realizó siempre con un testigo para comparar los resultados de la técnica.

Se utilizó el programa y libro “Mycorrhizal Manual” para estimar la colonización de micorrizas en las raíces analizadas. Para esto se hizo uso de la técnica de referencia en varias series de raíces previamente extraídas y procesadas. Donde se registraron en tablas los diferentes estados de colonización.

Para el reemplazo de reactivos de laboratorio por reactivos que son encontrados a la libre venta y cumplan con el mismo funcionamiento. Se realizaron diferentes búsquedas bibliográficas y con lluvias de ideas entre el personal del laboratorio, terminando en discusiones para determinar qué reactivos serían más eficientes para tener un resultado ideal.

Resultados

Se inició con el reemplazo del KOH, tomamos en cuenta su nivel de concentración y composición, así como la función que cumple en la técnica de referencia, la cual es eliminar restos orgánicos y debilitar la pared celular para facilitar la tinción. Se realizaron pruebas con cloro e hidróxido de sodio (NaOH) a diferentes concentraciones, al 20%, 10% y 5%, se tomaron otros factores como tiempo y temperatura.

Hay que destacar que siempre se realizó la técnica de referencia para comprobar la existencia de micorrizas y la visibilidad de estas.

Con base en los resultados se determinó que el NaOH al 10% sometido a calor por 10 minutos a 10 libras de presión fue el mejor para reemplazar el KOH. Estas pruebas se realizaron sobre cultivo de trébol, evo y maíz.

Sustitución del HCL al 3%, siendo su función el acidificar las raíces, para este punto se probó la utilización de ácido cítrico concentrado, ácido acético (vinagre) y ácido muriático Sultán poder limón. Se hicieron 5 repeticiones con cada uno de los reactivos antes mencionados, con tiempos de 5, 10 y 15 minutos. Teniendo mejores resultados con el ácido muriático Sultán poder limón, debido a que se trata del mismo ácido, pero en su versión comercial. Estas pruebas se hicieron en raíces de lechuga, evo, maíz, chile y trébol. Dejando una concentración de 13 ml de ácido muriático Sultán poder limón por cada 50 ml.

Para el reemplazo del azul de tripano se tomaron con posibles sustitutos al azul de metileno, violeta de genciana y la tinta de lapicero Parker Quink azul sin aceites. Se probó con concentraciones similares a las del azul de tripano, determinando como mejor tinción a la la tinta de lapicero Parker Quink (**Figura 2**) a una concentración de 1.25 ml por cada 50 ml. El cual cumple con la función de tinter las raíces, para lograr la visualización de las diferentes formas de la micorriza.



Figura 2. Tinta Parker Quink.

Cabe destacar que tanto la tinta como el ácido muriático por sí solos no generaban resultados totalmente satisfactorios, por lo que se optó por juntarlos y someterlos por un tiempo determinado en calor, específicamente a baño María. Se realizaron 6 pruebas experimentales donde varió el tiempo y temperatura, de 30, 15 y 10 minutos, en cuestión a temperatura de hizo a 70°C y 80 °C, sin llegar a la ebullición. Obteniendo el mejor resultado a una temperatura de 70°C con un tiempo de 15 minutos.

Con base en lo anterior se propone la siguiente técnica:

Técnica definitiva para la identificación de micorrizas en campo

Extracción de raíces de un cultivo de interés con raíces no lignificadas (entre un mes y mes y medio de crecimiento), tratar de obtener raíces no dañadas por la manipulación (**Figura 3**).



Figura 3. Recolección de raíces de trébol.

Enjuague de las raíces con agua corriente con la intención de eliminar el suelo y cuerpos extraños (**Figura 4**).



Figura 4. Selección y enjuague de raíces.

Selección de raíces delgadas y blandas, con la ayuda de una tijera se corta la raíz de la base del tallo.

Se colocan las raíces en frascos previamente etiquetados, estos deben ser de vidrio y con tapa.

Se prepara una solución del hidróxido de sodio (NaOH) o también conocido como sosa cáustica que consta de 5 gr por cada 50 ml de agua destilada. Se agrega a cada frasco hasta tapar todas las raíces existentes.

Se colocan los frascos de las raíces con el NaOH ligeramente sellados en baño María, en un periodo de tiempo de 20 minutos a una temperatura de 70°C, evitando que hierva.

Posteriormente se retiran los frascos con la ayuda de guantes o piezas, se enjuagan con agua destilada para eliminar cualquier rastro del NaOH.

Se agrega el agua oxigenada (H_2O_2) a las raíces, se deja reposar durante 15 minutos. Pasado este tiempo se enjuagan con agua destilada para eliminar el H_2O_2 .

Para la preparación de la solución de tinta Parker Quink, ácido muriático y agua destilada. Serán necesarios 1.25 ml de tinta, 13 ml de ácido muriático y 50 ml de agua destilada. Todo debe ser homogéneo, el resultante de la solución es agregado a las raíces y se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se llevarán los frascos con la solución a baño María durante 15 minutos a $70^\circ C$. Es importante que el agua del baño María esté a $70^\circ C$ al momento de introducir nuestros frascos (**Figura 5**).



Figura 5. Frasco con solución de tinta Parker Quink, agua destilada y NaOH a baño María.

A continuación, se retira el frasco pasado el tiempo establecido y es inmediatamente enjuagado de preferencia dos veces con agua destilada, con la intención de retirar el exceso de tinta (**Figura 6**).



Figura 6. Raíces después de ser enjuagadas.

Finalmente se agrega agua y unas gotas de glicerol para la conservación de las raíces previamente tratadas. Están listas para ser montadas y seleccionadas para verse en el microscopio óptico o puede usarse un microscopio de clip celular, para esto con la ayuda de pinzas de disección vamos a cortar las raíces o cualquier tipo de pinzas finas (**Figura 7**).

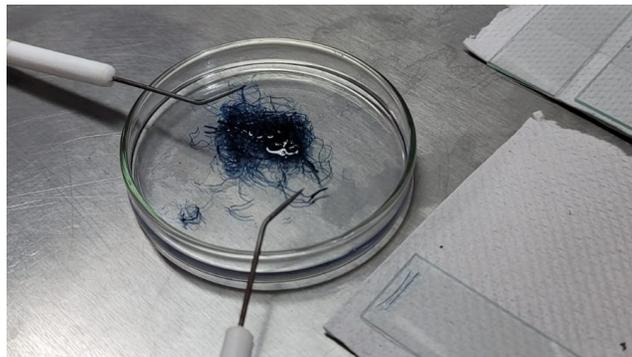


Figura 7. Selección y corte de raíces de trébol.

Se extrajeron 15 segmentos de raíces, las cuales son puestas en el portaobjetos (**Figura 8**) de manera vertical, se agrega glicerina y se coloca el cubreobjetos. Recomendado utilizar los aumentos 10x y 40x para observar las micorrizas.



Figura 8. Raíces montadas en el portaobjetos.

Se logran apreciar las micorrizas tanto en la técnica de referencia (**figura 9**) como en la técnica de campo (**figura 10** y **figura 12**). Se perciben estructuras como vesículas e hifas. Logrando el objetivo de tener resultados observables para la identificación de micorrizas en campo.

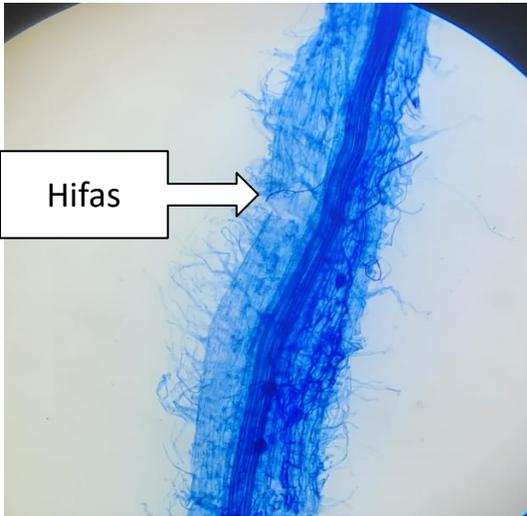


Figura 9. Hifas de HMA en raíz de trébol con lente 10x de microscopio óptico, tratamiento de técnica de referencia.

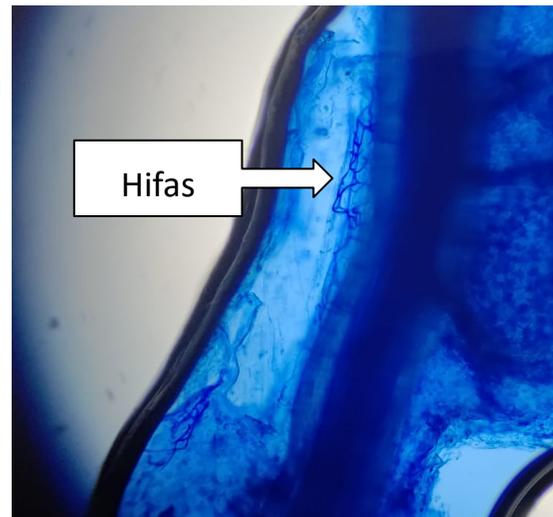


Figura 10. Hifas de HMA en raíz de trébol con lente 10x de microscopio óptico, tratamiento de técnica de campo.

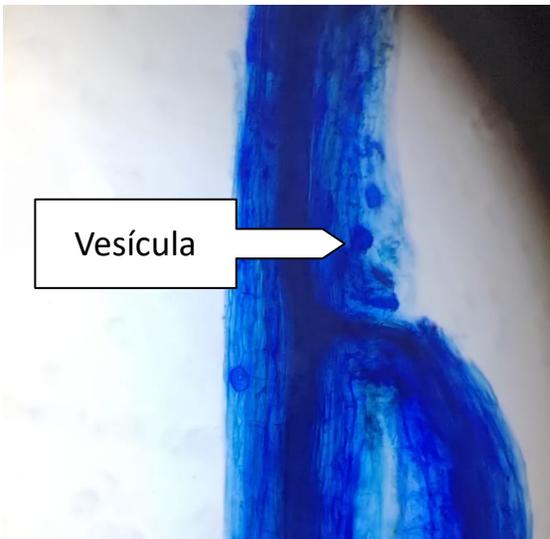


Figura 11. Vesículas en la raíz de trébol con lente 10x de microscopio óptico, tratamiento de técnica de referencia.

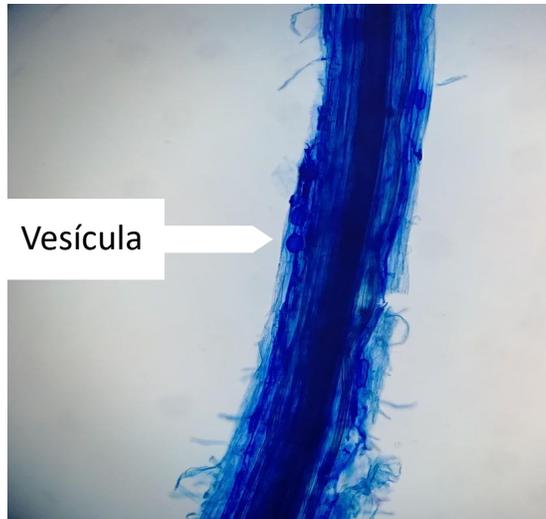


Figura 12. Vesículas en la raíz de trébol con lente 10x de microscopio óptico, tratamiento con técnica de campo.

Discusión

Comparando la técnica formal de referencia y la técnica de campo propuesta, existe una serie de ventajas de una sobre la otra, la técnica de campo al utilizar reactivos sencillos y de fácil acceso logra que cualquier persona pueda llevarla a cabo. Además de tener en su mayoría reactivos económicos y que se encuentran en casi todos los hogares, y de poder adquirirlos en bajas cantidades de manera individual. Y teniendo opciones de usar un microscopio o clip celular dadas las condiciones en las que se encuentre el ejecutor de la técnica.

La técnica formal de referencia al ejecutarse en laboratorio y contar con instrumentos más específicos y exactos como, la autoclave, vasos de precipitado, pipetas, matraz, entre otros, se puede medir y calcular con mayor especificidad y tener un mayor control sobre los reactivos, permite obtener un resultado más exacto. Cabe destacar que al no contar con un laboratorio como se tiene previsto para la técnica de campo, se pueden obtener las medidas para los diferentes reactivos consiguiendo algún utensilio que nos lo permita, ya sea adquiriendo o adaptándolo, haciendo uso de la estufa, olla a presión, entre otras herramientas que nos proporcione un medio adecuado para la técnica.

Referente al tiempo que se emplea para ambas técnicas, es menor para la técnica de campo, ya que se necesita de menos tiempo de reposo para los pasos de tinción de las raíces.

En cuanto al procedimiento, la técnica de campo cuenta con más pasos para poder teñirlas. Cabe resaltar que ambas técnicas cumplen con el propósito de visualizar micorrizas, y depende de quien la aplique y con que cuente para hacer el procedimiento más sencillo y rápido. Pero la técnica de campo tiene un número mayor de factores que se interponen para obtener una visualización correcta, sin

embargo, con el debido seguimiento y responsabilidad no habrá problema en visualizar las micorrizas. Por otro lado si es de interés el cuantificar las micorrizas vistas a través de la técnica de campo se puede utilizar de igual manera como con la técnica formal el Micorrhiza Manual propuesto por Dodd J y Clapp J (2001).

Conclusión

Los resultados que se obtuvieron con la técnica de campo desarrollada para la identificación de micorrizas fueron satisfactorios, ya que se cumplió con el objetivo del trabajo. Logrando visualizar en tiempo y forma las estructuras micorrízicas como vesículas, arbusculos e hifas en las raíces. Dando una nueva forma de observar y conocer si nuestro cultivo de interés cuenta con HMA y en qué cantidades, dando paso a poder aplicar un manejo adecuado para el desarrollo óptimo de las micorrizas en el cultivo, de igual manera hacer uso de distintas herramientas para cuantificar y estimar parámetros de colonización micorrízica.

Con el reemplazo de los reactivos de laboratorio se consiguió una forma accesible y sencilla para estudiantes, productores, técnicos e investigadores de aplicar una técnica de campo para identificar micorrizas. Además de ser económica y accesible por el tipo de materiales usados en esta nueva técnica. Generando un beneficio para cualquier persona interesada en los HMA y para su cultivo. Logrando ser aplicada en cualquier lugar sin la necesidad de un laboratorio y los insumos de este.

Bibliografía

Bonfante P (2019). At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. In *Mycota*, IX Fungal Associations (Hock, B. ed), 45 – 91.

Chen W, Jiang S, Yu Y, Gao R, Wang H, Zhang J, Li R, Long X, Shen R, Cai F (2019). High-throughput absolute quantification sequencing reveals the effect of different fertilizer applications on bacterial community in a tomato cultivated coastal saline soil. *Science of The Total Environment*, Volume 687. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969719326737>

FAO (2018). The state of food and agriculture: Innovation in family farming. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/I9549EN/i9549en.pdf>

Galloway J, Dentener F, Capone D, Boyer E (2013). Nitrogen cycles: Past, present, and future. *Biogeochemistry*. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/226775615_Nitrogen_Cycles_Past_Present_and_Future

Dodd J, Clapp J (2001). Mycorrhiza Manual. Arbuscular mycorrhizal fungi in plant production systems: detection, taxonomy, conservation and ecophysiology (Consultado el 03 de octubre. Disponible en: [<https://www2.dijon.inrae.fr/mychintec/Protocole/protoframe.html>]).

Jaizme M (2023). Los hongos micorrícicos, bioindicadores de salud del suelo. Fincas Faro. Red de fincas agroecológicas de Canarias. Gobierno de Canarias. Recuperado de: <https://ecofaro.com/wp-content/uploads/2023/07/Maquetacion-Libro-ICIA-2.pdf>

Karin H, Moyses A, Voglgruber A, Hadacek F, Steinkellner S (2013). Alterations in Root Exudation of Intercropped Tomato Mediated by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae* and the Soilborne Pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*. *Journal of Phytopathology*, 161, 763–773.

Martínez L (2015). Evaluación de biofertilizantes en la producción del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en Villaflores, Chiapas. Universidad Autónoma de Chiapas. Recuperado de: <http://www.repositorio.unach.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/3008/1/RIBC144803.pdf>

Nazareno C, Ruscitti M, Arango M (2020). Micorrizas arbusculares: biología y aplicaciones en el sector agro-forestal. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Buenos Aires, Argentina. EDULP. 1a ed. Recuperado de: <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/download/1504/1486/4845-1>

Noda Y (2009). Las Micorrizas: Una alternativa de fertilización ecológica en los pastos. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" Matanzas, Cuba. Vol. 32, núm. 2. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/2691/269119695001.pdf>

Ramos J, Marrufo D, Guadarrama P, Carrillo L (2011). Hongos micorrízico-arbusculares. CICY. Biodiversidad y desarrollo humano. Especies. Recuperado de: <https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap4/07%20Hongos%20micorrozicos.pdf>

Saldívar B (2023). Alimentos se encarecieron en el 2022 a nivel máximo de los últimos 24 años. El economista. Recuperado de: <https://www.economista.com.mx/economia/Alimentos-se-encarecieron-en-el-2022-a-nivel-maximo-de-los-ultimos-24-anos-20230115-0031.html>

Symborg (2023). Micorrizas, el aliado imprescindible para un cultivo extra eficiente. Corteva Agriscience Business. Recuperado de: <https://symborg.com/mx/que-son-las-micorrizas/>

Liang L, Liu B, Huang D, Kuang Q, An T, Liu S, Liu R, Xu B, Zhang S, Deng X, Macrae A, Chen Y. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance the solubilization of insoluble phosphorus in soil by excreting organic acids. *Soil Biology and Biochemistry*. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9696889/>

López C y Barceló A (2010). Micorrizas. Universidad de Málaga. Estación Experimental La Mayora. Recuperado de: <https://www.uma.es/estudios>