



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ESTABLECIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE
HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES
ASOCIADOS A COCOTERO A TRAVÉS DE
CULTIVOS TRAMPA**

Tesis que presenta:

JORGE LUIS EK CHIM

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México
2019

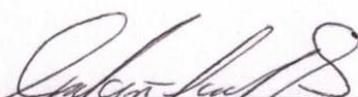
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Jorge Luis Ek Chim** titulado **“Establecimiento de la producción de hongos micorrízicos arbusculares asociados a cocotero a través de cultivos trampa”** fue realizado en el Laboratorio de Cocotero de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Agrobiotecnología, bajo la dirección del Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell y el Dr. Luis Alberto Lara Pérez, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



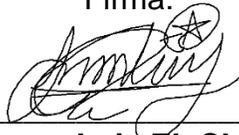
Dra. Clelia De la Peña Seaman
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 14 de mayo de 2019.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:



Jorge Luis Ek Chim

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada Núm. 619243 para poder llevar a cabo la realización de este trabajo.

Al CONACYT, por el financiamiento del proyecto “Impulso a la cadena de valor del cocotero para aumentar su competitividad y contribuir al desarrollo socio-económico en la región Pacífico Sur y otros estados productores”, 2018-2021, FORDECYT 296195, del cual este trabajo fue parte.

Al CICY, por abrirme sus puertas y permitirme formar parte de él.

Al Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, por las enseñanzas, paciencia y guía para realización de este trabajo.

Al Dr. Luis Alberto Lara Pérez, por enseñarnos el potencial de un mundo bajo nuestros pies, así como su apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Iván Oros Ortega y al Dr. Javier Mijangos Cortez, por todo su apoyo para la realización de este trabajo.

A la Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez, por su apoyo para la realización de este trabajo.

Al Mtro. Iván Córdova Lara y la Dra. María Narváez Cab, por su apoyo en el laboratorio para la realización del presente trabajo.

A la Mtra. Analesa Skeete, al Mtro. Pedro Osorio Montalvo y al Mtro. Rafael César Sánchez Bojórquez, por todo su apoyo.

A la Dra. Blondy Canto Canché y al Mtro. Bartolomé Chi Manzanero, por todas las facilidades en el uso de sus equipos de laboratorio.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a quien de su mano nunca me soltó, a Dios a quien clamo y siempre responde.

A mi esposa Gemaly Elisama Ek Hernández, su amor es mi inspiración.

A mi familia, mi madre María, mi padre Luis, mis hermanos Grecia y Julio, a mi sobrina Shaday, mis guerreros de mil batallas.

A mi amigo el CP. Diego Rodríguez Ozuna, un ejemplo de vida.

A mi abuela Amalia Uc Balam (†), lo prometido es deuda, ser maestro.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

ÍNDICE DE FIGURAS..... v

ÍNDICE DE CUADROS..... vii

INTRODUCCIÓN..... 1

CAPÍTULO I 3

ANTECEDENTES 3

1.1 IMPORTANCIA DEL COCOTERO 3

1.2 PROBLEMÁTICA DEL COCOTERO..... 3

1.3 HONGOS MICORRÍZICOS..... 4

1.4 LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA) 6

1.4.1 SIMBIOSIS ENTRE HONGOS MICORRÍZICO ARBUSCULARES Y PLANTAS 6

1.4.2 TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES..... 10

1.5 SIMBIOSIS HMA - *COCOS NUCIFERA* L..... 10

1.6 LOS HMA DE LA DUNA COSTERA 11

1.7 LOS HMA COMO BIOFERTILIZANTES..... 12

1.8 EL PH DEL SUELO EN LOS HMA..... 13

1.9 MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE HMA..... 14

| | |
|---|----|
| 1.9.1 CULTIVOS TRAMPA BASADOS EN SUSTRATOS | 14 |
| 1.9.2 CULTIVOS SIN SUSTRATO (HIDROPONÍA Y AEROPONÍA)..... | 16 |
| 1.9.3 CULTIVOS <i>IN VITRO</i> DE HMA | 17 |
| 1.10 PASTOS COMO HOSPEDEROS PARA LA PRODUCCIÓN DE HMA | 18 |
| 1.11 ORIGEN DEL INÓCULO: HMA NATIVOS | 18 |
| JUSTIFICACIÓN | 20 |
| OBJETIVO GENERAL | 22 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 22 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL..... | 23 |
| CAPITULO II | 25 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| 2.1 ÁREA DE ESTUDIOS..... | 25 |
| 2.2 MUESTREO DEL SUELO | 25 |
| 2.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPORAS | 25 |
| 2.4 COLONIZACIÓN DE LA RAÍZ | 26 |
| 2.5 ESTIMACIÓN DE LA COLONIZACIÓN MICORRÍZICA..... | 26 |
| 2.6 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS TRAMPA..... | 27 |
| 2.7 ÍNDICE DE DIVERSIDAD..... | 28 |
| CAPITULO III | 29 |
| RESULTADOS..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1 AISLAMIENTO DE ESPORAS: MUESTRAS DE LA DUNA COSTERA DE YUCATÁN | 29 |
| 3.1.1 ESPECIES DE ESPORAS IDENTIFICADAS EN LA RIZÓSFERA DE COCOTERO | 29 |
| 3.2 COLONIZACIÓN MICORRÍZICA EN COCOTERO | 31 |
| 3.3 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS TRAMPA | 32 |
| 3.4 PASTO GUINEA COMO PLANTA TRAMPA ALTERNA | 33 |
| 3.5 ESPORAS TOTALES DE LOS CULTIVOS TRAMPA: PASTO GUINEA | 34 |
| 3.5.1 ESPECIES DE HMA IDENTIFICADAS EN EL PASTO GUINEA | 35 |
| 3.7 CULTIVOS TRAMPA: FRIJOL | 37 |
| 3.7.1 ESPECIES DE HMA IDENTIFICADAS EN FRIJOL | 39 |
| 3.8 CULTIVOS TRAMPA: MAÍZ | 39 |
| 3.8.1 ESPECIES DE HMA IDENTIFICADAS EN CULTIVOS TRAMPA DE MAÍZ | 41 |
| 3.9 CULTIVOS TRAMPA: SORGO | 43 |
| 3.9.1 ESPECIES DE HMA IDENTIFICADOS EN LOS CULTIVOS TRAMPA DE SORGO | 44 |
| 3.10 DIVERSIDAD DE ESPECIES EN EL COCOTERO DE LA DUNA COSTERA YUCATECA | 46 |
| 3.11 ÍNDICE DE DIVERSIDAD DE LAS ESPECIES DE HMA ASOCIADOS A COCOTERO | 46 |
| 3.12 ÍNDICE DE DIVERSIDAD DE ESPECIES DE HMA EN CULTIVOS TRAMPA | 47 |
| 3.13 PRODUCTIVIDAD TOTAL DE ESPORAS DE LOS DIFERENTES CULTIVOS | |

| | |
|---|-----------|
| TRAMPA | 48 |
| 3.13 INFLUENCIA DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL SUELO EN LOS HMA | 48 |
| CAPITULO IV | 52 |
| DISCUSIÓN..... | 52 |
| CAPÍTULO V | 58 |
| CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 58 |
| 5.1 CONCLUSIONES..... | 58 |
| 5.2 PERSPECTIVAS | 59 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 62 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 Estructuras de colonización de la raíz en las interacciones ectomicorrízica y micorrízica arbuscular..... | 5 |
| Figura 1.2 Proceso de colonización de las raíces por los HMA..... | 8 |
| Figura 1.3 Arbúsculo..... | 9 |
| Figura 1.4 Intercambio de nutrientes HMA-PLANTA..... | 9 |
| Figura 3.1 Número promedio de esporas en los diferentes sitios de la duna costera yucateca..... | 29 |
| Figura 3.2 Esporas de HMA aisladas de la rizósfera de cocotero de diferentes sitios de la duna costera de la península de Yucatán..... | 30 |
| Figura 3.3 Colonización micorrízica en cocotero en la Península de Yucatán..... | 31 |
| Figura 3.4 Cultivos trampa de maíz en arena estéril. Suelo muy pobre en nutrientes y bajo riego a las elevadas temperaturas de la región 40 - 43 °C..... | 32 |
| Figura 3.5 Cultivos trampa de sorgo (1), maíz (2) y frijol (3)..... | 33 |
| Figura 3.6 Pasto guinea establecido bajo elevadas temperaturas, sin fertilización y con baja cantidad de riego..... | 33 |
| Figura 3.7 Recuperación de las esporas de los HMA, se recolecto la arena estéril sobre la cual se hayan los HMA logrados propagar por el pasto..... | 34 |
| Figura 3.8 Promedio total de producción de esporas de HMA en el pasto guinea al cuarto y sexto mes de su establecimiento..... | 34 |
| Figura 3.9 Esporas de HMA aisladas de la los cultivos trampa empleando el pasto guinea como planta trampa..... | 35 |
| Figura 3.10 Estructuras de los HMA dentro de la raíz del pasto guinea..... | 37 |
| Figura 3.11 Comparación entre la producción de esporas del mes cuarto y sexto en los cultivos trampa de frijol..... | 38 |
| Figura 3.12 Hifa colonizando raíz de frijol..... | 38 |
| Figura 3.13 Esporas de HMA aisladas en los cultivos trampa de frijol..... | 39 |
| Figura 3.14 Producción total de esporas del cultivo trampa de maíz al mes cuarto y mes sexto..... | 40 |
| Figura 3.15 Estructuras características de la colonización de las raíces por HMA..... | 41 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.16 Especies identificadas en los cultivos trampa de maíz | 42 |
| Figura 3.17 Producción total de esporas de los HMA asociados a sorgo al cuarto y sexto mes..... | 43 |
| Figura 3.18 Vesículas en raíz de sorgo..... | 44 |
| Figura 3.19 Especies de HMA en el cultivo trampa de sorgo | 45 |
| Figura 3.20 Comparación del número de esporas producidas en 10 g de suelo por cada especie empleada como cultivo trampa | 48 |
| Figura 5.1 Diferencia entre plantas de cocotero provenientes de cultivo <i>in vitro</i> inoculadas con HMA y no inoculadas | 60 |
| Figura 5.2 Los HMA propagados en <i>Panicum maximum</i> mejoran la sobrevivencia de las plantas de cocotero provenientes de cultivo <i>in vitro</i> | 60 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1.1 Producción de HMA en cultivos trampa con sustrato, se presenta el total producción de esporas de diversas plantas trampa. | 16 |
| Cuadro 3.1 Porcentaje de colonización micorrízica en Cocos nucifera cultivados en diferentes sitios de la duna costera de Yucatán. Valores promedio \pm desviación estándar (n=3)..... | 31 |
| Cuadro 3.2 Especies de HMA identificadas en pasto coincidentes con las especies identificadas en la rizósfera de cocotero. | 36 |
| Cuadro 3.3 Porcentajes de colonización micorrízica de las raíces del pasto guinea a los meses cuarto y sexto del establecimiento del cultivo trampa. Los valores indican el promedio \pm desviación estándar (n=3)..... | 36 |
| Cuadro 3.4 Porcentajes de colonización micorriza de las raíces de frijol a los meses cuarto y sexto. Los valores indican el promedio \pm desviación estándar (n=3) | 38 |
| Cuadro 3.5 Especies de HMA identificadas en los cultivos trampa de frijol que coinciden con las aisladas en la rizósfera de costero..... | 39 |
| Cuadro 3.6 Porcentajes de colonización micorrízica de las raíces de maíz al cuarto y sexto mes de la instauración del cultivo trampa. Los valores indican promedio \pm desviación estándar (n=3)..... | 41 |
| Cuadro 3.7 Especies de HMA encontradas en maíz coincidentes con las especies identificadas en la rizósfera de cocotero | 43 |
| Cuadro 3.9 Especies identificadas en sorgo que también fueron reportadas en la rizósfera de cocotero..... | 45 |
| Cuadro 3.10 Diversidad y homogeneidad de las especies de HMA asociados a la rizósfera de cocotero en los diferentes sitios de la duna costera yucateca | 46 |
| Cuadro 3.11 Diversidad y homogeneidad de los HMA en los cultivo trampa de pasto, maíz, sorgo y frijol..... | 47 |
| Cuadro 3.13 Propiedades fisicoquímicas del suelo. | 49 |
| Cuadro 3.14 Relación entre P, N y K con los porcentajes de colonización y presencia de esporas..... | 49 |

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó el grado de asociación de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y su diversidad en la palma de coco de la duna costera de la península de Yucatán. Fueron identificadas 21 especies de HMA asociadas a este cultivo en ambiente natural, con un promedio de esporas en el suelo de 139 en 10 g, donde del total de las especies identificada se encontró que *Rhizophagus aggregatus* es la más común, seguida por *Acaulospora scrobiculata* y posteriormente *Glomus glomerulatum*. Bajo el establecimiento de cultivos trampa se determinó la especie de planta con mayor producción de inóculos de HMA de la duna yucateca y una mejor adaptabilidad a las condiciones climatológicas de la región, donde se evaluó al pasto guinea (*Panicum maximum*), al frijol (*Phaseolus vulgaris*), al sorgo (*Sorghum bicolor*) y al maíz (*Zea mays*). Siendo el pasto *Panicum maximum* la planta trampa que presentó el mayor número de esporas en el suelo (316 esporas en 10 g), una diversidad intermedia y facilidad de manejo debido a su resistencia a las altas temperaturas, enfermedades y plagas, en cuanto *P. vulgaris* fue el que menor número de esporas produjo con 50.3 esporas en 10 g de suelo, *Z. mays* logro producir 80.8 esporas en 10 g y *S. bicolor* fue el segundo mejor productor de esporas con 87.7 esporas en 10 g de suelo. Como tal, el pasto *P. maximum* se presenta como una alternativa para producción de HMA en las regiones tropicales.

ABSTRACT

ABSTRACT

In the present work the degree of association of the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and its diversity in the coconut palm of the coastal dune of the Yucatan peninsula was determined. Twenty-one species of AMF associated with this crop in a natural environment were identified, with an average spore in the soil of 139 in 10 g, where of the total of the identified species, *Rhizophagus aggregatus* was found to be the most common, followed by *Acaulospora scrobiculata* and later *Glomus glomerulatum*. Under the establishment of trap crops, the plant species with the highest production of AMF inocula of the Yucatan dune and a better adaptability to the climatological conditions of the region were determined, where the guinea grass (*Panicum maximum*) was evaluated to the bean (*Phaseolus vulgaris*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and corn (*Zea mays*). The grass *Panicum maximum* being the trap plant that presented the highest number of spores in the soil (316 spores in 10 g), intermediate diversity and ease of management due to its resistance to high temperatures, diseases and pests, as *P. vulgaris* was the one with the lowest number of spores produced with 50.3 spores in 10 g of soil, *Z. mays* managed to produce 80.8 spores in 10 g and *S. bicolor* was the second best spore producer with 87.7 spores in 10 g of soil. As such, the *P. maximum* grass is presented as an alternative for the production of AMF in tropical regions.

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) pertenecientes al filo Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001) constituyen un grupo biotrófico obligado que forma asociaciones simbióticas con aproximadamente el 80% de las especies de plantas en los sistemas naturales y agrícolas. En estas asociaciones, los HMA dependen del carbono y lípidos procedente de la planta hospedera y a cambio, los HMA proporcionan a la planta de nutrientes esenciales como P, N, Zn y Cu (Smith y Lee, 2008; Feddermann *et al.*, 2010). Además de un suministro nutricional mejorado, las interacciones micorrízicas proporcionan otros beneficios a las plantas, como tolerancia a la sequía, a la salinidad y también otorgan resistencia a enfermedades (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007; Porcel *et al.*, 2011; Augé *et al.*, 2015). Por ello, los HMA son considerados un componente complementario en la nutrición de las plantas (Lanfranco *et al.*, 2016) que ofrecen una mejora en la salud y el crecimiento de las plantas de importancia agrícola, hortícola y forestal (Bagyaraj y Stürmer, 2012). Así mismo, los HMA son componentes primarios del suelo que mantienen el funcionamiento de los ecosistemas (Berruti *et al.*, 2015). Estos HMA son de particular importancia en las regiones tropicales donde los suelos, por lo general, presentan baja fertilidad y estos hongos desempeñan un papel crucial para el crecimiento, la supervivencia y el desarrollo de las especies vegetales (Lopes *et al.*, 2009) y, por tanto, influyen en la sucesión secundaria de plantas y la estructura de las comunidades vegetales (Janos, 1996).

El cocotero, uno de los cultivos tropicales de gran importancia económica (Maruchi *et al.*, 2007) que representa el sustento de millones de personas en 93 países, actualmente enfrenta diversos retos, donde la producción y el área de los cultivos ha disminuido drásticamente, debido a factores climatológicos, a la pérdida de nutrientes del suelo, problemas fitosanitarios como plagas y enfermedades, incluso por la edad de las plantas. El uso de los HMA con un enfoque hacia la agricultura sostenible, se ha vuelto una alternativa viable. Debido a los beneficios brindados por la simbiosis planta-hongo se tienen un alto potencial para reducir los retos a los cuales se enfrentan diversos cultivos como el cocotero que además puede contribuir a reducir el uso indiscriminado de agroquímicos.

Desafortunadamente, los HMA son simbioses obligados y no puede ser cultivados en cultivos puros en ausencia de sus plantas hospederas (Berruti *et al.*, 2016), por lo cual el uso de cultivos con plantas trampa representa una estrategia para producir inóculo a gran escala (esporas y raíces colonizadas) (Leal *et al.*, 2009). Sin embargo, el desarrollo de los cultivos trampa requiere de estrictos manejos, ya que diversos factores podrían impedir la propagación de todas las especies presentes en el inóculo inicial de los cultivos trampa. Un factor determinante es la especie de planta empleada para propagar los HMA en los cultivos trampas, puesto a que los HMA colonizan las raíces de las plantas sin especificidad, pueden mostrar cierta preferencia en el proceso, lo que derivaría en una falta de la propagación de las especies de interés (Yao *et al.*, 2010; Liu y Wang, 2003). Además, para el correcto aprovechamiento de estos hongos en la mejora de la productividad de sus hospederos, se requiere que los HMA puedan adaptarse al tipo de suelo y a los procesos que conducen al establecimiento de una simbiosis funcional en los ecosistemas donde serán introducidos (Berruti *et al.*, 2016). Donde los HMA nativos de suelos estresados han destacado al ofrecer mayores ventajas a sus hospederos, así como una mayor adaptabilidad a diferentes suelos (Briccoli Bati *et al.*, 2015; Labidi *et al.*, 2015; Estrada *et al.*, 2013). Por lo cual, en el presente trabajo se propone identificar por morfología los hongos micorrízicos arbusculares nativos presentes en la duna costera de la península de Yucatán, para desarrollar cultivos trampa idóneos que puedan propagarse masivamente en estas regiones, con un enfoque hacia la producción de un biofertilizante que pueda emplearse en palmas de la duna costera, así como en el cocotero.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Importancia del cocotero

La especie *Cocos nucifera* Linn, conocida comúnmente como cocotero o palma de coco, es uno de los árboles de los trópicos mejor reconocido y más importante económicamente (Maruchi *et al.*, 2007), es considerado como "el símbolo del trópico" y "el árbol de la vida" a la vista de su posición como un cultivo de plantaciones clave de los trópicos; millones de personas en 93 países dependen del cultivo de coco para la seguridad de su sustento (Rajesh *et al.*, 2012). Se cultiva principalmente en 12 millones de hectáreas en las tierras bajas costeras tropicales y subtropicales (FAOSTAT, 2013), donde es cultivado para la obtención de aceite de gran demanda, para la producción de jabones, en la fabricación de surfactantes y espumas estabilizadoras para detergentes, champús, cosméticos, inhibidores de corrosión y emulsificantes. Además, otras partes de la planta son utilizadas para la obtención de azúcar, alcohol, carbón activado, fibra, madera y combustible (Zizumbo-Villareal *et al.*, 2006).

1.2 Problemática del cocotero

El cultivo de cocotero se enfrenta a muchos retos, entre ellos está la disminución de la productividad, que se ve afectada por la edad, que disminuye después de 35 años debido a una reducción en el área foliar, por la pérdida de los nutrientes del suelo, por medio de los daños causados por los ciclones y las tormentas (Sisunandar *et al.*, 2010; Samosir y Adkins 2014). Así mismo el cocotero se enfrenta a la rápida proliferación de plagas y enfermedades incurables, tales como el amarillamiento letal causado por fitoplasmas y el cadang-cadang causado por viroides, que se ha traducido en una caída significativa en el área plantada con el cocotero (Córdova *et al.*, 2003 ; Harrison y Jones, 2003; Lee, 2013).

El uso de alternativas como la replantación de germoplasmas resistentes y altamente productivas, pueden contribuir a subsanar esta grave problemática que ha devastado a este importante cultivo. En el cual los protocolos desarrollados para el cultivo *in vitro* de cocotero resistentes a enfermedades y con elevada producción son una importante alternativa en el combate a las grandes problemáticas del cocotero.

Sesenta años han pasado desde el primer estudio de cultivo *in vitro*, cuando se utilizó el propio endospermo líquido del cocotero como medio de cultivo para inducir la germinación del embrión (Cutter y Wilson, 1954). El cultivo de cocotero en un principio mostró ser recalcitrante a ser cultivado *in vitro*; sin embargo, en 1998, se estableció un protocolo de propagación clonal reproducible de cocotero utilizando plúmulas como explantes (Chan *et al.*, 1998). Este protocolo se caracterizó (Sáenz *et al.*, 2006) y se hizo más eficiente utilizando diferentes ciclos de propagación (Pérez-Nuñez *et al.*, 2006). Actualmente este protocolo se ha transferido a la biofábrica del CICY para el escalamiento de plantas élite. Sin embargo, este protocolo aún puede hacerse más eficiente. Las plántulas *in vitro* son cultivadas de 6-9 meses antes de pasar a condiciones *ex vitro* (Oropeza *et al.*, 2017). Si se pudiese disminuir el tiempo de cultivo *in vitro* y adaptar a las plantas *ex vitro* con porcentajes de sobrevivencia altos (80-90%) como ocurre cuando se transfieren normalmente, pudiéramos ahorrar tiempo y espacio en la biofábrica (Oropeza *et al.*, 2017).

1.3 Hongos micorrízicos

Los hongos (saprófitos y micorrízicos) juegan un papel muy importante en la biología de los suelos, al ser uno de los principales componentes de la comunidad microbiana y poseer una biomasa que oscila entre 50 y 900 kg C/ha (Meddad-Hamza *et al.*, 2017) con un gran número de funciones tales como:

- Contribuir a la descomposición de la materia orgánica y como tal liberar nutrientes para su absorción por las plantas (Zhu y Miller, 2003 y Wilson *et al.*, 2009).
- Almacenar nutrientes dentro de los cuerpos de los organismos del suelo que impiden la pérdida de estos por lixiviación (Wang *et al.*, 2007).
- Mejoran la estructura y agregación, así como los balances de gases y los ciclos biogeoquímicos del suelo (Rilling *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2007).

Los hongos micorrízicos son un grupo heterogéneo de diversos taxones de hongos, asociados con las raíces de más del 90% de todas las especies de plantas (Bonfante y Genre, 2010). Las asociaciones simbióticas establecidas juegan un papel clave en los ecosistemas terrestres, ya que regulan los ciclos de nutrientes y carbono e influyen en la estructura del suelo y en la multifuncionalidad del ecosistema (Van der Heijden *et al.*,

2015). Por lo general, la clasificación de las interacciones micorrízicas se basa en los rasgos anatómicos de las plantas e identifica dos grandes categorías: ectomicorrizas, en las que el hongo está restringido a los espacios intercelulares de los tejidos radiculares externos, y endomicorrizas, en el cual los hongos penetran las células vivas del huésped (Figura 1.1) (Bonfante y Genre, 2010). En las ectomicorrizas, que colonizan árboles y arbustos, las hifas permanecen extracelulares, induciendo importantes cambios en la morfogénesis de las raíces, mientras que su presencia conduce a modificaciones sutiles en las células epidérmicas o corticales. En las endomicorrizas, es decir, ericoide, orquídea, y micorriza arbuscular (AM, por sus siglas en inglés), las hifas penetran en las células de raíz para establecer una simbiosis intracelular. Mientras la AM es común a diversos taxones vegetales, las micorrizas ericoides y orquídeas están restringidas al orden Ericales y la familia Orchidaceae, respectivamente (Lanfranco *et al.*, 2016).

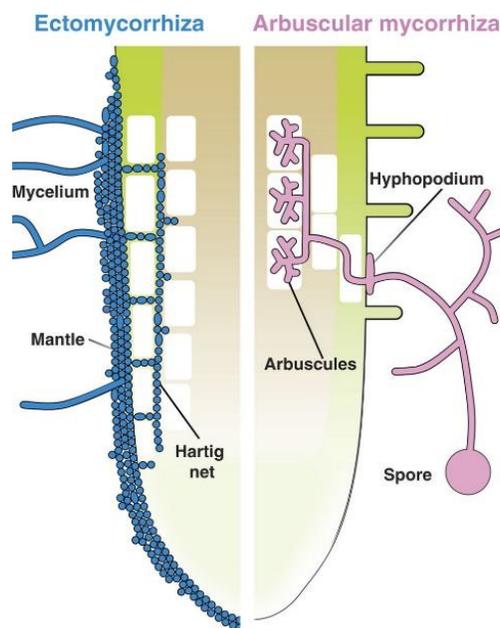


Figura 1.1 Estructuras de colonización de la raíz en las interacciones ectomicorrízica (azul) y micorrízica arbuscular (rosa). El hongo ectomicorrízico rodea la punta de la raíz con un manto grueso de hifas, mientras que la red de Hartig se desarrolla alrededor de las células epidérmicas (verde). En el caso de las micorrizas arbusculares, la punta de la raíz generalmente no está colonizada. Las hifas se desarrollan a partir de una espora y producen un hyphopodium en la epidermis de la raíz. La colonización intrarradical se produce tanto intra como intercelularmente y culmina con la formación de arbusculos, pequeños árboles fúngicos, dentro de las células corticales internas (café). (Bonfante y Genre, 2010).

1.4 Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son simbioses obligados, pertenecientes al filo Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001) y se asocia con más del 80% de las plantas terrestres actuales (Bonfante y Genre, 2010), estos hongos obtienen sus nutrientes orgánicos a través de una simbiosis obligada con plantas vasculares. En esta asociación mutualista, los HMA dependen del carbono procedente de la planta huésped y, a cambio, proporcionan a la planta de nutrientes esenciales como P, N, Zn y Cu (Smith y Lee, 2008; Feddermann *et al.*, 2010). Las micorrizas arbusculares tienen la capacidad de crecer en dos nichos diferentes: el suelo y el lumen de las células vegetales. En el suelo, la extensa red de hifas se ha estimado puede llegar a una densidad de 100 m/cm³ (Lanfranco *et al.*, 2016). Esta red de hifas puede adquirir agua y nutrientes con gran eficiencia y alcanzar un volumen de suelo que es inaccesible a las raíces, la presencia y la actividad de los micelios también influyen directamente en las propiedades físico - químicas del suelo. Dentro de su planta huésped, las micorrizas arbusculares penetran en las células individuales de la corteza de la raíz, donde desarrollan una estructura característica distintiva de esta asociación, el arbusculo (Lanfranco *et al.*, 2016). Además, la interacción de los HMA brinda grandes beneficios ecológicos, tales como un aumento de la calidad del suelo y de la biodiversidad de las comunidades vegetales asociadas. Como lo señalan muchos estudios las simbiosis de los hongos micorrízicos arbusculares influyen positivamente en la respuesta de las plantas a un estrés biótico y abiótico como la sequía, salinidad y contaminación de metales pesados (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007; Alguacil *et al.*, 2011; Nouri *et al.*, 2014; Augé *et al.*, 2015; Lanfranco *et al.*, 2016).

1.4.1 Simbiosis entre hongos micorrízico arbusculares y plantas

Los HMA han existido y co-evolucionado con las plantas desde hace al menos 450 millones de años (Redecker *et al.*, 2000). Una simbiosis que se ha desarrollado a lo largo del tiempo infiere de manera positiva para ambos organismos que participan en esta asociación. En cuanto a los hongos estos no pueden producir los carbohidratos fuera de una célula vegetal, así estos hongos dependen estrictamente en sus hospederos para su crecimiento y su reproducción, lo que les da el estado de biotrófos obligados. Desde un punto de vista evolutivo, el éxito ecológico de los hongos micorrízicos arbusculares

demuestra que las ventajas de una asociación tan estricta con las plantas han superado los riesgos derivados de la pérdida de capacidades saprófitas (Bonfante y Genre, 2010).

El establecimiento de la simbiosis hongo - planta requiere una serie de etapas de desarrollo. Con anticipación al contacto del hongo con las raíces de la planta se presenta una etapa difusible que media el reconocimiento recíproco entre los dos simbioses y se da por las llamadas moléculas pre simbióticas (Lanfranco *et al.*, 2016), la percepción de estos exudados vegetales liberados por la raíz del huésped, induce la ramificación repetida de las hifas, aumenta la probabilidad de un contacto directo entre los simbioses. Mientras tanto, los exudados fúngicos son percibidos por la raíz para dar paso a la colonización de los HMA (Bonfante y Genre, 2010).

Lo subsiguiente es el contacto de las hifas fúngicas con la epidermis de la raíz, donde forman estructuras de adhesión llamados hifopodios a través de la cual penetra en la epidermis (Harrison, 2012). En respuesta a estos estímulos químicos y físicos, la célula epidérmica en contacto desarrolla una estructura de alojamiento intracelular, llamado aparato de pre-penetración que desempeña un papel central en la elaboración del compartimiento interfacial apoplásico a través del cual el hongo crece cuando penetra en el lumen de la célula (Genre *et al.*, 2005). Dentro de la raíz, las hifas crecen inter e intracelularmente para llegar a las células corticales más profundas, donde desarrollan los arbusculos (Harrison, 2012). A medida que avanza la colonización de la raíz, el hongo explora el suelo, mediante el desarrollo de una amplia red de hifas, tales como el micelio extrarradical, que también puede producir una nueva generación de esporas asexuales (Lanfranco *et al.*, 2016).

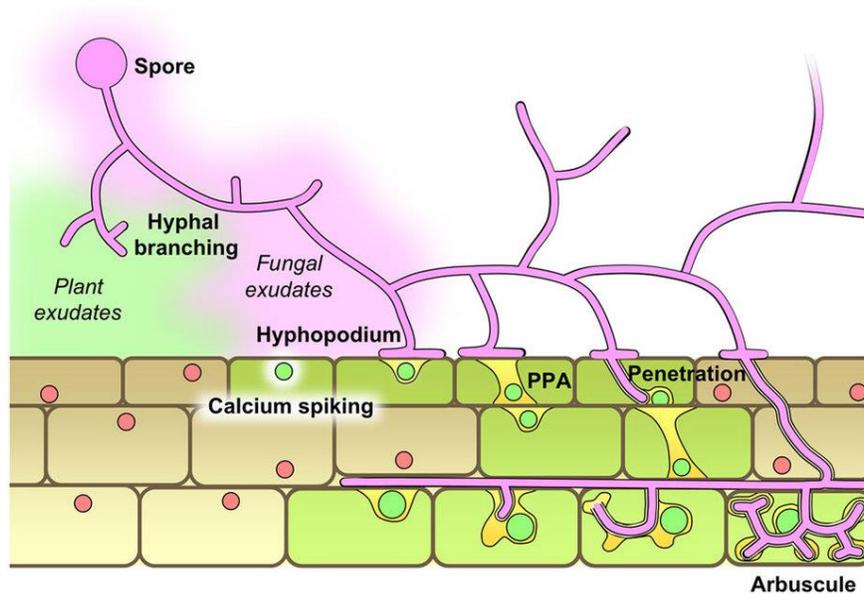


Figura 1.2 Proceso de colonización de las raíces por los HMA (Bonfante y Genre, 2010).

Las hifas extrarradicales de los HMA pueden clasificarse en tres tipos, según su morfología y las funciones que estas llevan a cabo:

1. Hifas infectivas: son aquellas las que inician los puntos de colonización en una o varias raíces.
2. Hifas absorbentes: son las encargadas de explorar el suelo para la extracción de nutrientes.
3. Hifas fértiles: son las que llevan las esporas (Barrer, 2009)

Las hifas infectivas presentan un crecimiento intra e intercelular en la corteza de la raíz, para formar dos tipos de estructuras, arbusculos y vesículas (Quilambo, 2003). Los arbusculos son hifas que se dividen dicotómicamente y son la principal interfaz para la transferencia de nutrientes en la simbiosis hongo-planta (Figura 1.2), estas estructuras efímeras colapsan y degeneran aproximadamente de 2 a 3 días después de la madurez (Gutjahr y Parniske, 2013), mientras que la célula huésped recupera su organización y puede someterse a una nueva colonización. En tanto las vesículas son estructuras de almacenamiento que se forman en la parte terminal de las hifas (Barker *et al.*, 1998).

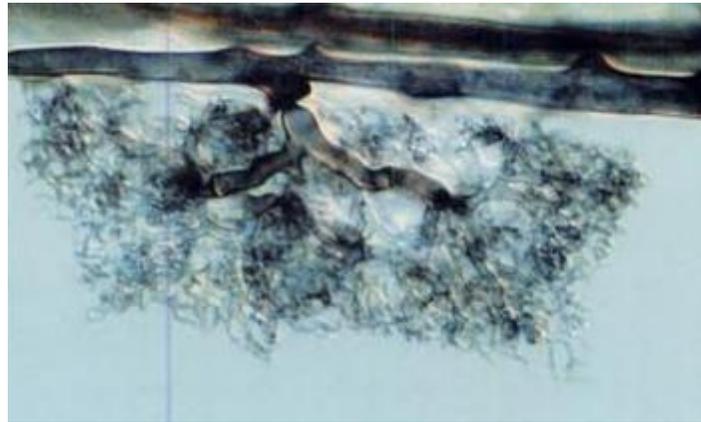


Figura 1.3 Arbusculo, imagen tomada de Peterson *et al.*, 2004.

Las interacciones mutualistas hongo-planta se basan en el intercambio de nutrientes, donde la absorción de nutrientes y la transferencia a la planta hospedera puede realizarse por el HMA debido a que este interactúa en dos nichos diferentes, en suelo y dentro de las células vegetales de la raíz. En el suelo la red de hifas adquiere nutrientes como fósforo (P), nitrógeno (N), azufre (S), que le son proporcionados a la planta y a cambio reciben C orgánico (Smith y Smith, 2011).

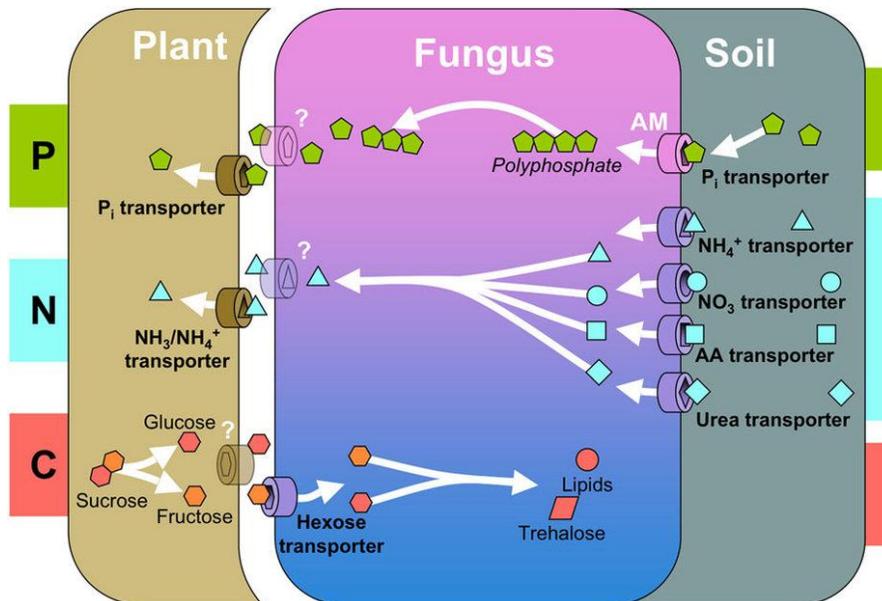


Figura 1.4 Intercambio de nutrientes HMA-Planta, se señala la translocación de fósforo (P), nitrógeno (N) y carbono (C) en la interfase suelo-hongo y hongo-planta. P inorgánico y formas minerales u orgánicas de N, tales como NH_4^+ (amoníaco), NO_3^- (nitrato) y aminoácidos (AA), son absorbidos por transportadores especializados situados en la membrana fúngica en el micelio extraradicular. La importación de carbono de origen vegetal

para el hongo es tomada por transportadores de hexosa, mientras que las proteínas de transporte implicados en la exportación de los nutrientes de la planta y el hongo no han sido identificadas aún (Bonfante y Genre, 2010).

1.4.2 Taxonomía y clasificación de los hongos micorrízicos arbusculares

La taxonomía y clasificación de los hongos micorrízicos han cambiado sustancialmente en los últimos años. Su identificación se basó en el estudio microscópico de la morfología de las esporas (Oehl *et al.*, 2011). Estas son descritas como redondeadas, de aproximadamente 30 a 400 μm de diámetro (Lanfranco *et al.*, 2016) e incluyen varios aspectos, como color, dimensión, forma, estructura de la pared celular, presencia de septos, la germinación y la conexión hifal o célula suspensoria (Brundrett *et al.*, 1996).

Los HMA se encuentran clasificados en el filo Glomeromycota, clase Glomeromycetes y cuentan con cuatro órdenes (Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaeosporales), 11 familias, 27 géneros y 270 especies (Schüßler, 2017); sin embargo, muchas de estas especies se encuentran sometidas a cambios constantes de clasificación taxonómica, y se encuentra en términos discutibles.

Actualmente, el uso de las herramientas moleculares como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se han vuelto una herramienta importante para la identificación de los HMA, donde esta técnica se ha basado en el análisis de las secuencias del ADN ribosomal (ADNr) que poseen una organización conservada del genoma para la clasificación de estos hongos (Simon *et al.*, 1992; Redecker, 2000; Clapp *et al.*, 2002; Rodríguez-Tovar *et al.*, 2004), que ha llevado a los análisis de los HMA a nuevas estrategias de identificación.

1.5 Simbiosis HMA - *Cocos nucifera* L.

La palma de coco tiene un sistema de raíces que está desprovisto de pelos radiculares; Es posible que la palma de coco no pueda absorber adecuadamente suficientes nutrientes, particularmente fosfóricos, y agua sin asistencia micorrízica (Rajeshkumar *et al.*, 2015). Se tiene conocimiento de la colonización de este importante cultivo por los hongos micorrízicos arbusculares (Johnston, 1949; Lily, 1975), Sosamma *et al.* (1990) aislaron diecinueve especies de HMA del suelo de la rizósfera de coco. A su vez Thomas y Ghai (1987) observaron variación de la colonización de hongos AM en relación a diferencias genotípicas de las plántulas de coco (los cultivares altos se colonizan más que

cultivares enanos y híbridos) y también reportaron que más de una especie de hongo micorrízico arbuscular colonizan las mismas plántulas de coco y los mismos segmentos de raíz.

En la actualidad se han reportado una variación significativa en la diversidad y riqueza de los HMA presentes en la rizósfera de cocotero evaluadas en plantaciones establecidas por el hombre (Varela y Trejo, 2001; Ambili *et al.*, 2012 y Rajeshkumar *et al.*, 2015), con variaciones en las condiciones de los cultivos, si estos se hayan con monocultivos o en sistemas mixtos donde se ha reportado hasta 40 especies de HMA en el cocotero (Rajeshkumar *et al.*, 2015).

De las diversas especies reportadas los géneros dominantes sobre este cultivo son *Gigaspora* y *Glomus* principalmente, aunque de igual manera se ha encontrado la presencia de *Claroideoglomus* y *Acaulosporaceae* (Thomas y Ghai, 1987; Michel-Rosales y Valdés, 1996; Varela y Trejo, 2001; Ambili *et al.*, 2012 y Rajeshkumar *et al.*, 2015)

1.6 Los HMA de la duna costera

Las plantas que crecen en la duna costera se hayan sujetas a un ambiente extremo, con poca disponibilidad de agua, nutrientes, una insolación constante, así como una elevada salinidad del suelo, donde los HMA juegan un importante papel en la supervivencia de la vegetación de este ecosistema (Levinsh, 2006). De hecho, se ha señalado que plantas propias de este ecosistema son incapaces de crecer si sus raíces no están asociadas con los HMA (Koske *et al.*, 2004) e incluso se ha descrito que en estos ecosistemas especies de plantas pertenecientes a familias consideradas no micorrízicas, han presentado colonización (Alarcón y Cuenca, 2005). Por otro lado, las hifas micorrízicas se unen a los granos de arena lo que facilita la estabilización de las dunas (Levinsh, 2006).

El uso de los HMA provenientes de la duna para aliviar el estrés salino ha mostrado tener bastos resultados, porque los HMA se adaptan con facilidad a ambientes de alto estrés salino y logran el establecimiento y crecimiento de cultivos alimenticios en condiciones de alta salinidad, por ejemplo, el sorgo (Yamato *et al.*, 2008). Diversos trabajos han señalado que el uso de los HMA provenientes de suelos y ambientes extremos como estrategias para mejorar la productividad de sus hospederos así como para establecer cultivos en suelos perturbados, han mostrado tener un mayor beneficio que los HMA provenientes se

suelos fértiles (Labidi *et al.*, 2015; Briccoli Bati *et al.*, 2015; Berruti *et al.*, 2016), lo que hace a la duna costera un importante reservorio de HMA que pueden ser empleados como biofertilizantes que puedan incrementar la productividad de diversos cultivos.

1.7 Los HMA como biofertilizantes

Reducir las limitaciones de la fertilidad de los suelos en la actualidad puede incluir la aplicación de fertilizantes inorgánicos, fertilizantes orgánicos y biofertilizantes. Los biofertilizantes son cada vez más incluidos en los programas de gestión integrada de la fertilidad del suelo (Vanlauwe *et al.*, 2010).

La intensificación del uso de biofertilizantes como los HMA está emergiendo como una alternativa ecológica, una práctica de la fertilización de los suelos con el potencial para aumentar, abaratar y sostener rendimientos de los cultivos en comparación con la aplicación continua de fertilizantes inorgánicos, sin dañar al medio ambiente (Sharma *et al.*, 2013).

La producción de HMA previamente seleccionados para su uso como biofertilizantes se inició desde la década de los 90 con buenos resultados en diferentes cultivos agrícolas (Torres-Ariasa *et al.*, 2016).

El uso de estos hongos no solo se ha limitado en su desarrollo para la mejora de cultivos agrícolas, su implementación para la fitorremediación ha logrado obtener resultados satisfactorios para dar paso a restauración de áreas degradadas (Yang *et al.*, 2016; Hashem *et al.*, 2016), además a partir de la inoculación de estos hongos en plantas obtenidas por cultivo *in vitro* se lograron obtener efectos significativos en el crecimiento y la nutrición de las plantas inoculadas (Alarcón *et al.*, 2000).

La fase de aclimatación de las plántulas cultivadas *in vitro* es uno de los pasos fundamentales en la adaptación estructural y fisiológica de las plántulas obtenidas, pues en este paso las plantas obtenidas empiezan a ser autótrofas. Durante el desarrollo de este paso las plántulas deberán aumentar su tasa fotosintética, así como aumentar la absorción de agua y minerales (Grattapaglia y Machado, 1990).

El uso de los HMA en plantas micropropagadas ha sido ampliamente reportada y se ha descrito la mejora en el crecimiento y desarrollo de las plántulas micropropagadas

colonizadas por los HMA (Vidal *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 1998; Gaur y Adholeya, 2000; Estrada Luna *et al.*, 2000; Taylor y Harrier, 2001; Puthur *et al.*, 1998; Subhan *et al.*, 1998; Yano-Melo *et al.*, 1999). Se ha demostrado que los efectos beneficiosos de la simbiosis HMA con las raíces de las plántulas micropropagadas se manifiestan en el desarrollo de plantas con altas tasas de fotosíntesis y transpiración, mejor absorción de agua y nutrientes y mayor tolerancia de las plantas al estrés (Azcon-Aguilar *et al.*, 1996; Jaizme-Vega *et al.*, 1997), con los beneficios nutrimentales aportados por los HMA, el período de aclimatación de plántulas micropropagadas también se puede acortar (Salamanca *et al.*, 1992)

En ese tenor la inoculación con HMA a las plántulas procedentes de cultivo *in vitro* de cocotero pudieran ayudar a aclimatarse en etapas temprana y ahorrar tiempo y espacio en la biofábrica.

El uso de los biofertilizantes como los HMA no solo puede reducir los tiempos de cultivos *in vitro* de diferentes especies (Salamanca *et al.*, 1992; Kavoo-Mwangi *et al.*, 2013), sino también se ha demostrado su aplicación exitosa en el establecimiento en campo abierto de diversos cultivos de importancia alimentaria, pues se ha incrementado en estos la resistencia a diversos factores bióticos y abióticos determinando que los HMA contribuyen y pueden ser responsables de la adaptación de las plantas a las condiciones ambientales adversas, esto aunado al incremento de la productividad del hospedero (Rodríguez *et al.*, 2004; Ortas, 2010; Affokpon *et al.*, 2011; Estrada *et al.*, 2013; Briccoli Bati *et al.*, 2015).

1.8 El pH del suelo en los HMA

Los HMA adecuados para la explotación comercial no sólo deben ser eficaces para aumentar el crecimiento de las plantas, sino que deben establecerse y persistir en los suelos en los que se inoculan. Entre el gran número de especies de HMA hay una variación considerable en el efecto del pH del suelo tanto en la colonización (Mosse, 1972) como en la germinación de esporas (Green *et al.*, 1976). Es así como el pH del suelo, puede ser determinante importante de la distribución de algunas especies de HMA y en la eficacia de las asociaciones micorrízicas (Abbott y Robson, 1977; Wang *et al.*, 1985). La variación del pH del suelo puede afectar tanto el desarrollo como el

funcionamiento de los HMA (Mosse, 1972; Hayman y Tavares, 1985; Abbott y Robson, 1985) además de la germinación y crecimiento de las hifas de las esporas de algunas especies de hongos micorrízicos VA (Green *et al.*, 1976), esto trae consigo implicaciones importantes para la aplicación comercial de hongos micorrízico arbusculares en la agricultura en general, así lo mencionan Porter *et al.* (1987) quienes obtuvieron que *Glomus* sp. (WUM3) se limita a pH superiores a 6.8, ya que bajo estos niveles no se halló ninguna espora de esta especie, caso contrario para la especie *A. laevis* en el cual ninguna muestra de suelo de pH superior a 6.4 contenía esporas, en el cual sólo los suelos muy ácidos (pH 4.5 - 4.9) contenían un gran número de esporas de *A. laevis*. Por lo tanto, el pH del suelo debe considerarse un factor importante que afecta la distribución y abundancia de los HMA.

1.9 Métodos de producción de HMA

Las ventajas que los HMA otorgan a sus hospederos como una mayor productividad y una mayor resistencia de las plantas contra los estreses bióticos y abióticos (Smith y Read, 2008) han dado paso al aprovechamiento de estos importantes biotrófos para diferentes fines aplicativos y en la actualidad, se los considera cada vez más en los programas de agricultura, horticultura y silvicultura, así como en la recuperación ambiental, tanto para aumentar el rendimiento y la salud de los cultivos como disminuir y/o limitar la aplicación de agroquímicos (Gianinazzi *et al.*, 2002; Johansson *et al.*, 2004).

La naturaleza biotrófica obligada de los HMA ha complicado el desarrollo de métodos de producción a gran escala rentables para la obtención de inóculo de alta calidad, lo que ha limitado la explotación comercial. El gran interés sobre la explotación de estos hongos ha llevado al desarrollado muchas técnicas y productos de cultivo diferentes, todos con ventajas y limitaciones específicas en cuanto a su diseño, comercialización y dominio de aplicación, englobándolas en tres categorías; la clásica basada en sustratos, los sistemas sin sustrato (hidroponía y aeroponía) y los sistemas de cultivo *in vitro* (Ijdo *et al.*, 2011).

1.9.1 Cultivos trampa basados en sustratos

Al ser simbioses obligados los HMA no puede ser cultivados en cultivos puros en ausencia de sus plantas huésped (Berruti *et al.*, 2016) por lo tanto, su propagación se lleva a cabo bajo el establecimiento de cultivos trampa, utilizando suelo a granel o

mediante la mezcla del suelo y piezas de raíces de la rizósfera con diluyentes esterilizados y creciendo con huéspedes adecuados, esto representa una de las estrategias para producir un gran número de esporas saludables que puede ser fácilmente identificables y complementar la evaluación de la diversidad de especies locales en diferentes los ecosistemas (Leal *et al.*, 2009).

El establecimiento de los cultivos trampa es fundamental para una propagación exitosa del inóculo inicial. El desarrollo de los cultivos trampa requiere de estrictos manejos, ya que diversos factores en los cultivos trampa podrían impedir la propagación de todas las especies presentes en el inóculo inicial, estos factores pueden ser el tipo de suelo o sustrato, la manipulación de los cultivos y las especies de plantas empleadas para propagar los HMA en los cultivos trampas (Yao *et al.*, 2010). Además, la explotación de estos hongos en los programas aplicativos requiere que los HMA puedan adaptarse a los ecosistemas donde serán introducidos, al tipo de suelos de estos y a los acontecimientos que conducen al establecimiento de una simbiosis funcional, incluyendo los mecanismos implicados en la transferencia de nutrientes (Berruti *et al.*, 2016). Ya que estos son simbiontes obligatorios con raíces vivas, el nivel de producción de propágulos infecciosos depende de las especies de plantas huésped (Gaur y Adholeya, 2002), así pues los anfitriones juegan un papel importante en el desarrollo de micorrizas, la formación de esporas y distribución de los hongos MA, *Trifolium repens*, *Zea mays*, *Sorgo sudanense* y *Vigna unguiculata* (Liu y Wang, 2003; Lopes *et al.*, 2009) son algunos de las plantas trampas que se pueden implementar en estos cultivos. Yao *et al.* (2010) mencionan que *Zea mays*, es la planta trampa que muestra la mayor diversidad y riqueza de especies de hongos MA en el sustrato donde esta es cultivada.

La producción de HMA por cultivos trampa en sustrato es el más empleado, debido a su facilidad de establecimiento y el bajo costo de los consumibles, además de la alta densidad de propágulos infectivos obtenidos, los cultivos trampa en sustrato son considerados como el sistema más conveniente en la producción a gran escala de los HMA (Feldmann y Grotkass, 2002)

Son diversos los esfuerzos que se han realizado para el establecimiento de cultivos trampa en sustrato que presenten una alta productividad, en cuyos esfuerzos se ha evaluado el tipo de suelo a emplear, la planta trampa idónea, el tipo de sustrato a

emplear, así como las especies de HMA a propagar, se presenta en el Cuadro 1.1 algunos de los trabajos encaminados a la producción de HMA bajo cultivos trampa en sustrato.

Cuadro 1.1 Producción de HMA en cultivos trampa con sustrato, se presenta el total producción de esporas de diversas plantas trampa.

| | <i>Zea mays</i> | <i>Sorghum bicolor</i> | <i>Trifolium repens</i> | <i>Plantago lanceolata</i> | <i>Panicum maximum</i> |
|------------------------------------|-----------------|------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------|
| Bagyaraj y Manjunath, 1980 | - | 346/50 ml | - | - | 728/50 ml |
| Sreenivasa y Bagyaraj, 1988 | - | - | - | - | 566/50 ml |
| Gaur y Adholeya 2000 | 700/100 ml | - | - | - | - |
| Gryndler et al., 2003 | - | - | - | 163/g-1 | - |
| Carrenho et al., 2002 | 4152/kg | 3498/kg | - | - | - |
| Yao et al., 2010 | 3936/kg | 2323/kg | 1061/kg | - | - |
| Liu y Wang, 2003 | 378/maceta | - | 410/maceta | - | - |

Pese a ser *Plantago lanceolata* una de las mejores plantas trampa para fines de incrementar el número de esporas de un inoculo inicial, este no es viable para sitios con alta luz y temperaturas cálidas, así mismo su capacidad para soportar la esporulación de todos los organismos fúngicos en una mezcla de especies es muy baja según lo describen Colección internacional de cultivos de hongos micorrízicos arbusculares (INVAM, por sus siglas en inglés) quienes también describen al sorgo y al maíz como grandes hospederos y con mayor adaptabilidad a diferentes suelos y climas.

1.9.2 Cultivos sin sustrato (hidroponía y aeroponía)

Los cultivos sin sustrato también denominados "técnicas de cultivo en solución" debido a que las raíces micorrizadas y las partes extra-radicales de los hongos se hayan embebidos en una solución de nutrientes, la NFT (técnica de flujo de nutrientes) es una de las técnicas más empleadas en los cultivos sin sustrato y consta en el flujo de una solución delgada de nutrientes en canales a menudo inclinados (también llamados gaviotas) donde las raíces de las plantas y el HMA se desarrollan. El uso de una película

de nutrientes que cubre las raíces aumenta el área relativa para el intercambio de gases y supera los problemas de aireación insuficiente y fue patentada por Mosse y Thompson en 1981 (Patente de Estados Unidos N° 4294037)

La aeroponía al igual que en la hidroponía las raíces y el HMA se bañan en una solución, la diferencia radica en el uso de una niebla como solución de nutrientes (Zobel *et al.*, 1976). La pulverización de microgotas aumenta la aireación del medio de cultivo y, además, la película líquida que rodea las raíces permite el intercambio de gases. Esta niebla se puede aplicar mediante diversas técnicas que difieren principalmente en el tamaño de las gotas finas producidas.

En sistemas de producción libres de sustrato (es decir, hidroponía y aeroponía) se pueden emplear diferentes especies de plantas hospederas (similares a los cultivos en sustrato) y existe una diversidad en el uso de nutrientes para la composición de las soluciones, tanto las especies como los nutrientes son determinantes para el éxito en la producción del inóculo micorrízico (IJdo *et al.*, 2011).

Pese a ser una opción para la producción de HMA, estos aun presentan retos que superar, en el caso de la hidroponía las soluciones de nutrientes líquidos son propensas a la multiplicación y diseminación de contaminantes microbianos, así como al desarrollo de algas (Elmes y Mosse, 1984) en el caso de la aeroponía se han obtenido resultados prometedores para su uso en la producción de estos hongos (Mohammad *et al.*, 2000); sin embargo, el desarrollo y establecimiento de esta técnica es costoso.

1.9.3 Cultivos *in vitro* de HMA

El desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* de los HMA ha ido avanzando con mesura y el éxito que está obteniendo genera grandes expectativas de sus aplicaciones para la producción a gran escala de estos biotrófos, esta técnica se basa en el uso del cultivo de órganos de raíz (ROC, por sus siglas en ingles) en medios que contienen micronutrientes y macronutrientes, así como vitaminas y sacarosa (Cranenbrouck *et al.*, 2005), estos pueden solidificarse con un agente gelificante tal como PhytaGel (Sigma) y GelGro (MP Biomedicals) o mantenerse líquido dependiendo del sistema a emplear (Gadkar *et al.*, 2006). Usualmente el brote se desarrolla fuera de la placa de Petri, mientras que las raíces y el hongo se asocian dentro de las placas de Petri llenas con un medio gelificado

adecuado (Voets *et al.*, 2005). Pese a las grandes ventajas que este sistema ofrece, una desventaja sustancial es la falta de diversidad (en términos de géneros) de los hongos que se han logrado cultivar *in vitro* que es mucho menor que en los sistemas de cultivo en sustrato, aunado a esto la producción *in vitro* representa elevados costos asociados con los sistemas de producción, que requieren personal calificado y equipos de laboratorio tales como flujos de trabajo estériles, incubadoras controladas para ROC y cámaras de crecimiento para sistemas de plantas (Ijdo *et al.*, 2011).

1.10 Pastos como hospederos para la producción de HMA

Los pastos como el Guinea (*Panicum maximum*) es generalmente reconocida como una de las mejores gramíneas forrajeras de los trópicos, con buen potencial de rendimiento y que proporciona forraje de alta calidad (Mishra *et al.*, 2008). Es una planta perenne alta y de crecimiento vigoroso; es nativa de África tropical y subtropical, y se naturaliza en la mayoría de los países tropicales, su distribución en México se ha registrado en Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Grof y Harding, 1970; Vibrans, 2009). Este pasto es un hospedador propicio para el mantenimiento y la producción en masa de hongos micorrízico arbusculares dice Bagyaraj y Manjunath, (1980) quienes en su trabajo analizaron ocho especies de gramíneas y se determinó que el pasto guinea es un mejor hospedador ya que es más susceptible a la colonización y también es compatible con una mayor producción de esporas por parte del hongo micorrízico arbuscular. En el trabajo reportado por Sreenivasa y Bagyaraj (1988), describen a los pastos como buenos productores de HMA, en este trabajo destacan a dos especies de pastos como grandes productoras; *Chloris gayana* y *Panicum maximum*, donde la primera produjo mejor para una especie en específico de HMA y la otra para una mayor diversidad de HMA, como tal el uso de pastos como las gramíneas abren la vertiente para el uso de diferentes hospederos de HMA en la producción masiva de estos valiosos simbioses.

1.11 Origen del inóculo: HMA nativos

Así como los hospederos son un elemento importante para garantizar la obtención de la mayor diversidad de especies, esporas, hifas y elevado porcentaje de colonización de los HMA del inóculo inicial (Liu y Wang, 2003; Lopes *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2010), este

inóculo es un elemento clave para garantizar el éxito del producto en los diferentes fines aplicativos (Berruti *et al.*, 2016). Debido a que algunas especies de HMA son comúnmente señaladas como más tolerantes al estrés que otras, y generalmente estas se encuentran en suelos estresados y contaminados (Leyval *et al.*, 2002; Hildebrandt *et al.*, 2007), se ha incursionado en el uso de inóculo nativo de diversas regiones sometidas a diversos factores ambientales adversos (sequia, salinidad, metales pesados, etc.) que han demostrado ser más eficientes al otorgar beneficios a las plantas dirigidas que la inoculación de HMA comerciales. Affokpon *et al.* (2011) al usar inóculo de HMA nativo en el cultivo, en campo, de tomate y zanahoria redujeron significativamente los daños en la raíz y la reproducción de los nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp.), además se incrementó los niveles de producción. El uso de los HMA nativos contra el estrés salino en cultivos de importancia mundial como el maíz ha tenido resultados satisfactorios. Por ejemplo, Estrada *et al.* (2013) describieron como los HMA nativos aislados de un ambiente seco y salino influyen positivamente sobre el maíz, que mostró una mayor eficiencia del fotosistema II y la conductancia estomática, lo que disminuyó la fotorrespiración y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), en donde la acumulación de peróxido de hidrógeno, el daño oxidativo a lípidos y la fuga de electrolitos de membrana fueron significativamente más bajos en las plantas micorrizadas con los HMA nativos de suelos secos y salinos contrario a las plantas no micorrizadas y en las plantas inoculadas con los HMA comerciales. Aunado a esto se ha observado mayor crecimiento de plantas en suelos contaminado con Mn al introducir los HMA nativos en estas regiones (Briccoli Bati *et al.*, 2015). Como tal los beneficios de los HMA nativos frente a los de uso comercial demuestran ser superiores y hacen a los hongos nativos los idóneos para lograr el éxito en los diversos usos aplicativos a los que se destinan.

JUSTIFICACIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares son uno de los componentes principales de la comunidad microbiana de los suelos, que se asocia con más del 80% de las plantas terrestres actuales (Alguacil *et al.*, 2011; Montes Borrego *et al.*, 2014; Bonfante y Genre, 2010). Estos HMA otorgan grandes beneficios a sus plantas huéspedes como P, N, Zn y Cu que son nutrientes esenciales para la planta, así mismo, estos hongos influyen positivamente en la respuesta de las plantas a un estrés biótico y abiótico como la sequía, salinidad y contaminación de metales pesados (Lanfranco *et al.*, 2016). Por ende la importancia de los HMA radica en el mejoramiento de la salud, alimento y el crecimiento de las plantas tanto de importancia agrícola como hortícola y forestal (Bagyaraj y Stürmer *et al.*, 2012). Aunado a la mejora del estado nutricional de las plantas hospedadas Bender *et al.* (2014) han demostrado que los HMA contribuyen a reducir las emisiones de N₂O, un importante gas de efecto invernadero, por lo que sugieren que estos hongos podrían desempeñar un papel en la mitigación del cambio climático. Debido a los grandes beneficios que estos hongos ofrecen y su uso como herramienta biotecnológica ha demostrado ayudar a superar limitaciones en cultivos de importancia, donde se ha descrito un incremento en la productividad de plantas inoculadas (Al-Karaki *et al.*, 2004; Mamatha *et al.*, 2002), así como resistencia a sequía y salinidad (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010; Sheng *et al.*, 2008) donde los HMA que han demostrado ser más eficientes son los HMA nativos de suelos perturbados o estresantes (Briccoli Bati *et al.*, 2015; Labidi *et al.*, 2015).

El cocotero es un cultivo de gran importancia económica, ya que millones de personas en 93 países dependen de este cultivo para la seguridad de su sustento, el cocotero es cultivado principalmente en zonas costeras tropicales y subtropicales (Rajesh *et al.*, 2012; FAOSTAT, 2013), actualmente este importante cultivo enfrenta muchos retos, entre ellos está la disminución de la productividad, que se ve afectada por la edad, la degradación de los nutrientes del suelo, daños causados por los ciclones y las tormentas (Sisunandar *et*

al., 2010; Samosir y Adkins, 2014), además de la rápida propagación de las principales plagas y enfermedades incurables (Córdova *et al.*, 2003; Harrison y Jones, 2003; Lee, 2013). Gran parte de esta problemática del cocotero puede subsanarse resembrando plantas resistentes a enfermedades y altamente productivas, mejoradas por técnicas convencionales mediante semillas, o a través de la obtención de plántulas mediante el cultivo *in vitro*. Ambos métodos exigen la pronta adaptación y supervivencia a condiciones de campo de las plántulas para una mayor productividad donde eventualmente la inoculación con HMA podría representar una ventaja.

Diversos estudios han determinado que el cocotero es una especie que posee asociaciones simbióticas con diferentes especies de HMA (Thomas y Ghai, 1987; Michel-Rosales y Valdés, 1996; Varela y Trejo, 2001; Ambili *et al.*, 2012 y Rajeshkumar *et al.*, 2015), y por su sistema radicular desprovisto de pelos de la raíz necesita de la asistencia de los HMA para la adecuada absorción de nutrientes y agua (Rajeshkumar *et al.*, 2015).

El uso de estos hongos no se ha limitado al desarrollo para la mejora de cultivos agrícolas, su inoculación en plantas obtenidas por cultivo *in vitro* lograron obtener efectos significativos en el crecimiento y la nutrición de las plantas inoculadas (Alarcón *et al.*, 2000), desafortunadamente, la explotación de estos hongos en los programas aplicativos requiere que los HMA puedan adaptarse a los ecosistemas donde serán introducidos, al tipo de suelos de estos y a los acontecimientos que conducen al establecimiento de una simbiosis funcional. Los HMA son simbioses obligados y como tal no pueden ser cultivados separados de la planta huésped (Berruti *et al.*, 2016). Una de las estrategias para producir un gran número de esporas saludables es la instauración de un cultivo trampa (Leal *et al.*, 2009). Sin embargo, el desarrollo de los cultivos trampa requiere de estrictos manejos, factores como el tipo de suelo o sustrato, la manipulación y las especies de plantas utilizadas para propagar los HMA en los cultivos trampa (Yao *et al.*, 2010).

Por lo cual, el presente estudio se basa en la identificación morfológica y molecular de HMA nativos de la duna costera yucateca asociados a cocotero, para su uso como inóculo inicial en el desarrollo de cultivos trampa idóneos para la propagación masiva de estos hongos, enfocada al desarrollo de un inóculo con alto potencial para su uso en cultivos

establecidos de cocotero, en la resiembra de plantas obtenidas mediante semillas y plántulas de obtenidas *in vitro*.

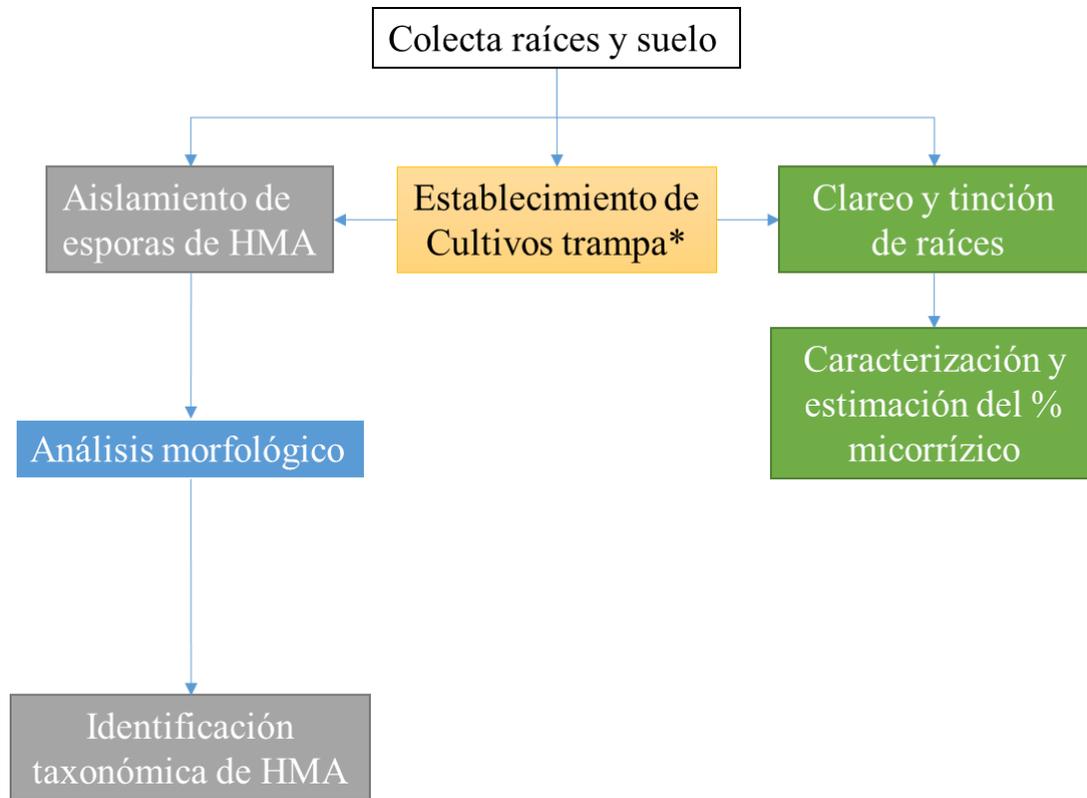
OBJETIVO GENERAL

Caracterizar morfológicamente los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) asociados a cocotero y determinar la planta trampa adecuada para la producción de inoculo micorrízico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar morfológicamente las esporas asociadas a cocotero en la duna costera de la Península de Yucatán, así como determinar el número de esporas en el suelo y el porcentaje de colonización micorrízica.
- Identificar morfológicamente las esporas asociadas a frijol, sorgo, maíz y pasto guinea utilizadas como cultivos trampa, así como determinar el número de esporas en el suelo y el porcentaje de colonización micorrízica.
- Evaluar la diversidad de las especies de hongos micorrízicos arbusculares asociados a cocotero en diferentes zonas de la duna costera de la Península de Yucatán.
- Comparar la diversidad de las especies de hongos micorrízicos arbusculares producidos por las diferentes especies de plantas utilizadas como cultivos trampa.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudios

El estudio se realizó en la duna costera del estado de Yucatán, los sitios de muestreo fueron Celestún, Chicxulub, la plantación experimental de “Caridad del cobre”, San Crisanto y el Cuyo en Yucatán, México.

2.2 Muestreo del suelo

El suelo y las raíces de la rizósfera se obtuvo de las plantaciones de cocotero en Caridad del Cobre (San Crisanto), Celestún, Chicxulub y el Cuyo. Se colectó arena de la playa que fue empleada para establecer los cultivos trampa. Se retiró la superficie del suelo (aproximadamente 1 mm) y se colectó suelo de 0 a 20 cm de profundidad, se mezcló para formar muestras de suelo compuestas que fueron depositadas en bolsas separadas. De cada plantación se colectaron muestras de suelo y raíces a partir de tres palmas jóvenes y adultas para formar una muestra de suelo compuesta y otras de raíces. En total se obtuvieron 6 muestras de suelo de la rizósfera y 6 de raíces, durante marzo del 2017 para el análisis de colonización, diversidad y establecimiento de cultivos trampa.

2.3 Aislamiento e identificación de esporas

A partir de las muestras obtenidas de la rizósfera de cocotero en los diferentes puntos de la duna costera del estado de Yucatán, México, donde se hallaron plantaciones de este cultivo, se aislaron las esporas para determinar morfológicamente las especies que se hallaban en estas y su posible asociación con el cocotero. Tres muestras de 10 g de suelo fueron tomadas de cada muestra recolectada en campo para el estudio, para tener un total de tres réplicas de cada una de las 6 muestras obtenidas en cada punto evaluado. Las esporas de los HMA fueron extraídas por tamizado húmedo (45, 100, 250, y 355 aberturas de tamiz) y el método de decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963) en combinación con la técnica de flotación en azúcar (Walker, 1997). Las esporas fueron observadas y contabilizadas bajo el microscopio estereoscópico. Las esporas que presentaron caracteres morfológicamente similares fueron agrupadas en un solo conjunto.

El número de esporas en cada morfotipo se registró con el fin de construir la composición de la comunidad de esporas. El recuento de esporas se calculó como el número total de esporas en cada muestra de suelo (esporas por 10 g de suelo). Además, las esporas intactas y trituradas se montaron en portaobjetos en polivinil-lactoglicerol (PVLG) mezclada con el reactivo de Melzer y se examinaron bajo un microscopio compuesto. Las esporas se identificaron a nivel de especie en base al color de esporas, el tamaño, la ornamentación de la superficie y estructura de la pared. Los cultivos trampa fueron evaluados bajo las metodologías de Almeida y Schenck (1990), Morton y Benny (1990) para el conteo e identificación de las especies de las esporas de los HMA; sin embargo, este fue evaluado en dos periodos de tiempo después de su establecimiento, a los cuatro y seis meses. Para determinar el avance de la micorrización, se aislaron esporas para determinar el número total de esporas y se identificaron las especies propagadas en los cultivos trampa, posteriormente se realizó una evaluación de estos mismos cultivos transcurridos 2 meses, es decir, se cosechó 6 meses después de su establecimiento, de nueva cuenta se aisló el número total de esporas presentes y se identificaron las especies presentes, esto con la finalidad de determinar el comportamiento de la producción de los HMA en los cultivos trampa.

2.4 Colonización de la raíz

Las raíces fueron lavadas para separar las partículas de suelo adheridas, y se cortaron las raíces usando un bisturí, donde se generaron fragmentos de aproximadamente 1 cm, posteriormente, se tiñó con azul de tripano al 0.05% siguiendo el protocolo descrito por Phillips y Hayman (1970).

2.5 Estimación de la colonización micorrízica

Las raíces teñidas de cada individuo se montaron por duplicado en portaobjetos con lactoglicerol, distribuyendo 10 fragmentos de aproximadamente 1 cm por cada portaobjetos donde se analizó en un microscopio compuesto (Leica DM1000). Por cada sitio se analizaron un total de 10 preparaciones equivalentes a 100 cm de raíz. La colonización se evaluó utilizando la metodología de cuantificación múltiple MQM (Ormsby *et al.*, 2007; Kaminskyj, 2008) modificada de McGonigle *et al.* (1990). Para cada individuo se analizaron aproximadamente 150 intersecciones separadas a la misma distancia (1-2 mm) observando con los objetivos 20x, 40x y 100x. En la intersección se registraron por

separado: hifas septadas típicas de HMA, vesículas, arbuscúlos e hifas intracelulares enrolladas similares a ovillos (coils). Los trabajos de realizados por Dickson *et al.* (2007) y Kubota *et al.* (2005) se emplearon como referencia para la clasificación de morfología de colonización. Las estructuras micorrízicas encontradas se documentaron con una cámara digital (Sony Cyber-shot DSC-W320).

Particularmente las raíces de los cultivos trampa fueron evaluadas en dos tiempos pasados su establecimiento, el primero al cuarto mes y el segundo al sexto mes.

2.6 Establecimiento de cultivos trampa

Los cultivos trampa se establecieron y dejaron crecer durante un máximo de seis meses bajo condiciones de invernadero, se realizaron dos metodologías que variaron el proceso de la instauración y el uso de fertilizantes.

Los primeros cultivos se establecieron en macetas con capacidad para 12 L, donde se colocaron 800 g de la muestra de suelo, un grosor de 0.5 cm piezas de raíz esterilizadas en hipoclorito de sodio al 5%, distribuidas sobre 12 cm de arena previamente esterilizada 3 veces por autoclave (121°C, 1 h con intervalos de 24 h entre cada tratamiento) para ser cubierto por 6 cm de arena estéril, después se colocaron las semillas a 2 cm de profundidad. Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) y del pasto guineo (*Panicum maximum*) los cuales fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio al 0.5% durante 15 min. Para el caso del maíz y el frijol se emplearon 3 semillas por cada maceta, para el sorgo 6 semillas y el pasto 10 semillas, su riego se realizó cada dos días debido a las condiciones climáticas de la región (elevadas temperaturas) a la cual no se le aplicó fertilización. Sin embargo, esta primera metodología presentó dificultades, la cual sólo funcionó para el pasto guineo.

En botes de plástico de 1774 mL (15 cm de ancho y 14.5 cm de alto), las raíces recolectadas previamente cortadas en tamaños de 1 cm y esterilizadas en hipoclorito de sodio al 5%, fueron establecidas como una capa de 0.5 cm de grosor junto a 200 g de suelo (mezcla de suelos recolectados) sobre 10 cm de arena previamente esterilizada tres veces por autoclave (121°C, 1 h con intervalos de 24 h entre el tratamiento en autoclave) que se depositó previamente en los vasos y posteriormente se cubrieron con una capa de 5 cm de arena estéril mezclada con suelo recolectada de la selva baja (mezcla 1:1) cuyo

suelo también fue previamente esterilizada 3 veces por autoclave (121 °C, 1 h con intervalos de 24 h entre el tratamiento en autoclave). Antes de la siembra, las semillas de Maíz, frijol, sorgo y pasto guinea fueron superficialmente desinfectados por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante 15 min. Después de lavar las semillas con agua destilada, se sembraron a 2 cm de profundidad en cada maceta y se cubrieron con la mezcla de arena estéril y suelo de selva baja estéril. En una maceta se sembraron 3 semillas de maíz, en otra, 3 semillas de frijol, 6 semillas de sorgo y 10 semillas de pasto guinea. Se sembraron 4 réplicas por cada especie y todas las plántulas germinadas se mantuvieron en el contenedor por el transcurso de 6 meses. Las macetas se regaron tres veces a la semana y según fuese necesario (debido a las elevadas temperaturas de la región), se añadieron fertilizantes (solución de Hoagland al 15%, sin fosforo) una vez cada semana en los primeros 2 meses de sembrado de las semillas, posteriormente a los 2 meses se incrementó la fertilización a 2 veces por semana. Todos los cultivos establecidos fueron evaluados al transcurrir cuatro y seis meses después de su instauración.

El conteo e identificación de esporas, así como los porcentajes de colonización de las raíces fueron como se ha señalado, evaluados bajo los procedimientos descritos anteriormente.

2.7 índice de diversidad

La colonización micorrízica y la abundancia de esporas se analizó mediante una prueba Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). El índice de diversidad de Shannon-Wiener (H') se calculó de acuerdo a la fórmula: $H' = -\sum (P_i \ln[P_i])$. Donde P_i es la abundancia relativa, \ln es el logaritmo natural. El índice de equitatividad de Pielou (J') se obtuvo a partir de la ecuación: $J' = H' / \log(S)$, donde S es el número total de especies aisladas en cada sitio. El índice de dominancia de Simpson (D) por la fórmula: $D = \sum P_i^2$ a partir de cual se obtuvo el índice de diversidad de Simpson ($D_s = 1 - D$). Para el análisis de los datos se utilizó el programa PAleontological STatistics (PAST) (Hammer *et al.*, 2001).

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Aislamiento de esporas: Muestras de la duna costera de Yucatán

El número total de esporas no presentó diferencias significativas entre los distintos puntos de muestreo (San Crisanto plantación, San Crisanto duna, Celestún duna, Celestún ciénega, El Cuyo duna y Chixulub) (Kruskal-Wallis, $p = 0.2451$), con un mínimo de 127 ± 15.28 y un máximo de 162 ± 44.04 esporas en promedio por 10 g de suelo (Figura 3.1). La mayor abundancia de esporas se registró en la duna de Celestún (162 ± 44), el número promedio general de esporas presentes en la rizósfera de cocotero en los diferentes puntos de la duna yucateca fue de 139.3 por cada 10 gramos.

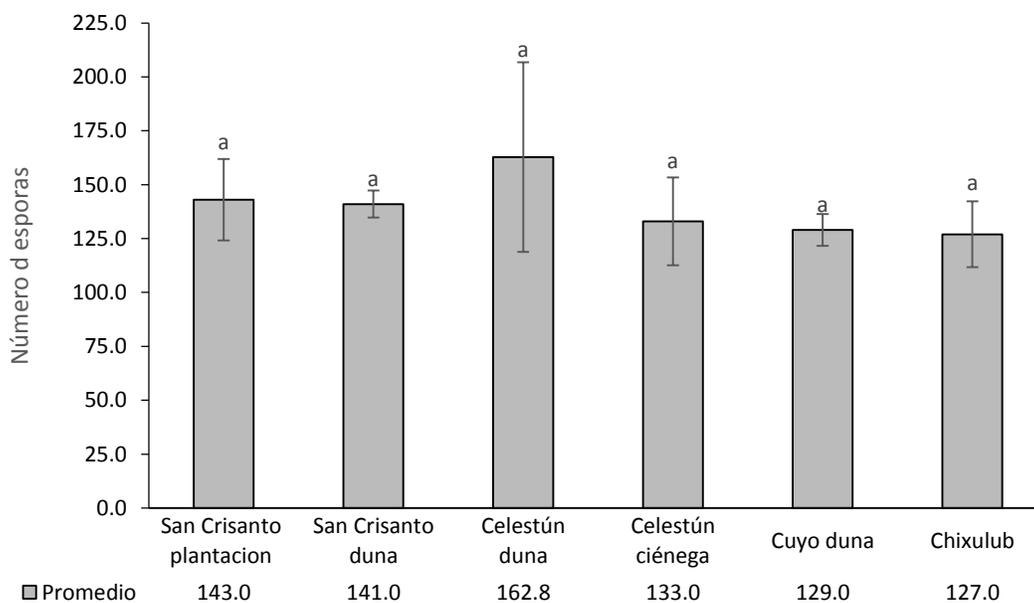


Figura 3.1 Número promedio de esporas en los diferentes sitios de la duna costera yucateca. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes ($p = 0.2451$).

3.1.1 Especies de esporas identificadas en la rizósfera de cocotero

Del número total de esporas aisladas se lograron identificar 21 especies diferentes, que se muestran en la Figura 3.2, en el total de las especies identificada se encontró que *Rhizophagus aggregatus* es la más común, seguida por *Acaulospora scrobiculata* y posteriormente *Glomus glomerulatum*.

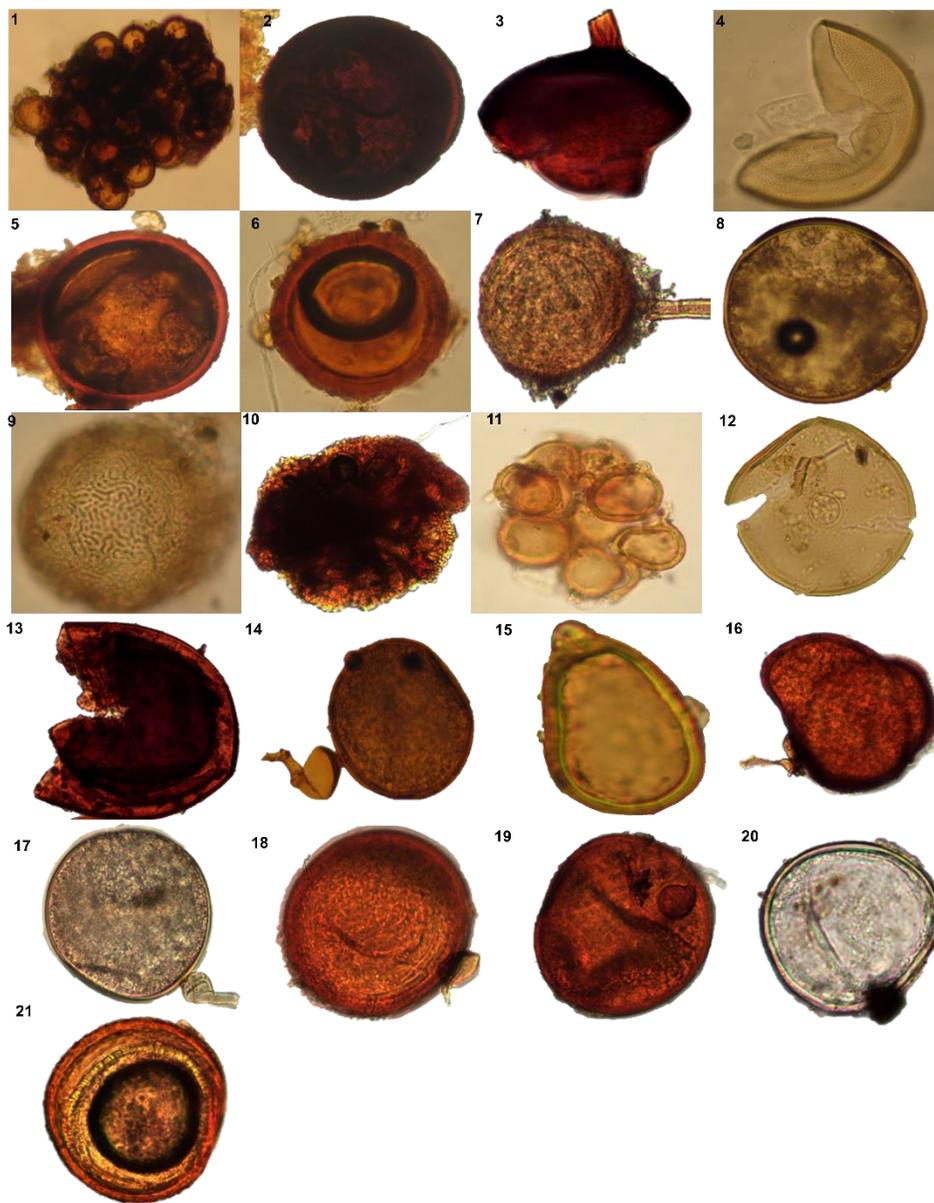


Figura 3.2 Esporas de HMA aisladas de la rizósfera de cocotero de diferentes sitios de la duna costera de la península de Yucatán (1) *Glomus glomerulatum* (2) *Glomus reticulatum* (3) *Septoglomus constrictum* (4) *Acaulospora scrobiculata* (5) *Claroideoglomus* aff. *etunicatum*, (6) *Corymbiglomus* aff. *tortuosum* (7) *Rhizophagus aggregatus* (8) *Racocetra* aff. *fulgida* (9) *Acaulospora* aff. *kentinensis* (10) *Sclerocystis sinuosa* (11) *Sclerocystis* aff. *rubiformis* (12) *Paraglomus* aff. *brasilianum* (13) *Acaulospora* aff. *colombiana* (14) *Scutellospora* sp. 1 (15) *Scutellospora* sp. 2 (16) *Rhizophagus* aff. *Irregularis* (17) *Gigaspora* aff. *margarita* (18) *Gigaspora* sp. 1 (19) *Gigaspora* aff. *candida* (20) *Diversispora* aff. *spurca* (21) *Glomus* sp. 1.

3.2 Colonización micorrízica en cocotero

Se observaron estructuras características de la colonización micorrízica de los HMA (Figura 3.3), no se registraron arbusculos.

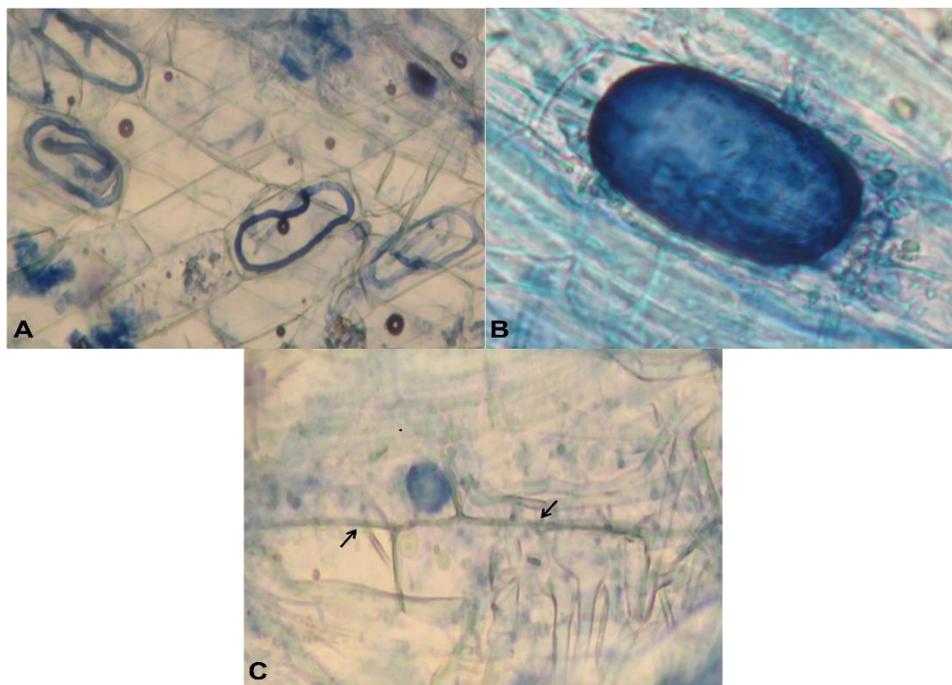


Figura 3.3 Colonización micorrízica en cocotero en la Península de Yucatán, se observa los ovillos (A) que el enrollamiento de las hifas a los cuales también se les adjudica el papel de intercambio de nutrimentos, las vesículas (B) engrosamiento de la hifa donde se almacenan lípidos y las hifas (C) que se encuentran señaladas por las flechas que culmina con en formación de una vesícula*

El porcentaje de colonización micorrízica en cocotero fue elevado (71% en promedio), esto en comparación con los niveles reportados por Rajeshkumar *et al.* (2015) que reportaron hasta un 55.17% de colonización, el sitio de San Crisanto presentó el mayor porcentaje de colonización con un 76% (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1 Porcentaje de colonización micorrízica en *Cocos nucifera* cultivados en diferentes sitios de la duna costera de Yucatán. Valores promedio \pm desviación estándar (n=3)

| San Crisanto plantación | San Crisanto duna | Celestún duna | Celestún ciénaga | Cuyo duna | Chixulub |
|-------------------------|-------------------|-----------------|------------------|---------------|---------------|
| 76 \pm 1.24 | 72.7 \pm 1.12 | 74.5 \pm 0.67 | 70.3 \pm 1.38 | 70 \pm 0.85 | 65 \pm 2.47 |

3.3 Establecimiento de cultivos trampa

El establecimiento de las plantas trampa presentaron diversas dificultades en su establecimiento, debido a las condiciones climatológicas de la región como las elevadas temperaturas, así como el tipo de suelo empleado y las especies seleccionadas, exigían un riego constante y fertilización, en ausencia de estos por periodos mayores a 3 días las plantas morían (Figura 3.4), se realizaron diversos intentos de establecer los cultivos, hasta que se logró la supervivencia y crecimiento de las plantas; posteriormente ya identificados los periodos de riego, fertilización y metodología de preparación del sustrato, se procedió a establecer los cultivos trampa individuales de las diferentes especies (Maíz, frijol y sorgo).



Figura 3.4 Cultivos trampa de maíz en arena estéril. Suelo muy pobre en nutrientes y bajo riego a las elevadas temperaturas de la región 40-43 °C.

Posterior a la determinación de las condiciones tanto de riego, como fertilización y el tipo de sustrato ideales para los cultivos trampa, se logró el establecimiento del sorgo, frijol y el maíz (Figura 3.5).

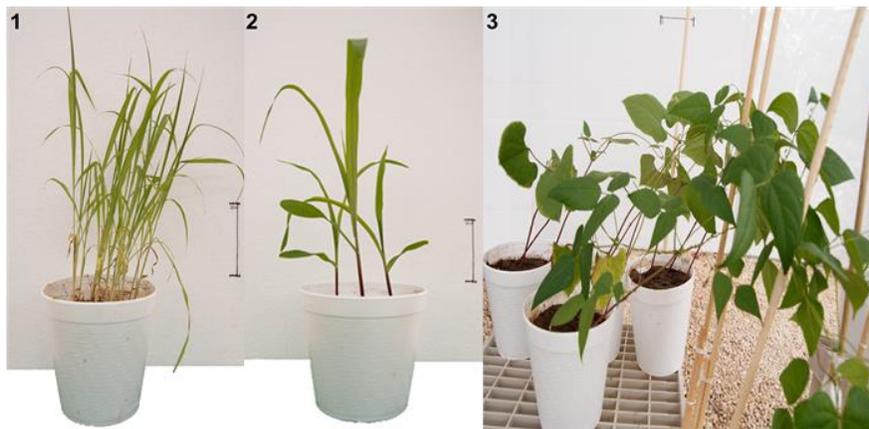


Figura 3.5 Cultivos trampa de sorgo (1), maíz (2) y frijol (3)

3.4 Pasto guinea como planta trampa alterna

El pasto guinea (*Panicum maximum*) fue la única especie que se pudo establecer bajo las condiciones de cultivos trampa a diferencia de los cultivos trampa convencionales que requirieron de un ajuste en el proceso de su establecimiento, de igual forma este cultivo creció sin problemas bajo las condiciones de elevadas temperatura (40-43 °C), sin fertilización y con baja cantidad de riego (una vez a la semana); así mismo, esta se desarrolló sin dificultad en los sustratos de arena estéril, esto a pesar de la baja cantidad de nutrientes con la que esta cuenta (Figura 3.6)



Figura 3.6 Pasto guinea establecido bajo elevadas temperaturas, sin fertilización y con baja cantidad de riego

Posteriormente al tiempo concluir el tiempo de establecimiento de cuatro y seis meses, estos fueron cosechados (Figura 3.7)



Figura 3.7 Recuperación de las esporas de los HMA, se recolecto la arena estéril sobre la cual se hayan los HMA logrados propagar por el pasto.

3.5 Esporas totales de los cultivos trampa: pasto guinea

En el conteo de esporas del pasto guinea se observó diferencias entre cada una de las réplicas establecidas en los dos tiempos evaluados, pero con valores elevados que superan la producción de las plantas comúnmente empleadas (maíz y sorgo), con valores que van desde 78 ± 6.87 a 216 ± 41.95 esporas por cada 10 g de suelo al cuarto mes, y con un incremento que va desde 209 ± 16.8 hasta 376.3 ± 12.7 al sexto mes.

El promedio total de producción del pasto guinea mostró un incremento de más del doble en el número de esporas entre el mes cuarto y mes sexto (Figura 3.8).

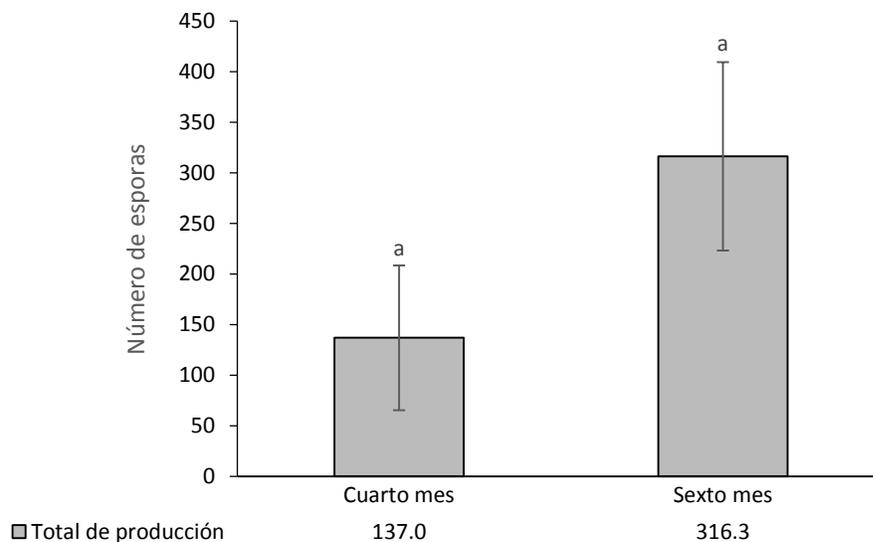
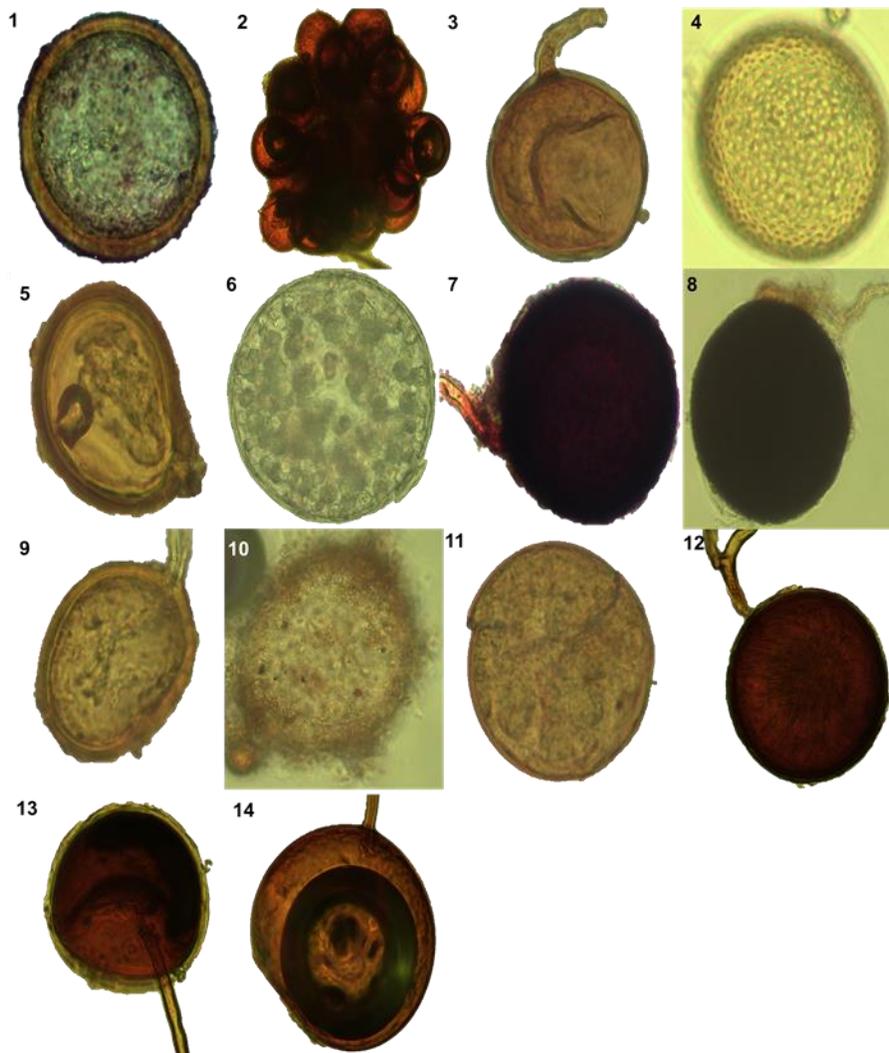


Figura 3.8 Promedio total de producción de esporas de HMA en el pasto guinea al cuarto y sexto mes de su establecimiento. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar de tres plantas con tres réplicas. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes con $p = 0.1266$

3.5.1 Especies de HMA identificadas en el pasto guinea

En la rizósfera de pasto guinea, se encontraron 14 morfoespecies diferentes (Figura 3.9), de las cuales solo 5 coinciden con las registradas en la rizósfera del cocotero (Cuadro 3.2).



Cuadro 3.2 Especies de HMA identificadas en pasto coincidentes con las especies identificadas en la rizósfera de cocotero.

| Especies de HMA coincidentes |
|-------------------------------------|
| <i>Glomus glomerulatum</i> |
| <i>Septoglomus constrictum</i> |
| <i>Rhizophagus aggregatus</i> |
| <i>Racocetra aff. Fulgida</i> |
| <i>Scutellospora sp. 2</i> |

Pese a los altos números de esporas el número de especies identificadas fue menor al esperado; así mismo, para este cultivo *Glomus sp. 2* fue la morfoespecie con más abundancia con altos índices en las diferentes réplicas realizadas, encontrando hasta 105 esporas del total máximo reportado anteriormente (Figura 3.9, pasto 2), la segunda morfoespecie con más presencia después de *Glomus sp. 2* fue *Rhizophagus aggregatus*, que fue la más común en cocotero y *Glomus glomerulatum* fue la tercer morfoespecie más abundante en el pasto, y la segunda más presente en cocotero.

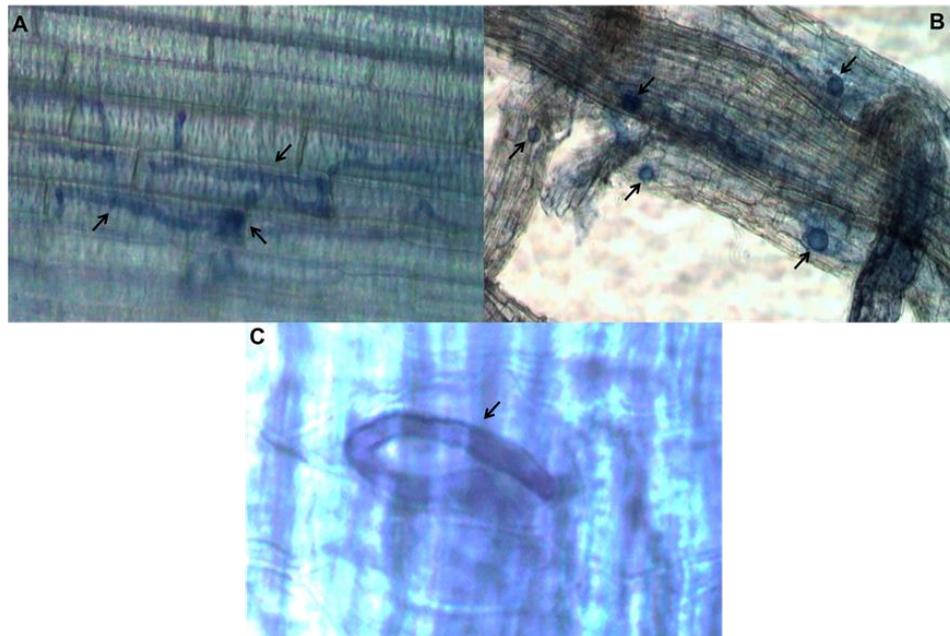
3.6 Colonización micorrízica del pasto guinea

Los porcentajes de colonización del pasto guinea antes reportados para este cultivo trampa fueron de hasta un 90% de colonización a los 75 días, en el presente trabajo se encontró de 51 - 63% de colonización (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3 Porcentajes de colonización micorrízica de las raíces del pasto guinea a los meses cuarto y sexto del establecimiento del cultivo trampa. Los valores indican el promedio \pm desviación estándar (n=3)

| | Porcentaje de colonización cuarto mes | Porcentaje de colonización sexto mes |
|----------------|--|---|
| Pasto 1 | 59 \pm 2.16 | 63 \pm 3.16 |
| Pasto 2 | 60 \pm 4.55 | 62 \pm 3.65 |
| Pasto 3 | 51 \pm 1.83 | 57 \pm 3.81 |

Se identificaron las estructuras características de la colonización micorrízica: hifas, vesículas y al igual que en cocotero solo se logró identificar ovillos (Figura 3.10).



3.7 Cultivos trampa: frijol

El número total de las esporas de los cultivos trampa de frijol resultó ser muy bajo, se obtuvieron valores desde 41 esporas por 10 gramos hasta 49 como máximo al mes cuarto; así mismo, al evaluar el sexto mes no se encontró una diferencia significativa con lo obtenido en el cuarto mes, donde como máximo se obtuvo 54 esporas por cada 10 gramos.

Como tal, la producción de esporas de HMA empleando el frijol como planta trampa a diferencia del pasto, no presentó un incremento en el número de esporas con el paso del

Figura 3.10 Se pueden observar las diferentes estructuras de los HMA dentro de la raíz del pasto guinea, desde las hifas que transitan inter e intracelularmente (A) observadas a 40X, las vesículas (B) que son señaladas con las flechas negras (observadas bajo 10X) y un ovillo (C) esta observada bajo 40X.

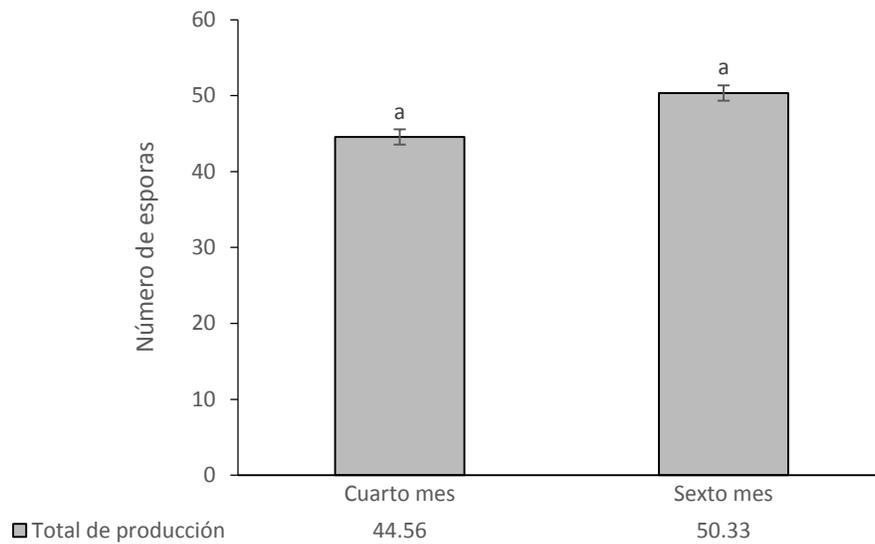


Figura 3.11 Comparación entre la producción de esporas del mes cuarto y sexto en los cultivos trampa de frijol. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar de tres plantas con tres réplicas. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes ($P = 0.184$)

En cuanto a los porcentajes de colonización estos resultaron ser muy bajos, porcentajes que van desde un 10% hasta un 13% (Cuadro 3.4), donde la mayor parte de las estructuras identificadas fueron hifas (Figura 3.12).

Cuadro 3.4 Porcentajes de colonización micorriza de las raíces de frijol a los meses cuarto y sexto. Los valores indican el promedio \pm desviación estándar ($n=3$)

| | Cuarto mes | Sexto mes |
|-----------------|---------------|---------------|
| Frijol 1 | 10 \pm 1.15 | 11 \pm 1.83 |
| Frijol 2 | 12 \pm 1.47 | 13 \pm 2.16 |
| Frijol 3 | 11 \pm 0.82 | 12 \pm 0.91 |



Figura 3.12 Hifa colonizando raíz de frijol

3.7.1 Especies de HMA identificadas en frijol

En el cultivo donde se empleó al frijol como planta trampa se aislaron 8 especies (Figura 3.13) donde la especie *Glomus glomerulatum* fue la especie más común y cuatro coincidieron con las especies identificadas en la rizósfera de cocotero (Cuadro 3.5).

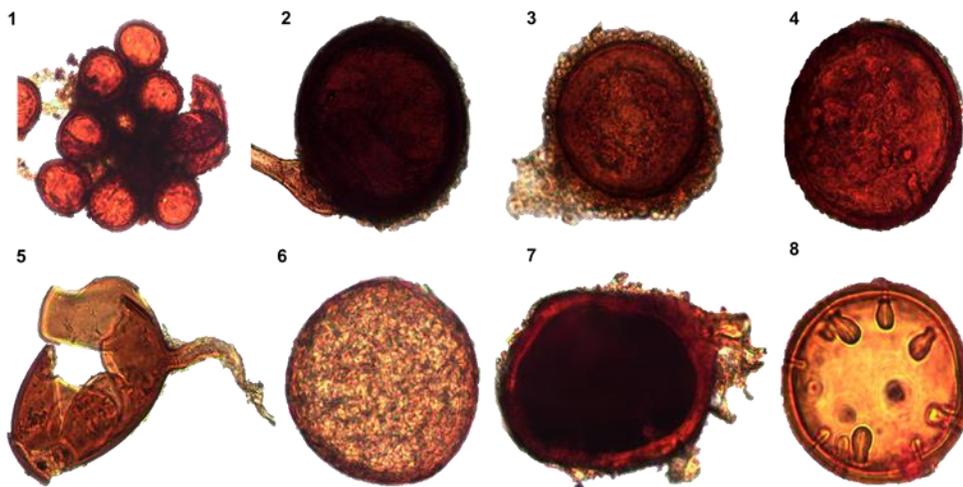


Figura 3.13 Esporas de HMA aisladas en los cultivos trampa de frijol las cuales pertenecen a las especies (1) *Glomus glomerulatum* (2) *Septoglomus constrictum* (3) *Corymbiglomus* aff. *tortuosum* (4) *Claroideoglomus* aff. *etunicatum* (5) *Funneliformis* aff. *caledonium* (6) *Glomus* sp. 3 (7) *Glomus* sp. 8 (8) *Glomus* sp. 10

Cuadro 3.5 Especies de HMA identificadas en los cultivos trampa de frijol que coinciden con las aisladas en la rizósfera de cocotero.

| Especies de HMA coincidentes |
|---|
| <i>Glomus glomerulatum</i> |
| <i>Septoglomus constrictum</i> |
| <i>Claroideoglomus</i> aff. <i>etunicatum</i> |
| <i>Corymbiglomus</i> aff. <i>tortuosum</i> |

3.8 Cultivos trampa: maíz

En el conteo del número total de esporas presentes en los cultivos donde se empleó al maíz como planta trampa, al cuarto mes se obtuvo un total de esporas muy bajo con respecto a los demás cultivos establecidos, con un máximo de 36 esporas por cada 10

gramos; sin embargo, en el trabajo de Yao *et al.* (2010) se obtuvieron 39736 esporas en un kilogramo, lo que representa un total de 39 esporas por cada 10 gramos, un valor próximo al obtenido. Es al sexto mes que se observó un notable incremento en el número de esporas obtenidas, de 36 esporas al cuarto mes a la obtención de 82 esporas por cada 10 gramos al sexto mes.

En este cultivo trampa de maíz, se observó un incremento en el número total de esporas entre el cuarto y sexto mes, donde al cuarto mes de su establecimiento se obtuvo un bajo número de esporas y al sexto mes de su establecimiento se obtuvo un incremento total de

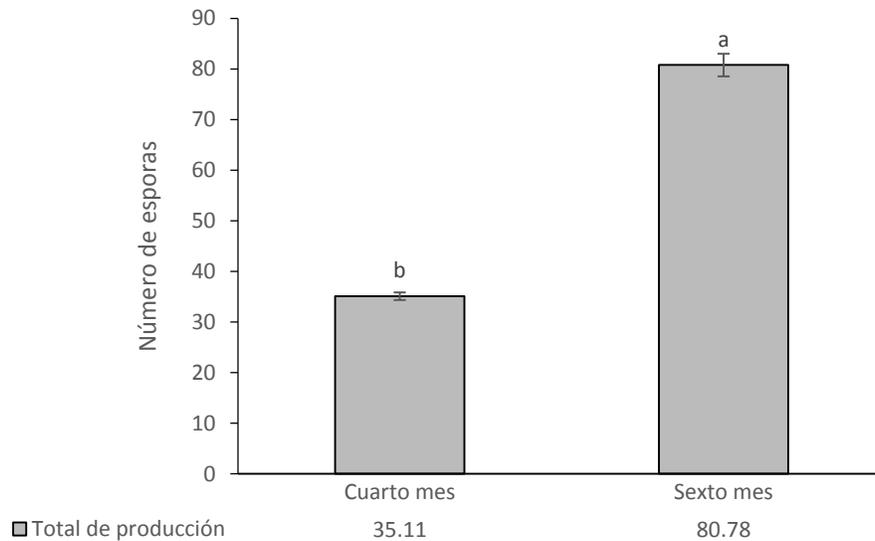


Figura 3.14 Producción total de esporas del cultivo trampa de maíz al mes cuarto y mes sexto. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar de tres plantas con tres réplicas. Las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p = 0.0463$)

producción de más del doble que lo obtenido al cuarto mes (Figura 3.14)

En cuanto al porcentaje de colonización este al igual que el frijol obtuvo un porcentaje de colonización muy bajo, desde el 11% hasta un 13% al cuarto mes, pero a diferencia del frijol para este cultivo trampa sí hubo un incremento en el porcentaje de colonización con valores de hasta el 65% (Cuadro 3.6), valor relativamente alto si se toma como referencia el estudio de Yao *et al.* (2010) que reportan 53% de colonización en maíz, así mismo en este cultivo se encontraron estructuras características de la colonización por HMA (Figura 3.15).

Cuadro 3.6 Porcentajes de colonización micorrízica de las raíces de maíz al cuarto y sexto mes de la instauración del cultivo trampa. Los valores indican promedio \pm desviación estándar (n=3)

| | Cuarto mes | Sexto mes |
|---------------|---------------|---------------|
| Maíz 1 | 11 \pm 0.71 | 60 \pm 4.08 |
| Maíz 2 | 13 \pm 1.15 | 55 \pm 3.27 |
| Maíz 3 | 13 \pm 0.41 | 65 \pm 1.83 |

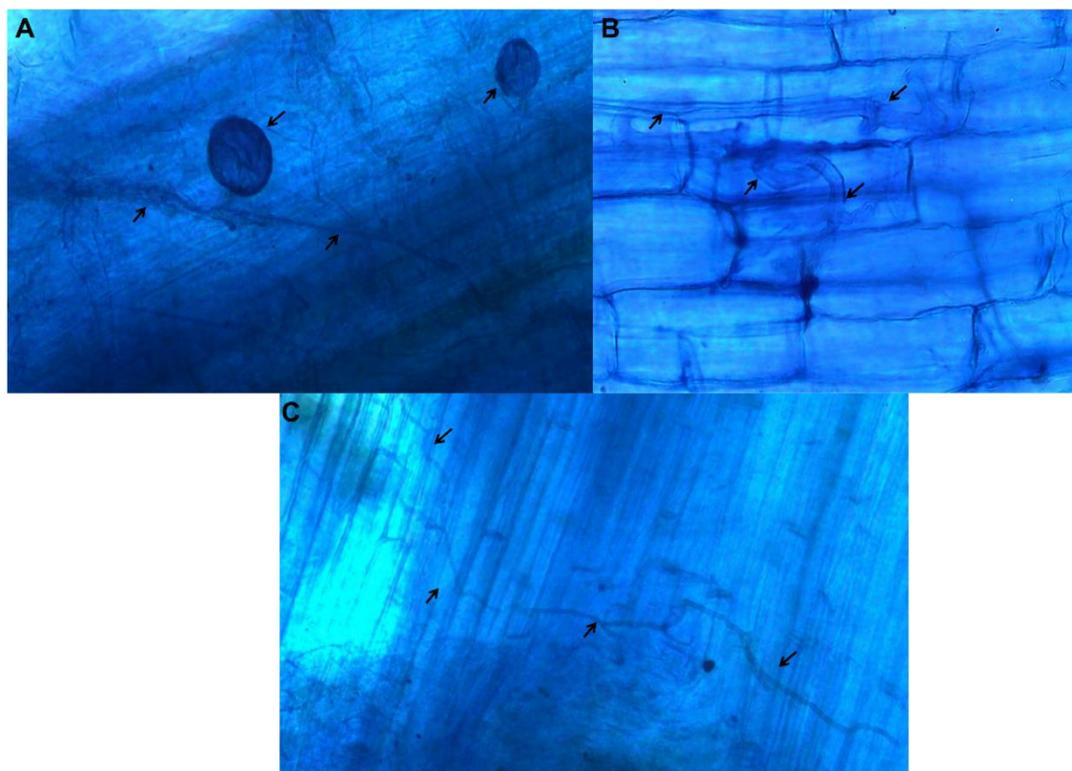
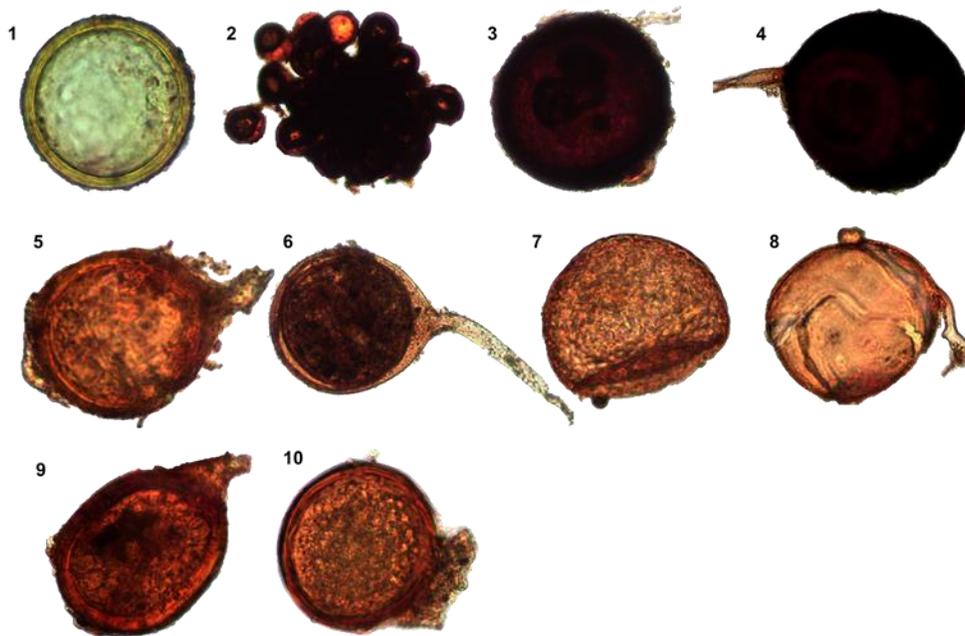


Figura 3.15 Estructuras características de la colonización de las raíces por HMA, vesículas emergentes de las hifas intracelulares (A), un coil u ovillo (b), así como una hifa que transita inter e intracelularmente

3.8.1 Especies de HMA identificadas en cultivos trampa de maíz

El maíz fue la segunda planta trampa con mayor número de especies (10), después del pasto (Figura 3.16); sin embargo, solo tres especies fueron similares a las reportadas en la rizósfera de cocotero (Cuadro 3.7). *Glomus* sp. 2 fue la especie más común en el

cultivo trampa de maíz; así mismo, esta especie fue la más común en el cultivo trampa de pasto.



Pese a ser el maíz el segundo cultivo trampa con mayor número de especies identificadas, fue el cultivo que presentó menos esporas coincidentes al cocotero, del total de las 10 especies de las esporas identificadas solo 3 especies coincidieron con los identificados en la rizósfera de cocotero (Cuadro 3.7). En el maíz al igual que en el pasto la especie de HMA más común fue *Glomus* sp. 2, seguida por *Glomus glomerulatum* una de las especies más comunes en cocotero.

Figura 3.16 Especies identificadas en los cultivos trampa de maíz. (1) *Glomus* sp. 2 (2) *Glomus glomerulatum* (3) *Glomus reticulatum* (4) *Septoglomus constrictum* (5) *Glomus* aff. *ambisporum* (6) *Acaulospora* sp. 1 (7) *Glomus* sp. 3 (8) *Glomus* sp. 7 (9) *Glomus* sp. 8 (10) *Glomus* sp. 9

Cuadro 3.7 Especies de HMA encontradas en maíz coincidentes con las especies identificadas en la rizósfera de cocotero

Especies de HMA coincidentes

Glomus glomerulatum

Glomus reticulatum

Septoglomus constrictum

3.9 Cultivos trampa: sorgo

A los cuatro meses, en cultivos trampa de sorgo se aislaron 87 esporas por cada 10 g, un número considerable alto si es comparado con maíz y frijol, pero un número inferior si se compara con el pasto guinea, el sorgo es el cultivo trampa que se ha reportado como un gran productor de HMA; sin embargo, pese a que se esperaba un aumento el número total de esporas del cuarto al mes sexto, este no presentó un incremento considerable.

Pese a ser el sorgo el segundo cultivo con mayor producción, su variación en el número de esporas no fue significativo con un incremento de 2 esporas en la producción total entre los periodos de tiempo evaluados (Figura 3.17).

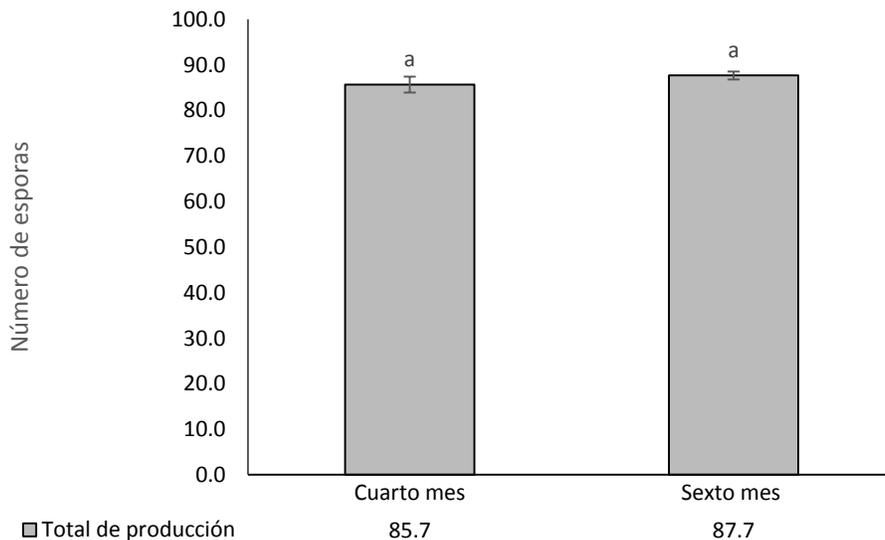


Figura 3.17 Producción total de esporas de los HMA asociados a sorgo al cuarto y sexto mes. Las barras representan el promedio ± desviación estándar de tres plantas con tres réplicas donde las barras con la misma letra no son significativamente diferentes ($p = 0.1266$)

En cuanto a las estructuras de colonización en la raíz del sorgo se encontraron hifas y

| | Cuarto mes | Sexto mes |
|----------------|------------|-----------|
| Sorgo 1 | 41 ± 2.12 | 45 ± 1.83 |
| Sorgo 2 | 42 ± 1.22 | 41 ± 3.46 |
| Sorgo 3 | 40 ± 2.16 | 43 ± 0.82 |

vesículas (Figura 3.18) donde se obtuvo un porcentaje de colonización alto, pero no se observó un incremento muy alto en el porcentaje de colonización entre el cuarto y sexto mes (Cuadro 3.8), estos resultados son similares a la cantidad de variación que presentó el número de esporas entre el cuarto y sexto mes.

Cuadro 3.8 Porcentajes de colonización micorriza de las raíces de sorgo al mes cuarto y mes sexto. Los valores indican el promedio ± desviación estándar (n=3)

3.9.1 Especies de HMA identificados en los cultivos trampa de sorgo

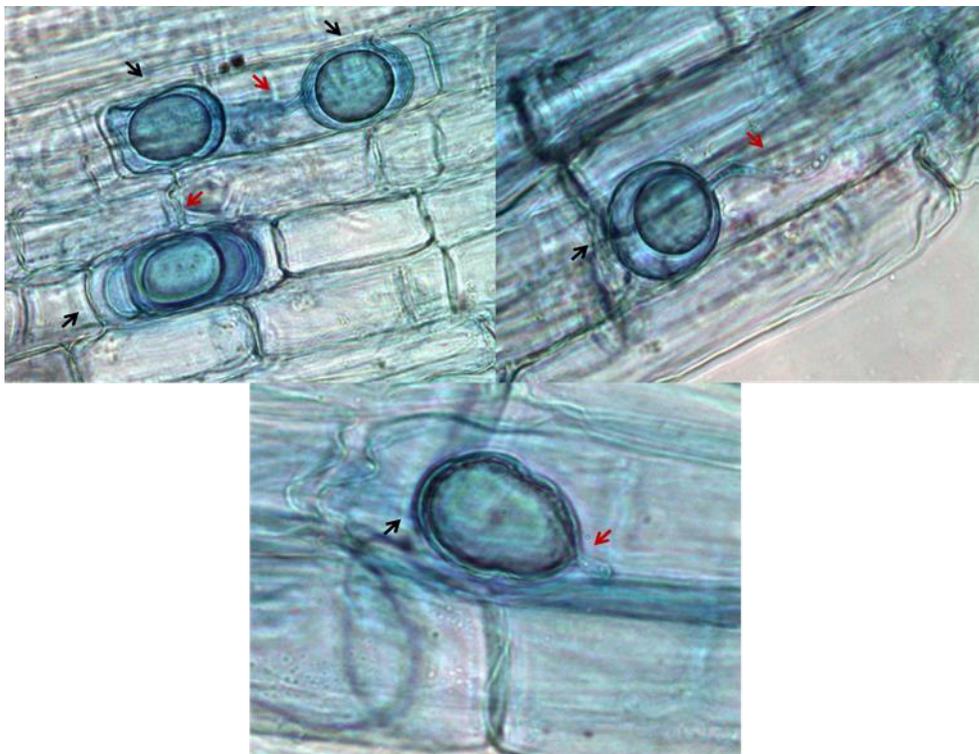
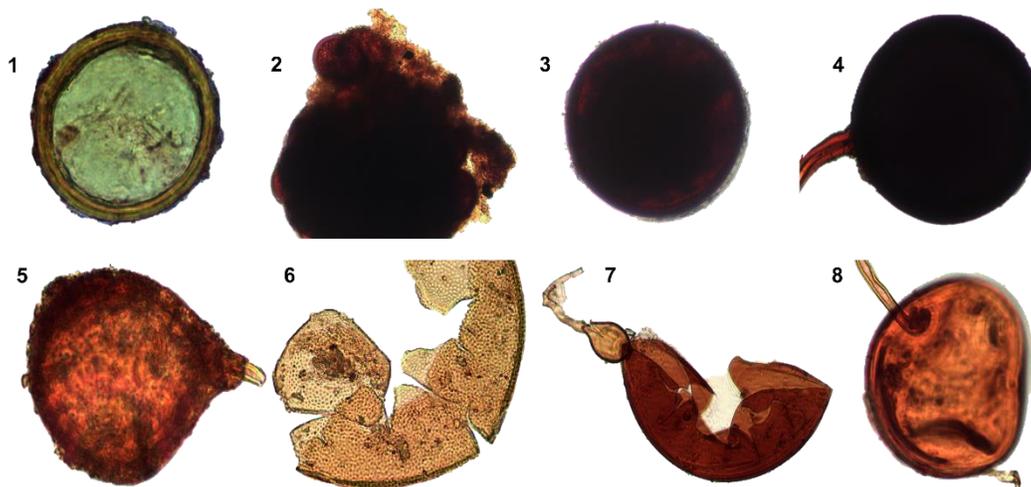


Figura 3.18 Vesículas en raíz de sorgo, se puede observar la estructura de las vesículas (flecha negra) acompañadas por las hifas (flecha roja) de las cuales parten, todas las imágenes se encuentran observadas bajo la lente de 40X.

Pese a ser sorgo el segundo cultivo trampa que presentó un mayor número de esporas y estar ligeramente por encima del maíz, en este cultivo solo se lograron identificar 8



especies de HMA (Figura 3.19). Pese al bajo número de especies identificado, el sorgo al igual que el frijol presentó cuatro coincidencias con las especies identificadas en cocotero (Cuadro 3.9), superando al maíz que presentó únicamente tres coincidencias. En el sorgo así como en el pasto y el maíz, la especie más común identificada fue *Glomus* Sp. 2, seguida por *Glomus glomerulatum*, una de las especies con más presencia en la rizósfera de cocotero.

Cuadro 3.8 Especies identificadas en sorgo que también fueron reportadas en la rizósfera de cocotero.

Especies de HMA coincidentes

Glomus glomerulatum

Glomus reticulatum

Septoglosum constrictum

Scutellospora sp. 1

Figura 3.19 Especies de HMA en el cultivo trampa de sorgo: (1) *Glomus* sp. 2, (2) *Glomus glomerulatum*, Sieverd (3) *Glomus reticulatum* (4) *Septoglosum constrictum* (5) *Glomus* aff. *ambisporum* (6) *Acaulospora* aff. *foveata* (7) *Scutellospora* sp. 1 (8) *Glomus* sp. 5

3.10 Diversidad de especies en el cocotero de la duna costera yucateca

Entre las 21 especies registradas en el presente estudio, 3 especies se reportan por primera vez para el cultivo de cocotero, estas especies son *Racocetra* aff. *fulgida*, *Paraglomus* aff. *brasilianum* y *Glomus glomerulatum*, en el caso particular de la especie *Corymbiglomus* aff. *tortuosum*, esta especie fue antes reportada en cocotero cuando aún pertenecía al género *Glomus*, actualmente esta especie pertenece al género *Corymbiglomus* pero no fue considerada como nueva especie para el cocotero, el resto de las especies identificadas en la rizósfera del cocotero de la duna yucateca se hayan reportadas en la literatura. Del total de especies identificadas *Rhizophagus aggregatus*, *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus glomerulatum*, *Scutellospora* sp. 2 y *Claroideoglomus* aff. *etunicatum* fueron las más abundantes en la rizósfera del cocotero.

3.11 Índice de diversidad de las especies de HMA asociados a cocotero

Los datos sobre el índice de diversidad de Simpson (Ds), el índice de diversidad de Shannon (H') y la equitatividad de Pielou (J') se presentan en la Tabla 3.10. Los índices de diversidad fueron diferentes significativamente entre los sitios de la duna costera yucateca con plantaciones de cocotero. El índice de Ds varió de 0.8986 ± 0.001 a 0.9297 ± 0.001 , el de Hs de 2.5257 ± 0.011 a 2.8250 ± 0.012 y el de J de 0.8630 ± 0.009 a 0.9320 ± 0.002 , (Kruskal Wallis de $p= 0.006534$ para el índice de diversidad de Simpson, $p= 0.007787$ para el Índice de Shannon y $p= 0.01215$ para la Equitatividad de los diferentes puntos evaluados). En el caso de los índices de diversidad general (Shannon H'), se observó un valor de 2.82 ± 0.012 para la duna de Celestún y el valor más bajo de 2.52 ± 0.011 en la duna de San Crisanto. Por lo tanto, se observó una mayor diversidad de especies de HMA en la plantación abandonada de cocotero establecida en la duna de Celestún en comparación con los otros puntos evaluados, la equitatividad de las especies fue alta en Celestún Ciénega (0.9320 ± 0.002) en comparación con otros sitios.

Cuadro 3.9 Diversidad y homogeneidad de las especies de HMA asociados a la rizósfera de cocotero en los diferentes sitios de la duna costera yucateca

| Sitio | Índice de Simpson (Ds) | Índice de Shannon (H') | Equitatividad (J) |
|-------------------------|------------------------|------------------------|--------------------|
| San Crisanto plantación | 0.9162 ± 0.001 | 2.6940 ± 0.013 | 0.9045 ± 0.009 |
| San Crisanto duna | 0.8986 ± 0.001 | 2.5257 ± 0.011 | 0.8630 ± 0.009 |

| | | | |
|-------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Celestún duna | 0.9297 ± 0.001 | 2.8250 ± 0.012 | 0.9280 ± 0.004 |
| Celestún ciénega | 0.9237 ± 0.001 | 2.6940 ± 0.007 | 0.9320 ± 0.002 |
| Cuyo duna | 0.9149 ± 0.004 | 2.5907 ± 0.035 | 0.9144 ± 0.012 |
| Chixulub | 0.9074 ± 0.002 | 2.5353 ± 0.019 | 0.9144 ± 0.007 |

3.12 Índice de diversidad de especies de HMA en cultivos trampa

Se presentan los datos sobre los índices de diversidad de Simpson (Ds), Shannon (H') e índice de equitatividad de Pielou obtenidos en los diferentes cultivos trampa instaurados (Cuadro 3.11), donde los valores de Ds variaron de 0.7822 ± 0.005 a 0.8618 ± 0.003 , los valores de H' de 1.7677 ± 0.014 a 2.0260 ± 0.013 y J de 0.7948 ± 0.008 a 0.9743 ± 0.006 , en el cual cultivo que empleó al frijol como planta trampa presentó los mayores índices de diversidad tanto en el índice de Simpson (0.8618 ± 0.003) como en el de Shannon (2.0260 ± 0.013), y el cultivo de sorgo presentó los menores índices de diversidad con 0.7822 ± 0.005 en el índice de Simpson y 1.7677 ± 0.014 para el índice de Shannon; por lo tanto, se puede señalar al frijol como el cultivo más diverso en comparación con el resto de los cultivos. Así mismo, los valores del índice de equitatividad de Pielou fue más alto para para el frijol en comparación al resto de los cultivos.

Cuadro 3.10 Diversidad y homogeneidad de los HMA en los cultivo trampa de pasto, maíz, sorgo y frijol

| | Índice de Simpson (1-Ds) | Índice de Shannon (H') | Equitatividad (J) |
|---------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Pasto | 0.8165 ± 0.005 | 1.9750 ± 0.019 | 0.7948 ± 0.008 |
| Maíz | 0.8274 ± 0.002 | 1.9580 ± 0.027 | 0.8637 ± 0.015 |
| Sorgo | 0.7822 ± 0.005 | 1.7677 ± 0.014 | 0.8500 ± 0.007 |
| Frijol | 0.8618 ± 0.003 | 2.0260 ± 0.013 | 0.9743 ± 0.006 |

3.13 Productividad total de esporas de los diferentes cultivos trampa

Los resultados de la producción del número total de esporas que se logró obtener en cada cultivo trampa, señalan al pasto como el mejor productor de esporas, lo que resulta en una gran especie de planta para los fines de producción de esporas de la duna costera.

En la Figura 3.20 se puede observar una diferencia en cuanto a la productividad de esporas de las diferentes especies de plantas empleadas, donde se presenta al pasto guinea como el mejor productor de esporas de la duna costera yucateca al superar ampliamente a las otras especies empleadas.

Se puede señalar de esta manera que, para fines de producción de esporas de la duna costera yucateca, el pasto es una especie ideal.

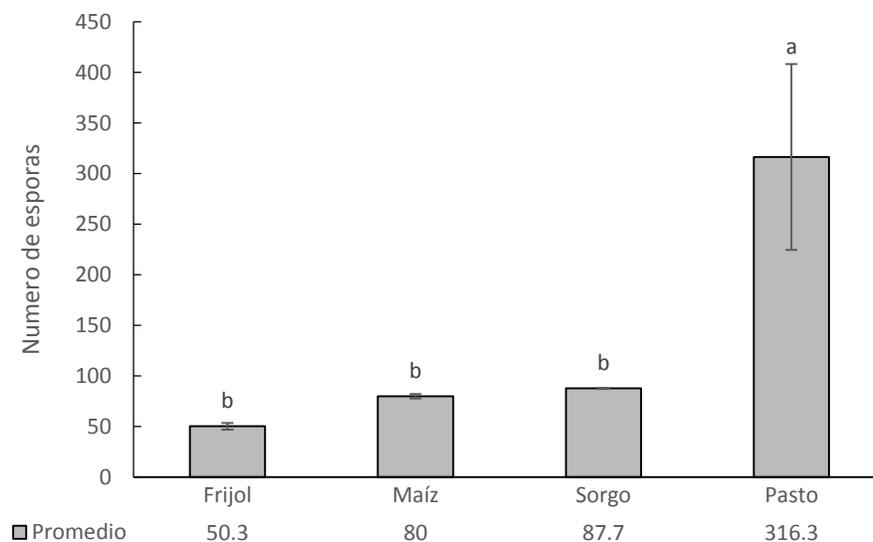


Figura 3.20 Comparación del número de esporas producidas en 10 g de suelo por cada especie empleada como cultivo trampa. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar ($n=3$) donde las barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($p=0.01556$).

3.13 Influencia de las propiedades fisicoquímicas del suelo en los HMA

A partir de los datos obtenidos por Lara-Pérez *et al.* (2019) sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo de la duna yucateca, se determinó que los sitios evaluados en el presente estudio no presentaron diferencias significativas en N (Kruskal-Wallis, $p=0.1429$) y K (Kruskal-Wallis, $p=0.3972$); sin embargo, se encontró diferencias de P entre los sitios

(Kruskal-Wallis $p= 0.008749$), donde San Crisanto presentó la menor cantidad de P y Chichulub mostró la mayor cantidad (Cuadro 3.12).

Cuadro 3.11 Propiedades fisicoquímicas del suelo (Lara-Pérez *et al.*, 2019).

| | P (mg/Kg) | N | K (mg/Kg) | pH | Arenas | Clasificación |
|-------------------------|---------------|-------------|----------------|-------------|--------------|----------------|
| San Crisanto plantación | 5.76 ± 1.73 | 0.21 ± 0.01 | 128.33 ± 67.52 | 7.73 ± 0.15 | 81.88 ± 3.46 | Arena franca |
| San Crisanto duna | 15.09 ± 0.44 | 0.17 ± 0.06 | 108.33 ± 23.63 | 7.44 ± 0.06 | 87.88 ± 3.46 | Arena fina |
| Celestún duna | 10.54 ± 3.15 | 0.16 ± 0.02 | 148.33 ± 36.17 | 7.56 ± 0.23 | 91.88 ± 2.00 | Arena fina |
| Celestún ciénega | 10.84 ± 2.15 | 0.37 ± 0.02 | 91.67 ± 16.07 | 7.49 ± 0.19 | 72.55 ± 1.15 | Franco arenoso |
| El Cuyo | 15.66 ± 0.98 | 0.23 ± 0.18 | 113.33 ± 2.89 | 7.45 ± 0.05 | 73.21 ± 4.16 | Franco arenoso |
| Chichchulub | 31.26 ± 12.82 | 0.28 ± 0.13 | 75 ± 54.08 | 7.64 ± 0.09 | 83.21 ± 6.11 | Franco arenoso |

El P es un determinante en la variación de los porcentajes de colonización, así como el N, que mostro cierta influencia sobre el proceso de la simbiosis planta - HMA. En el caso del K se observó una menor influencia sobre este proceso (Cuadro 3.13) y fue el pH quien no mostró influencia en la variación de la colonización micorrízica, que pudo deberse a que el pH no mostró una diferencia significativa entre los sitios evaluados (Kruskal-Wallis, $p= 0.1435$).

Cuadro 3.12 Relación entre P, N y K con los porcentajes de colonización y presencia de esporas

| | San Crisanto plantación | San Crisanto duna | Celestún duna | Celestún ciénega | El Cuyo | Chichchulub |
|-------------------|-------------------------|-------------------|----------------|------------------|---------------|---------------|
| % de colonización | 76 ± 1.24 | 72.7 ± 1.12 | 74.5 ± 0.67 | 70.3 ± 1.38 | 70 ± 0.85 | 65 ± 2.47 |
| Total de esporas | 143 ± 18.87 | 141 ± 6.26 | 162.8 ± 44.04 | 133 ± 20.38 | 129 ± 7.35 | 127 ± 15.28 |
| P (mg/Kg) | 5.76 ± 1.73 | 15.09 ± 0.44 | 10.54 ± 3.15 | 10.84 ± 2.15 | 15.66 ± 0.98 | 31.26 ± 12.82 |
| N | 0.21 ± 0.01 | 0.17 ± 0.06 | 0.16 ± 0.02 | 0.37 ± 0.02 | 0.23 ± 0.18 | 0.28 ± 0.13 |
| K (mg/Kg) | 128.33 ± 67.52 | 108.33 ± 23.63 | 148.33 ± 36.17 | 91.67 ± 16.07 | 113.33 ± 2.89 | 75 ± 54.08 |
| pH | 7.73 ± 0.15 | 7.44 ± 0.06 | 7.56 ± 0.23 | 7.49 ± 0.19 | 7.45 ± 0.05 | 7.64 ± 0.09 |

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

El número total de esporas de los HMA asociados a cocotero a lo largo de la duna costera del estado Yucatán no presentó una diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $p = 0.2451$), ya que el número total de esporas de suelo rizosférico del cocotero es similar a lo largo de la duna. La densidad de esporas presentó valores altos, con rangos que van desde 127 ± 15.28 a $162 \pm 44.04/10$ g de suelo, lo que indica un alto número de esporas para esta región, considerando que solo se han reportado un aproximado de 19 esporas por 50 g de suelo (Ramos-Zapata *et al.*, 2011). Estos valores elevados son probablemente debido a que el cultivo analizado ha sido descrito como altamente dependiente de los HMA (Rajeshkumar *et al.*, 2015). Valores similares han sido reportados en cocotero por Ambili *et al.* (2012) quienes reportaron hasta 154 esporas por cada 10 g en la rizósfera de cocotero, señalan que estos valores incrementan cuando los cultivos son establecidos de manera intercalada con otras especies. Debido al sistema de establecimiento evaluado (monocultivo) se estima que el alto número de esporas puede deberse en gran medida a la región donde se hayan instauradas pues se ha descrito a los HMA como críticos para la absorción de nutrientes en las dunas debido a su bajo porcentaje de nutrientes (Kowalchuk *et al.*, 2002).

El alto número de esporas aisladas, es consistente con el alto número de especies de HMA identificados en la rizósfera del cocotero, donde se identificaron un total de 21 especies y se encontró a *Rhizophagus aggregatus* (C. Walker, 2016) antes *Glomus aggregatum* (N.C. Schenck & G.S. Sm., 1982) como la especie más común para este cultivo, lo que concuerda con los trabajos de Rajeshkumar *et al.* (2015) y Ambili *et al.* (2012) quienes señalan a esta especie como la más predominante en la rizósfera del cocotero. En un estudio relacionado, reportaron 40 especies de HMA, el mayor número de especies de HMA descritas en cocotero (Rajeshkumar *et al.*, 2015), es importante destacar que este trabajo fue realizado en cultivos mixtos y en condiciones de suelo completamente diferentes a los del presente estudio, lo que genera esta diferencia pues se ha señalado que la diversidad entre las comunidades de HMA, depende de las especies de plantas, el tipo de suelo y la estacionalidad (Smith y Smith, 2012). No obstante lo anterior, se encontró una elevada coincidencia con las especies mayormente

descritas para este cultivo de los 11 géneros reportados (Thomas *et al.*, 1987; Michel-Rosales *et al.*, 1996; Varela y Trejo, 2001; Ambili *et al.*, 2012; Rajeshkumar *et al.*, 2015) en la rizósfera de cocotero, encontrándose nueve géneros en el presente estudio; así mismo, se encontraron especies no reportadas para el cocotero pertenecientes al género *Racocetra* y *Paraglomus*; es de destacar que la especie *Corymbiglomus aff. tortuosum* había sido descrita en cocotero; sin embargo, ésta fue reportada con el nombre de *Glomus tortuosum* N.C. Schenck & G. S. Sm. (1982).

Los niveles de colonización micorrízica obtenidos fueron altos con valores de 62 ± 2.47 en Chixulub al 76 ± 1.24 en San Crisanto plantación, valores coincidentes con respecto al número de esporas identificadas de cada sitio, es decir, a mayor número de esporas mayor porcentaje de colonización, estos altos índices puede deberse a que el cocotero posee raíces relativamente gruesas y desprovista de pelos absorbentes (Rajeshkumar *et al.*, 2015), en donde las plantas con raíces gruesas dependen mucho más de los hongos micorrízicos que las plantas con raíces finas (Van der Heijden *et al.*, 2015), así mismo, también se observó que los valores de colonización se ven regidos por la cantidad de P y N presentes en el suelo de los diferentes puntos evaluados que al incremento o reducción de estos elementos en los sitios evaluados, existe una variación en los porcentajes de colonización de la planta, datos que concuerdan con Nouri *et al.* (2014), quienes señalan que el P y N son reguladores de la simbiosis entre las plantas y los HMA, un importante mecanismo donde las plantas promueven o limitan la colonización fúngica de acuerdo con sus necesidades. Pese a que los altos niveles de colonización han coincidido con lo reportado Ambili *et al.* (2012), la anatomía del tipo de colonización identificada se describe como tipo “*Paris*”, ya que en ninguno de los análisis se encontraron estructuras arbusculares, pero si coils u ovillos lo que se contrapone a lo reportado para este cultivo donde Sengupta y Chaudhuri (2002); Muthukumar y Prakash (2009) y Rajeshkumar *et al.* (2015) reportan al cocotero como tipo “*Arum*”, en el entendimiento de esto y que es planteado que la morfología de colonización de los HMA en el contexto de “*Arum*” y “*Paris*” está influenciada por el huésped como por las especies de hongos (Kubota *et al.*, 2005) y habiendo encontrado mucha similitud en cuanto a géneros y especies reportadas en el cocotero se cree que las condiciones de la duna costera han influido en la obtención de estos resultados, pues se ha señalado que los factores ambientales, las condiciones

del suelo y los nutrientes, también pueden contribuir a la variabilidad morfológica para la formación de estructuras tipo *Paris* o *Arum* (Dickson, 2004)

De los cultivos trampa establecidos para la producción de los inóculos identificados en la rizósfera del cocotero de la duna costera yucateca, el pasto de guinea (*Panicum maximum*) mostró ser el mejor productor de HMA asociados a cocotero, la cual de las 21 especies identificadas en el inóculo inicial este pasto logró propagar cinco, así mismo, en este cultivo trampa se observó la presencia de nueve especies de HMA no identificadas en el inóculo inicial. El hecho de no haber identificado estos hongos en el inóculo inicial puede deberse a diversos factores que afectan la esporulación de estas especies de HMA en el momento del muestreo, factores como la dependencia del huésped, edad de las plantas hospederas, la capacidad de los HMA de esporular, la latencia y los patrones de distribución de las esporas de los hongos en los suelos así como la influencia estacional y otros factores bióticos (Bharadwaj *et al.*, 2007), y al emplear las raíces del cocotero estas pudieron germinar, colonizar y esporular en los cultivos trampa, así mismo, el hecho que el pasto guinea no haya podido reproducir todas las especies identificadas en el inóculo inicial puede deberse a la preferencia de los hongos por algunas especies de plantas y de las plantas a ciertas especies de HMA (Yao *et al.*, 2010; Liu y Wang, 2003; Sanders, 2003).

La obtención de bajos números coincidentes con el inóculo inicial y la presencia de especies no identificadas en estas no fue un resultado exclusivo del pasto guinea, el sorgo, frijol y maíz presentaron este mismo comportamiento, donde se observó variaciones tanto en el número de esporas como en el número de especies presentes en cada cultivo.

Al señalamiento de que un inóculo con mayor efectividad puede estar conformado por esporas, fragmento de raíces colonizadas y fragmentos de hifas (Berruti *et al.*, 2015), se puede describir al pasto guinea como un buen productor de inóculo de HMA debido a su alta producción de esporas ($376 \pm 12.7/10$ g de suelo) y de especies (14 especies), de las cuales 5 resultaron coincidentes a las identificadas en la rizósfera del cocotero, además de su alto porcentaje de colonización (63%), en comparación con el maíz que logró producir número medio de esporas (82.7 esporas en 10 g) pero con altos valores si es comparado a los reportes en cuanto a su producción de esporas (Yao *et al.*, 2010;

Carrenho *et al.*, 2002), pese al bajo número de esporas identificadas, el porcentaje de colonización logró alcanzar valores de hasta 65%, que como se ha señalado puede deberse a una mayor preferencia de las plantas a estas especies de HMA o a una mayor necesidad nutrimental. En cuanto al cultivo de sorgo, este presentó valores ligeramente por encima de la producción de esporas del mayor, pero con niveles más bajos de colonización (45%). El frijol fue el que menos esporas presentó (54 esporas/10 g), así como el menor porcentaje de colonización (13 %), en cuanto a la producción del número de especies, el pasto destacó con 14 especies, seguido por el maíz, sorgo y frijol, debido a la presencia de especies no identificadas en el inoculo inicial, pero que en principio se cree que estas hallaban la muestra inicial, pero como se había señalado no se identificaron las esporas de dichas especie debido a que por algún motivo estas no se hallaban esporulando al momento del análisis de dicha muestra (Bharadwaj *et al.*, 2007), por ello se puede estimar que estas especies también forman parte de la rizósfera del cocotero y con una alta probabilidad de colonizar esta.

En el presente trabajo se observó relación entre el número de esporas y los porcentajes de colonización; sin embargo, estos procesos no son necesariamente dependiente entre sí (Carrenho *et al.*, 2002), como en el caso del sorgo que fue un buen productor de esporas, pero no presentó un mayor porcentaje de colonización que el maíz que presentó un menor número de esporas. El mismo caso fue observado en las muestras de San Crisanto plantación que tenía un número menor de esporas frente a las muestras de la duna de Celestún, pero un mayor porcentaje de colonización que esta, lo cual habla que los procesos de colonización están regulados por distintos factores, como la especie del hospedero, la especie del hongo y las condiciones nutrimentales del suelo (Nouri *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2010; Liu y Wang, 2003). El frijol presentó los niveles más bajos de producción de esporas y los niveles más bajos del porcentaje de colonización, pero mostró los índices de diversidad más altos en comparación con el pasto, maíz y el sorgo, cuyos resultados pueden estar relacionados con la abundancia de cada especie dentro de las comunidades en las muestras, que de acuerdo con Pielou (1969) la diversidad aumenta cuando la abundancia de las especies se vuelve más uniforme.

Para el caso de la productividad de nuestros cultivos se observó muy buena producción de estos, pese a las condiciones climáticas a las que se afrontaron, donde en los puntos

más altos de temperatura en invernadero oscilaron entre 40-43 °C, lo que los hace buenos productores para temperaturas cálidas. En el caso del maíz y el sorgo, estos lograron superar la producción reportada por Yao *et al.* (2010) y Carrenho *et al.* (2002). Este es el primer reporte del uso del frijol como planta trampa que logró producir 54 esporas por cada 10 gramos, valores que incluso superan a los reportados en maíz y sorgo (Yao *et al.*, 2010; Carrenho *et al.*, 2002). El pasto presentó el mayor número de esporas, superando los valores reportados por Bagyaraj y Manjunath (1980) y Sreenivasa y Bagyaraj (1988).

El pasto guinea es una planta trampa adecuada para la producción de HMA asociados a cocotero de la duna costera yucateca, no solo por su elevada productividad y colonización micorrízica, sino también por su tolerancia a elevadas temperaturas, su facilidad de manejo y adaptabilidad a diferentes tipos de suelos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

Este estudio encontró de una alta diversidad de HMA en la rizósfera del cocotero de la duna costera yucateca, en el cual se encontró en ambiente natural 21 especies de HMA.

La rizósfera asociada a cocotero de la duna costera de Yucatán presentó en promedio 139.3 esporas/10 g de suelo.

Las especies de HMA asociadas a cocotero en la duna de Celestún presentaron el mayor índice de diversidad de Simpson (0.9297 ± 0.001) y la duna de San Crisanto el valor más bajo (0.8986 ± 0.001)

Panicum maximum empleada como planta trampa produjo 314.3 esporas/10 g suelo a los seis meses de cultivo comparada con 50.3 esporas/10 g suelo en *Phaseolus vulgaris*, 80.8 esporas/10 g en *Zea mays* y 87.7 esporas/10 g en *Sorgum bicolor*.

La planta trampa que produjo una mayor diversidad de especies de HMAs fue *Phaseolus vulgaris* y la menor en *Sorgum bicolor*. *Panicum maximum* presentó una diversidad intermedia.

Panicum maximum se presenta como una alternativa para utilizarse como planta trampa debido a que presentó mayor número de esporas, una diversidad intermedia y facilidad de manejo debido a su resistencia a las altas temperaturas, enfermedades y plagas.

5.2 Perspectivas

EL uso de los HMA producto de los cultivos trampa podrían ser evaluados en la reducción de los periodos de aclimatación de las plantas producidas *in vitro* de cocotero, así como en la adaptación de esta especie de plantas a sitios con suelos con poca disponibilidad de agua, salinos y bajos en nutrientes, esto es tanto en palmas provenientes de cultivo *in vitro* como los obtenidos por semilla. De igual manera, este producto puede ser evaluado en diversas especies vegetales con el fin de hacer más amplio el uso de este biofertilizante.

Se realizó un experimento preliminar en colaboración con los Drs. María Narvárez y Carlos Oropeza para evaluar los beneficios de la inoculación de los HMA obtenidos en la presente tesis en plántulas de cocotero producidas *in vitro*, donde después de su inoculación éstas se establecieron en condiciones de invernadero. Se observó una mejora en el tamaño y número de hojas en las plantas provenientes de cultivo *in vitro* inoculadas con HMA producto de este trabajo en comparación con los testigos no inoculados a los tres meses de establecido el experimento (Figura 5.1). Posteriormente, se redujo el riego a las plántulas por un periodo de dos meses donde se observó una pérdida de cerca del 40% de las plantas no inoculadas, mientras las inoculadas con los HMA, el 100% se encuentran vivas y con muy buena apariencia (Figura 5.2).

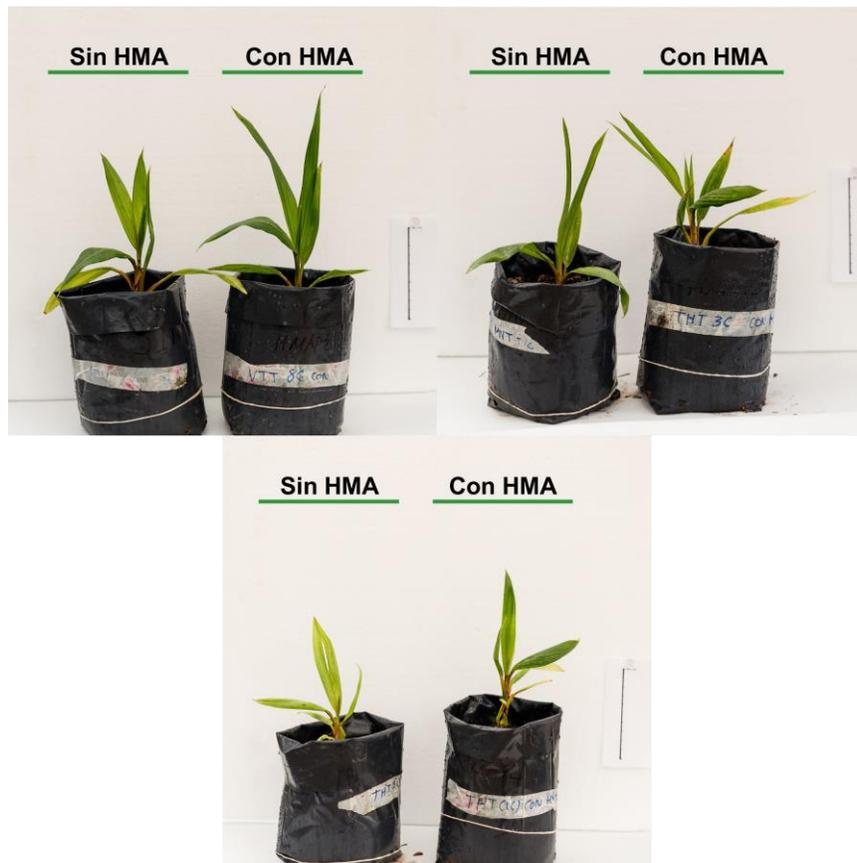


Figura 5.1 Diferencia entre plantas de cocotero provenientes de cultivo *in vitro* inoculadas con HMA y no inoculadas, se observa una mejor coloración, tamaño y mayor número de hojas en las plantas inoculadas con HMA a diferencia de las no inoculadas.



Figura 5.2 Los HMA propagados en *Panicum maximum* mejoran la sobrevivencia de las plantas de cocotero provenientes de cultivo *in vitro*. Se puede observar la muerte de cerca del 40% de las plantas de cocotero sin inocular con HMA en comparación del 100% de sobrevivencia de las plantas inoculadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Affokpon, A., Coyne, D., Lawouin, L., Tossou, C., Agbèdè, R. y Coosemans, J. (2011). Effectiveness of native West African arbuscular mycorrhizal fungi in protecting vegetable crops against root-knot nematodes. *Biol. Fertil. Soils*, 47, 207-217.
- Alarcón, C. y Cuenca, G. (2005). Arbuscular mycorrhizas in coastal sand dunes of the Paraguanã Peninsula, Venezuela. *Mycorrhiza*, 16, 1-9.
- Alarcón, A. Ferrera-Cerrato, R., González-Chávez, M. y Villegas-Monter, A. (2000) Hongos micorrízicos arbusculares en la dinámica de aparición de estolones y nutrición de plantas de fresa cv. fern obtenidas por cultivo *in vitro*. *Terra latinoamericana*, 18, 211-218.
- Alguacil, M., Torrecillas, E., Caravaca, F., Fernández, D., Azcón, R. y Roldán, A. (2011). The application of an organic amendment modifies the arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing native seedlings grown in a heavy-metal-polluted soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 43, 1498-1508.
- Al-Karaki, G., McMichael, B. y Zak, J. (2004). Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza*, 14, 263-269.
- Ambili, K., Thomas, G., Indu, P., Gopal, M., Gupta, A. (2012) Distribution of arbuscular mycorrhizae associated with coconut and arecanut based cropping systems. *Agricultural Research*, 1, 338-345
- Augé, R. M., Toler, H. D., y Saxton, A. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 25, 13-24.
- Azcon-Aguilar, C., Barea, J.M., 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens: an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6, 457-464.
- Bagyaraj, J. y Stürmer, S. (2012). Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA). En: F. Moreira, E. Huising y D. Bignell, (ed). *Manual de Biología de Suelos Tropicales*.

- Muestreo y Caracterización de la Biodiversidad Bajo el Suelo*, 1st ed. México: Instituto Nacional de Ecología, pp. 217-229.
- Bagyaraj, D. y Manjunath, A. (1980) Selection of a suitable host for mass production of VA mycorrhizal inoculum. *Plant and Soil*, 55, 495-498.
- Barker, S., Tagu, D. y Delp, G. (1998) Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology*, 116, 1201-1207.
- Barrer, S. (2009) El uso de hongos micorrizicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Facultad de ciencias agropecuarias*. Vol. 7, No. 1
- Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R. y Bianciotto, V. (2016) Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. *Front. Microbiol.* 6, 1559.
- Bharadwaj, D., Lundquist, P. y Alström, S. (2007). Impact of plant species grown as monocultures on sporulation and root colonization by native arbuscular mycorrhizal fungi in potato. *Applied Soil Ecology* 35, 213-225.
- Briccoli Bati, C., Santilli, E. y Lombardo, L. (2015). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and on micronutrient and macronutrient uptake and allocation in olive plantlets growing under high total Mn levels. *Mycorrhiza*, 25, 97-108.
- Bonfante, P. y Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat Commun* 1,48.
- Brundrett, M., Bougher, B., Dell, T., Grove, N. y Malajczuk. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph 32. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Carrenho, R., Trufem, S. y Bononi, V. (2002). Effects of using different host plants on the detected biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi from an agroecosystem. *Brazilian Journal of Botany*, 25, 93-101.
- Chan, J., Sáenz, L., Talavera, C. Hornung, R., Robert, M. y Oropeza, C. (1998). Regeneration of coconut (*Cocos*

- nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 17, 515-521
- Clapp, J., Helgason, T., Daniell, T. y Young JPW (2002). Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. En: *Mycorrhizal Ecology*, van der Heijden MGA, Sanders IR (eds). Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp 201-224
- Colwell, R. (2006). EstimateS 8.0b. Statistical estimation of species richness and shared species from simples. Recuperado de <http://vivceroy.eeb.uconn.edu>.
- Cordova, I., Jones, P., Harrison, N. y Oropeza, C. (2003). In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol Plant Pathol* 4, 99-108.
- Cutter, V. y Wilson, K. (1954). Effect of coconut endosperm and other growth stimulants upon the development *in vitro* of embryos of *Cocos nucifera*. *Botanical Gazette*, 115, 234-240.
- Dickson, S. (2004). The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 163, 187-200.
- Dickson, S., Smith, F. y Smith, S. (2007). Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next? *Mycorrhiza*, 17, 375-393.
- Engelmann, F. y Batugal, P. (2002). Background on the development and implementation of the coconut embryo *in vitro* culture project. En: Engelmann F, Batugal P, Oliver J (eds) *Coconut Embryo In Vitro Culture: Part II*. IPGRI-APO, Serdang, pp 1-4
- Estrada-Luna, A., Davies., F., Egilla, J., (2000). Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (*Psidium guajava* L.) during *ex vitro* acclimatization and plant establishment. *Mycorrhiza*, 10, 1-8.

- Estrada, B., Aroca, R., Barea, J. y Ruiz-Lozano J. (2013). Native arbuscular mycorrhizal fungi isolated from a saline habitat improved maize antioxidant systems and plant tolerance to salinity. *Plant Science*, 201-202, 42-51
- Feddermann, N., Finlay, R., Boller, T. y Elfstrand, M. (2010). Functional diversity in arbuscular mycorrhiza - the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecology*, 3, 1-8.
- Feldmann, F. y Grotkass, C. (2002). Directed inoculum production—shall we be able to design AMF populations to achieve predictable symbiotic effectiveness? En: Gianinazzi, S., Schüepp, H., Barea, J., y Haselwandter, K. (eds) *Mycorrhizal Technology in Agriculture: From Genes to Bioproducts*. Birkhauser, Basel, pp 261-279
- Fernando, S., Vidhanaarachchi, V., Weerakoon, L. y Santha, E. (2010). What makes clonal propagation of coconut difficult? *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 18, 163-165
- Gaur, A. y Adholeya, A., (2000). Mycorrhizal effects on the acclimatization, survival, growth and chlorophyll of micropropagated *Syngonium* and *Dracaena* inoculated at weaning and hardening stages. *Mycorrhiza*, 9, 215-219.
- Gaur, A. y Adholeya, A. (2002). Arbuscular-mycorrhizal inoculation of five tropical fodder crops and inoculum production in marginal soil amended with organic matter. *Biol Fertil Soils*, 35, 214-218.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P. y Barker DG. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* 17, 3489-3499.
- Gutjahr, C. y Parniske, M. (2013). Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29, 593-617.

- Grattapaglia, D. y Machado, M.A. (1990). Micropropagação. en: Torres, A.C., Caldas, L.S. (Eds.), *Técnicas e Aplicações Da Cultura de Tecidos de Plantas*. ABCTP/Embrapa-CNPH, Brasília, pp. 99-170.
- Green, N., Graham, S. y Schenck, N. (1976). The influence of pH on the germination of vesicular arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia*, 68, 929-934.
- Gryndler M., Jansa J., Hřselová H., Chvátalová I. y Vosátka M. (2003). Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* 22, 283-287
- Grof, B. y Harding, T. (1970). Dry matter yields and animal production of guinea grass (*Panicum maximum*) on the humid tropical coast of north. *Tropical grasslands*, 1, 85-95.
- Harikumar, V. y Thomas, G. (1991). Effect of fertilizers and irrigation on vesicular arbuscular mycorrhizal association in coconut. *Philipp J Coconut Stud* 16, 20-24.
- Hammer, O., Harper, D., y Ryan, P. (2001). PAST (Paleontological Statistics) version. 1.37. Recuperado de <http://folk.uio.no/ohammer/past/>
- Harrison, N. y Jones, P. (2003). Diseases of coconut. Diseases of tropical fruit crops. CABI Publishing, 44 Brattle Street, 4th Floor, Cambridge, MA, 02138, USA.
- Harrison, M. (2012). Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current opinion in plant biology*, 15, 691-698
- Hashem, A., Abd_Allah, E., Alqarawi, A. y Egamberdieva, D. (2016). Bioremediation of adverse impact of cadmium toxicity on *Cassia italica* Mill by arbuscular mycorrhizal fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, 39-47.
- Hildebrandt, U., Regvar, M. y Bothe H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68, 139-146.
- Ijdo, M., Cranenbrouck, S. y Declerck, S. (2011). Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. *Mycorrhiza*, 21, 1-16.

- Jaizme-Vega, M.C., Tenoury, P., Pinochet, J., Jaumot, M., (1997). Interactions between the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Glomus mosseae* in banana. *Plant Soil*, 196, 27-35.
- Janos, D. (1996). Mycorrhizas, succession y rehabilitation of deforested lands in the humid tropics. En: Frankland, J.C., Gadd, G.M. (Eds.). *Fungi and Environmental Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 1-18.
- Kaminskyj, S. G. W. (2008). Effective and flexible methods for visualizing and quantifying endorhizal fungi. In Z. A. Siddiqui, M. S. Akhtar, & K. Futai (Eds.), *Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry*, Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 1-18.
- Kavoo-Mwangi, A., Kahangi, E., Atekaa, E., Ongusoa, J., Mukhongo, R., Mwangi, E. y Jefwa, J. (2013). Growth effects of microorganisms based commercial products inoculated to tissue cultured banana cultivated in three different soils in Kenya. *Applied Soil Ecology*, 64, 152-162.
- Koske, R., Gemma, J., Corkidi, L., Sigüenza, C. y Rincón, E. (2008). Arbuscular Mycorrhizas in Coastal Dunes. *Coastal Dunes*, 173-187.
- Kowalchuk, G., De Souza., F. y Van Veen., J. (2002). Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology*, 11, 571-581
- Kubota, M., & Hyakumachi, M. (2005). Morphology and colonization preference of arbuscular mycorrhizal fungi in *Clethra barbinervis*, *Cucumis sativus*, and *Lycopersicon esculentum*. *Mycoscience*, 45, 206-213.
- Kubota, M., McGonigle, T. y Hyakumachi, M. (2005). Co-occurrence of Arum- and Paris-type morphologies of arbuscular mycorrhizae in cucumber and tomato. *Mycorrhiza*, 15, 73-77
- Labidi, S., Ben, F., Tisserant, B., Yousfi, M., Sanaa, M., Dalpé, Y. y Lounès-Hadj, A. (2015). Field application of mycorrhizal bio-inoculants affects the mineral uptake

BIBLIOGRAFÍA

- of a forage legume (*Hedysarum coronarium* L.) on a highly calcareous soil. *Mycorrhiza*, 25,297-309
- Lanfranco, L., Bonfante, P. y Genre, A. (2016). The mutualistic interaction between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbiol Spectrum*, 4(6): FUNK-0012-2016.
- Lara-Pérez, L., Oros-Ortega, I., Córdova-Lara, I., Estrada-Medina, H., O'Connor-Sánchez, A., Góngora-Castillo, E. y Sáenz-Carbonell, L. (2019). Diversity inside and outside roots: arbuscular mycorrhizal fungi community associated with *Cocos nucifera* in Yucatán, Mexico. Artículo en preparación.
- Leal, P., Stürmer, S. y Siqueira, J. (2009). Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from soils under different land use systems in the Amazon, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 111-121.
- Lee, R. (2013). Cadang-cadang disease of palm and other diseases. *Phytopathol* 103, 177-178
- Levinsh, G. (2006). Biological basis of biological diversity: physiological adaptations of plants to heterogeneous habitats along a sea coast. *Acta Universitatis Latviensis*, 710 (2006), pp. 53-79
- Leyval, C., Joner, E., del Val C. y Haselwandter K. (2002). Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation, in *Mycorrhizal Technology in Agriculture*, eds Gianinazzi S., Schüepp H., Barea J. M., Haselwandter K., editors. (Birkhäuser Basel), 175-186. Available online at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-0348-8117-3_14 (Accessed August 22, 2013)
- Liu, R., Wang F. (2003) Selection of appropriate host plants used in trap culture of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 13, 123-127.
- Lopes, P., Stürmer, S. y Siqueira, J. (2009) Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from soils under different land use systems in the amazon, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 111-121
- Magurran, A. E. (2004). *Measuring biological diversity*. Oxford: Blackwell.

- Mamatha, G., Bagyaraj, D. & Jaganath, S. (2002). Inoculation of field-established mulberry and papaya with arbuscular mycorrhizal fungi and a mycorrhiza helper bacterium. *Mycorrhiza*, 12, 313-316.
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., & Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115, 495-501.
- Meddad-Hamza, A., Hamza, N., Neffar, S., Beddiar, A., Gianinazzi, S., y Chenchouni, H. (2017). Spatiotemporal variation of arbuscular mycorrhizal fungal colonization in olive (*Olea europaea* L.) roots across a broad mesic-xeric climatic gradient in North Africa. *Science of the Total Environment*, 583, 176-189.
- Michel-Rosales, A. y Valdés, M. (1996) Arbuscular mycorrhizal colonization of lime in different agroecosystems of the dry tropics. *Mycorrhiza*, 6, 105-109
- Mishra, S., Sharma, S., y Vasudevan, P. (2008) Comparative effect of biofertilizers on fodder production and quality in guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1667-1673
- Mohammad, A., Khan, A. y Kuek, C. (2000) Improved aeroponic culture of inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 9, 337-339.
- Mosse, M. y Thompson, J. (1981), Production of mycorrhizal fungi. US Pat. No 4294037
- Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U. y Reinhardt, D. (2014). Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLOS ONE*, 9(3): e90841.
- Oehl, F., Sieverding, E., Palenzuela, J., Ineichen, K. y Silva, G.A. (2011). Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus*, 2, 191-199.
- Oropeza-Salín, C. M.; Sáenz-Carbonell, Luis Alfonso; Chan-Rodríguez, J. L.; Sandoval-Cancino, G.; Pérez-Núñez T., Narváez-Cab, M., Rodríguez-Martínez, R. y Borroto-Nordelo, C. (2017). Coconut Micropropagation in Mexico using plumule

- and Floral Explants, International Journal on Coconut R&D, ISSN: 0, 32, 2, 2017. FI-NO INDIZADA.
- Ormsby, A., Hodson, E., Li, Y., Basinger, J., & Kaminskyj, S. (2007). Arbuscular mycorrhiza associated with Asteraceae in the Canadian High Arctic: the value of herbarium archives. *Canadian Journal of Botany*, 85, 599-606.
- Ortas, I. (2010). Effect of mycorrhiza application on plant growth and nutrient uptake in cucumber production under field conditions. *Span J Agric Res*, 8, 116-122
- Pérez-Nuñez, M., Chan, J., Saenz, L., González, T., Verdeil, J., y Oropeza, C. (2006) Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 42, 37-43
- Porcel, R., Aroca, R. y Ruiz-Lozano, J. (2011). Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32, 181-200.
- Pozo, M. y Azcón-Aguilar, C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 393-398
- Puthur, J.S., Prasad, K.V.S.K., Sharmila, P., Pardha Saradhi, P., 1998. Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi improves establishment of micropropagated *Leucaena leucocephala* plantlets. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 53, 41-47
- Quilambo, O. (2003). The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal Biotechnology*, 2: 539-546.
- Rajeshkumar, P., Thomas, G., Gupta, A. y Gopal, M. (2015). Diversity, richness and degree of colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in coconut cultivated along with intercrops in high productive zone of Kerala, India. *Symbiosis*, 65, 125141
- Redecker, D., Kodner, R. y Graham, L. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 289, 1920-1921.

- Rillo, E., Cueto, C., Medes, W. y Areza-Ubaldo, M., (2002). Development of an improved embryo culture protocol for coconut in the Philippines. En: Engelmann F, Batugal P, Oliver J (eds) Coconut Embryo *In Vitro* Culture: Part II. IPGRI-APO, Serdang, pp 41-79
- Rilling, M., Aguilar-Trigueros, C., Bergmann, J., Verbruguen, E., Veresoglou S. y Lehmann, A. (2015) Plant root and mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. *New Phytol*, 205, 1385-1388.
- Rodriguez, R., Redman, R. y Henson, J. (2004) The Role of Fungal Symbioses in the Adaptation of Plants to High Stress Environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 9, 261-272
- Rodríguez-Tovar, A., Xoconostle-Cásares, B. y Valdéz, M. (2004). Ecología molecular de los hongos ectomicorrícicos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27, 267-278
- Ruiz-Sánchez, M., Aroca, R., Muñoz, Y., Polón, R. y Ruiz-Lozano, J. (2010). The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. *Journal of Plant Physiology* 167, 862-869
- Saenz, L., Azpeitia, A., Chuc-Armendariz, B., Chan, J., Verdeil, J., Hocher, V. y Oropeza, C. (2006) Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 42, 19-25
- Salamanca, C.P., Harrea, M.A., Barea, J.M., 1992. Mycorrhizal inoculation of micropropagated woody legumes used in revegetation programmes for desertified Mediterranean ecosystems. *Agronomie* 12, 869-872.
- Samosir, Y. y Adkins, S. (2014) Improving acclimatization through the photoautotrophic culture of coconut (*Cocos nucifera*) seedlings: an *in vitro* system for the efficient exchange of germplasm. *Physiology*, 50, 493-501
- Sanders, I. (2003). Preference, specificity and cheating in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Trends Plant Sci.*, 8, 143-145.

BIBLIOGRAFÍA

- Schüßler, A., Schwarzott, D. y Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105, 1413-1421.
- Schüßler, A. (2017). Glomeromycota: species list. <http://www.amf-phylogeny.com/> citado 30 de marzo de 2017
- Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F. y Huang, Y. (2008). Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, 18.287-296
- Simon, L., Lalonde, M. y Bruns, T. (1992). Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol* 58,291-295
- Sisunandar, S., Rival, A., Turquay, P., Samosir, Y. y Adkins, SW. (2010). Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos does not induce morphological, cytological or molecular changes in recovered seedlings. *Planta* 232, 435-447.
- Smith, SE. y Lee, DJ. Simbiosis micorriza. 3ª ed. Londres: Academic Press Ltd; 2008.
- Smith, SE. y Lee, DJ. Simbiosis micorriza. 3ª ed. Londres: Academic Press Ltd; 2008.
- Smith, V. y Read, D. (2008). Mycorrhizal Symbiosis, 3rd ed. Academic Press, New York, NY.
- Smith, S. y Smith, F. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 227-250
- Sreenivasa, M. y Bagyaraj, D. (1988). *Chloris gayana* (Rhodes grass), a better host for the mass production of *Glomus fasciculatum* inoculum. *Plant and Soil*, 106, 289-290.
- Subhan, S., Sharmila, P. y Saradhi, P. (1998). *Glomus fasciculatum* alleviates transplantation shock of micropropagated *Sesbania sesban*. *Plant Cell Reports*, 7, 268-272.

- Taylor, J. y Harrier, L.A., (2001). A comparison of development and mineral nutrition of micropropagated *Fragaria xananassa* cv. Elvira (strawberry) when colonised by nine species of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 18, 205-215.
- Thomas, G., Ghai, S. (1987). Genotype dependent variation in vesicular-arbuscular mycorrhizal colonisation of coconut seedlings. *Plant Sciences*, 97, 289-294
- Torres-Ariasa, Y., Ortega, R., Nobreb, C., Furrázola, E. y Louro., R. (2016). Production of native arbuscular mycorrhizal fungi inoculum under different environmental conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 87-94
- Van der Heijden, M., Martin, M., Selosse, M. y Sanders, I. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205, 1406-1423.
- Varela, L. y Trejo, D. (2001). Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México. *Acta Zoológica Mexicana*, 1, 39-51
- Vibrans, H. (Ed.) (2009). Malezas de México (Actualizado 6 de agosto de 2009) Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/poaceae/panicum-maximum/fichas/ficha.htm>. Fecha de acceso: 24-de octubre del 2017.
- Voets, L., Dupré de Boulois, H., Renard, L., Strullu, D. y Declerck, S. (2005). Development of an autotrophic culture system for the *in vitro* mycorrhization of potato plantlets. *FEMS Microbiol Lett*, 248, 111-118
- Vidal, M.T., Azcon-Aguilar, C., Barea, J.M., Pliego-Alfaro, F. (1992). Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. *HortScience*, 27, 785-787.
- Wang, Q., Li, Y. y Klassen, W. (2007). Changes of Soil Microbial Biomass Carbon and Nitrogen with Cover Crops and Irrigation in a Tomato Field *Journal of Plant Nutrition*, 30, 623-63
- Wilson, G., Rice, C., Rillig, M., Springer, A. y Hartnett, D. (2009). Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular

- mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. *Ecology Letters*, 12, 452-461.
- Wright, D., Scholes, J., Read, D., (1998). Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environ*, 21, 209-216.
- Yano-Melo, A., Junior, O., Lima-Filho, J., Melo, N., Maia, L., (1999). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. *Mycorrhiza*, 9, 119-123.
- Yang, Y., Liang, Y., Han, X., Chiu, T.-Y., Ghosh, A., Chen, H., y Tang, M. (2016). The roles of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in phytoremediation and tree-herb interactions in Pb contaminated soil. *Scientific Reports*, 6, 20469.
- Yamato, M., Ikeda, S. y Iwase, K. (2008). Community of arbuscular mycorrhizal fungi in a coastal vegetation on Okinawa island and effect of the isolated fungi on growth of sorghum under salt-treated conditions. *Mycorrhiza*, 18, 241-249.
- Yao, Q., Gao, J., Zhu, H., Long, L., Xing, Q. y Chen, J. (2010) Evaluation of the potential of trap plants to detect arbuscular mycorrhizal fungi using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Soil Science and Plant Nutrition* 56, 205-211
- Zobel, R., Del Tredici, P. y Torrey, J. (1976) Method for growing plants aeroponically. *Plant Physiol*, 57, 344-346
- Zhu, Y. y Miller, R. (2003). Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. *Trends Plant Sci.* 8,407-409