	MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
	PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
		PAGINA: 1 de 8

FECHA : miércoles, 2 de octubre de 2019

Señores
UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
 BIBLIOTECA
 Facatativá

UNIDAD REGIONAL : Extensión Facatativá

TIPO DE DOCUMENTO : Trabajo De Grado

FACULTAD : Ciencias Agropecuarias

NIVEL ACADÉMICO DE FORMACIÓN O PROCESO : Pregrado


PROGRAMA ACADÉMICO : Ingeniería Agronómica

El Autor(Es):

APELLIDOS COMPLETOS	NOMBRES COMPLETOS	No. DOCUMENTO DE IDENTIFICACIÓN
López Luque	María Isabel	1.070.977.691

Calle 14 Avenida 15 Barrio Berlín Facatativá – Cundinamarca
 Teléfono (091) 892 07 07 Línea Gratuita 018000976000
www.ucundinamarca.edu.co E-mail: info@ucundinamarca.edu.co
 NIT: 890.680.062-2

*Documento controlado por el Sistema de Gestión de la Calidad
 Asegúrese que corresponde a la última versión consultando el Portal Institucional*

	MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
	PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
		PAGINA: 2 de 8

Director(Es) y/o Asesor(Es) del documento:

APELLIDOS COMPLETOS	NOMBRES COMPLETOS
Ruiz Bohórquez	Liz Karen

TÍTULO DEL DOCUMENTO
COMPARACIÓN DE DOS METODOLOGÍAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ENDOMICORRIZAS EN EL INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO SECCIONAL CUNDINAMARCA

SUBTÍTULO (Aplica solo para Tesis, Artículos Científicos, Disertaciones, Objetos Virtuales de Aprendizaje)

TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Aplica para Tesis/Trabajo de Grado/Pasantía INGENIERO AGRÓNOMO

AÑO DE EDICIÓN DEL DOCUMENTO	NÚMERO DE PÁGINAS
30/09/2019	60 pág.

DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS (Usar 6 descriptores o palabras claves)	
ESPAÑOL	INGLÉS
1. Colombia	Colombia
2. Endomicorrizas	Endomicorrizas
3. ICA	ICA
4 Micorrizas	Micorrizas
5. <i>Urochloa decumbens.</i>	<i>Urochloa decumbens.</i>

Calle 14 Avenida 15 Barrio Berlín Facatativá – Cundinamarca
Teléfono (091) 892 07 07 Línea Gratuita 018000976000
www.ucundinamarca.edu.co E-mail: info@ucundinamarca.edu.co
NIT: 890.680.062-2

Documento controlado por el Sistema de Gestión de la Calidad
Asegúrese que corresponde a la última versión consultando el Portal Institucional



MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
	PAGINA: 3 de 8

RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS

(Máximo 250 palabras – 1530 caracteres, aplica para resumen en español):

En el Laboratorio Nacional de Insumos Agrícolas (LANIA) perteneciente al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), se hizo la comparación de dos metodologías para la identificación de endomicorrizas y se analizó una muestra de referencia perteneciente a LANIA cuyo propósito fue la demostración experimental de la metodología proporcionada por el ICA. En la comparación de metodologías, se utilizaron dos métodos estipulados: el primero desarrollado en el año 2017 por el ICA y el segundo método fue proporcionado por la Universidad Nacional de Colombia (UN) en el año 2010, cuya finalidad es analizar los procedimientos de Tinción con azul de Tripán y la separación e identificación de esporas. Para el análisis de la muestra de referencia se utilizó como especie vegetal *Urochloa decumbens* (pasto alambre), y tuvo como objetivo analizar la metodología dada por el ICA, logrando realizar el análisis del número de propágulos infectivos por medio del método número más probable (NMP). Al finalizar la comparación de los dos métodos se dedujo que tienen un mismo objetivo, donde los materiales e insumos utilizados no afectan los resultados. Por otra parte en el método de identificación y conteo, se logra observar la presencia de esporas pertenecientes al género *Glomus* sp. Se logra concluir que con la implementación de la metodología descrita por el ICA, se logró visualizar, observar e identificar las estructuras típicas de las micorrizas vesículo-arbusculares HMA, pertenecientes a una muestra de referencia enriqueciendo la viabilidad y la exactitud para trabajar las muestras de bioinsumos agrícolas que ingresan al laboratorio LANIA.

ABSTRACT:

In the National Laboratory of Agricultural Inputs (LANIA) belonging to the Colombian Agricultural Institute (ICA), a comparison of two methodologies for the identification of endomicorrizas was made and a reference sample belonging to LANIA was analyzed whose purpose was the experimental demonstration of the methodology provided by the ICA. In the comparison of methodologies, two stipulated methods were used: the first one developed in 2017 by the ICA and the second method was provided by the National University of Colombia (UN) in 2010, whose purpose is to analyze the Staining procedures with Tripán blue and the separation and identification of spores. For the analysis of the reference sample, *Urochloa decumbens* (wire grass) was used as a plant species, and aimed to analyze the methodology given by the ICA, managing to perform the analysis of the number of infective propagules by means of the most probable number method (MPN). At the end of the comparison of the two methods it was deduced that they have the same objective, where the materials and supplies used do not affect the results. On the other hand, in the identification and counting method, it is possible to observe the presence of spores belonging to the genus *Glomus* sp. It is

Calle 14 Avenida 15 Barrio Berlín Facatativá – Cundinamarca
Teléfono (091) 892 07 07 Línea Gratuita 018000976000
www.ucundinamarca.edu.co E-mail: info@ucundinamarca.edu.co
NIT: 890.680.062-2



MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAR113
PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
	PAGINA: 4 de 8

concluded that with the implementation of the methodology described by the ICA, it was possible to visualize, observe and identify the typical structures of the HMA vesicular-arbuscular mycorrhizae, belonging to a reference sample, enriching the viability and accuracy to work the samples of Agricultural bio-inputs entering the LANIA laboratory.

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Por medio del presente escrito autorizo (Autorizamos) a la Universidad de Cundinamarca para que, en desarrollo de la presente licencia de uso parcial, pueda ejercer sobre mí (nuestra) obra las atribuciones que se indican a continuación, teniendo en cuenta que, en cualquier caso, la finalidad perseguida será facilitar, difundir y promover el aprendizaje, la enseñanza y la investigación.

En consecuencia, las atribuciones de usos temporales y parciales que por virtud de la presente licencia se autoriza a la Universidad de Cundinamarca, a los usuarios de la Biblioteca de la Universidad; así como a los usuarios de las redes, bases de datos y demás sitios web con los que la Universidad tenga perfeccionado una alianza, son:

Marque con una "X":

AUTORIZO (AUTORIZAMOS)	SI	NO
1. La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer.	X	
2. La comunicación pública por cualquier procedimiento o medio físico o electrónico, así como su puesta a disposición en Internet.	X	
3. La inclusión en bases de datos y en sitios web sean éstos onerosos o gratuitos, existiendo con ellos previa alianza perfeccionada con la Universidad de Cundinamarca para efectos de satisfacer los fines previstos. En este evento, tales sitios y sus usuarios tendrán las mismas facultades que las aquí concedidas con las mismas limitaciones y condiciones.	X	
4. La inclusión en el Repositorio Institucional.	X	

De acuerdo con la naturaleza del uso concedido, la presente licencia parcial se otorga a título gratuito por el máximo tiempo legal colombiano, con el propósito de que en dicho lapso mi (nuestra) obra sea explotada en las condiciones aquí estipuladas y para los fines indicados, respetando siempre la titularidad de los

Calle 14 Avenida 15 Barrio Berlín Facatativá – Cundinamarca
Teléfono (091) 892 07 07 Línea Gratuita 018000976000
www.ucundinamarca.edu.co E-mail: info@ucundinamarca.edu.co
NIT: 890.680.062-2



MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
	PAGINA: 5 de 8

derechos patrimoniales y morales correspondientes, de acuerdo con los usos honrados, de manera proporcional y justificada a la finalidad perseguida, sin ánimo de lucro ni de comercialización.

Para el caso de las Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía, de manera complementaria, garantizo en mi calidad de estudiante y por ende autor exclusivo, que la Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía en cuestión, es producto de mi (nuestra) plena autoría, de mi esfuerzo personal intelectual, como consecuencia de mi creación original particular y, por tanto, soy el único titular de la misma. Además, aseguro que no contiene citas, ni transcripciones de otras obras protegidas, por fuera de los límites autorizados por la ley, según los usos honrados, y en proporción a los fines previstos; ni tampoco contempla declaraciones difamatorias contra terceros; respetando el derecho a la imagen, intimidad, buen nombre y demás derechos constitucionales. Adicionalmente, manifiesto que no se incluyeron expresiones contrarias al orden público ni a las buenas costumbres. En consecuencia, la responsabilidad directa en la elaboración, presentación, investigación y, en general, contenidos de la Tesis o Trabajo de Grado es de mi competencia exclusiva, eximiendo de toda responsabilidad a la Universidad de Cundinamarca por tales aspectos.


Sin perjuicio de los usos y atribuciones otorgadas en virtud de este documento, continuaré conservando los correspondientes derechos patrimoniales sin modificación o restricción alguna, puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación de los derechos patrimoniales derivados del régimen del Derecho de Autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “*Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores*”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables. En consecuencia, la Universidad de Cundinamarca está en la obligación de RESPETARLOS Y HACERLOS RESPETAR, para lo cual tomará las medidas correspondientes para garantizar su observancia.

NOTA: (Para Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía):

Información Confidencial:

Esta Tesis, Trabajo de Grado o Pasantía, contiene información privilegiada, estratégica, secreta, confidencial y demás similar, o hace parte de la investigación que se adelanta y cuyos resultados finales no se han publicado. **SI ___ NO X_.** En caso afirmativo expresamente indicaré (indicaremos), en carta adjunta tal situación con el fin de que se mantenga la restricción de acceso.

	MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAR113
	PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
		PAGINA: 6 de 8

LICENCIA DE PUBLICACIÓN

Como titular(es) del derecho de autor, confiero(erimos) a la Universidad de Cundinamarca una licencia no exclusiva, limitada y gratuita sobre la obra que se integrará en el Repositorio Institucional, que se ajusta a las siguientes características:

- a) Estará vigente a partir de la fecha de inclusión en el repositorio, por un plazo de 5 años, que serán prorrogables indefinidamente por el tiempo que dure el derecho patrimonial del autor. El autor podrá dar por terminada la licencia solicitándolo a la Universidad por escrito. (Para el caso de los Recursos Educativos Digitales, la Licencia de Publicación será permanente).
- b) Autoriza a la Universidad de Cundinamarca a publicar la obra en formato y/o soporte digital, conociendo que, dado que se publica en Internet, por este hecho circula con un alcance mundial.
- c) Los titulares aceptan que la autorización se hace a título gratuito, por lo tanto, renuncian a recibir beneficio alguno por la publicación, distribución, comunicación pública y cualquier otro uso que se haga en los términos de la presente licencia y de la licencia de uso con que se publica.
- d) El(Los) Autor(es), garantizo (amos) que el documento en cuestión, es producto de mi (nuestra) plena autoría, de mi (nuestro) esfuerzo personal intelectual, como consecuencia de mi (nuestra) creación original particular y, por tanto, soy (somos) el(los) único(s) titular(es) de la misma. Además, aseguro(aseguramos) que no contiene citas, ni transcripciones de otras obras protegidas, por fuera de los límites autorizados por la ley, según los usos honrados, y en proporción a los fines previstos; ni tampoco contempla declaraciones difamatorias contra terceros; respetando el derecho a la imagen, intimidad, buen nombre y demás derechos constitucionales. Adicionalmente, manifiesto (manifestamos) que no se incluyeron expresiones contrarias al orden público ni a las buenas costumbres. En consecuencia, la responsabilidad directa en la elaboración, presentación, investigación y, en general, contenidos es de mí (nuestro) competencia exclusiva, eximiendo de toda responsabilidad a la Universidad de Cundinamarca por tales aspectos.
- e) En todo caso la Universidad de Cundinamarca se compromete a indicar siempre la autoría incluyendo el nombre del autor y la fecha de publicación.
- f) Los titulares autorizan a la Universidad para incluir la obra en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.
- g) Los titulares aceptan que la Universidad de Cundinamarca pueda convertir el documento a cualquier medio o formato para propósitos de preservación digital.

Calle 14 Avenida 15 Barrio Berlín Facatativá – Cundinamarca
Teléfono (091) 892 07 07 Línea Gratuita 018000976000
www.ucundinamarca.edu.co E-mail: info@ucundinamarca.edu.co
NIT: 890.680.062-2



h) Los titulares autorizan que la obra sea puesta a disposición del público en los términos autorizados en los literales anteriores bajo los límites definidos por la universidad en el “Manual del Repositorio Institucional AAAM003”

i) Para el caso de los Recursos Educativos Digitales producidos por la Oficina de Educación Virtual, sus contenidos de publicación se rigen bajo la Licencia Creative Commons: Atribución- No comercial- Compartir Igual.



j) Para el caso de los Artículos Científicos y Revistas, sus contenidos se rigen bajo la Licencia Creative Commons Atribución- No comercial- Sin derivar.




Nota:

Si el documento se basa en un trabajo que ha sido patrocinado o apoyado por una entidad, con excepción de Universidad de Cundinamarca, los autores garantizan que se ha cumplido con los derechos y obligaciones requeridos por el respectivo contrato o acuerdo.

La obra que se integrará en el Repositorio Institucional, está en el(los) siguiente(s) archivo(s).

Nombre completo del Archivo Incluida su Extensión (Ej. PerezJuan2017.pdf)	Tipo de documento (ej. Texto, imagen, video, etc.)
1. COMPARACIÓN DE DOS METODOLOGÍAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE BIOINSUMOS AGRÍCOLAS EN EL INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO SECCIONAL CUNDINAMARCA. PDF	Texto

	MACROPROCESO DE APOYO	CÓDIGO: AAAr113
	PROCESO GESTIÓN APOYO ACADÉMICO	VERSIÓN: 3
	DESCRIPCIÓN, AUTORIZACIÓN Y LICENCIA DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	VIGENCIA: 2017-11-16
		PAGINA: 8 de 8

En constancia de lo anterior, Firmo (amos) el presente documento:

APELLIDOS Y NOMBRES COMPLETOS	FIRMA (autógrafo)
López Luque María Isabel	Isabe López Luque

21.1-40

**COMPARACIÓN DE DOS METODOLOGÍAS PARA EL CONTROL DE
CALIDAD DE BIOINSUMOS AGRÍCOLAS EN EL INSTITUTO COLOMBIANO
AGROPECUARIO SECCIONAL CUNDINAMARCA.**

María Isabel López Luque

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA INGENIERÍA AGRONÓMICA
FACATATIVÁ**

2019

**COMPARACIÓN DE DOS METODOLOGÍAS PARA EL CONTROL DE
CALIDAD DE BIOINSUMOS AGRÍCOLAS EN EL INSTITUTO COLOMBIANO
AGROPECUARIO SECCIONAL CUNDINAMARCA.**

María Isabel López Luque.

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de

Ingeniera Agrónoma

Directora

Liz Karen Ruiz Bohórquez

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA INGENIERÍA AGRONÓMICA
FACATATIVÁ**

2019

NOTA DE ACEPTACIÓN

Liz Karen Ruiz Bohórquez

Directora de Trabajo de Grado

Daniel Cubillos Pedraza

Jurado

Diego Alexander Hernández

Jurado

AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de mi etapa universitaria llegaron varias personas que de una u otra manera depositaron su amor, confianza y apoyo en mí, logrando hasta el día de hoy seguir siendo un ejemplo de vida:

Con estas palabras quiero agradecerle primeramente a Dios por haberme permitido creer y confiar en mis capacidades durante toda mi vida y en mi desarrollo profesional, guiándome día a día y bendiciendo cada uno de los pasos en mi hermosa carrera.

A mis padres por quienes soy la persona y futura profesional, que con su apoyo y acogimiento único lograron ayudarme con mucho amor a recorrer cada uno de los caminos que la vida me ha colocado para bien. A ellos mil gracias por ser las mejores personas para mi vida y por contribuir a realizar cada uno de los sueños pensados.

A Joan Camilo Gomez C., quien me brindo su amor y cariño acompañándome, guiándome y enseñándome, diferentes visiones a nivel profesional, logrando convertirse en un gran apoyo para mi vida y para mi profesión.

A la Universidad de Cundinamarca y al programa de Ingeniería Agronómica por transmitir durante los 9 semestres un conocimiento indispensable y base para contribuir de manera positiva y con mucha pasión la ayuda a nuestros campos Colombianos.

Al Instituto Colombiano Agropecuario ICA, por permitir realizar mi proyecto de grado junto a la colaboración de grandes personas, que lograron depositar su confianza y ayuda durante mi proceso.

CONTENIDO

I. RESUMEN	8
II. ABSTRACT	9
III. INTRODUCCIÓN	10
IV. OBJETIVOS.....	12
a. General.....	12
b. Específicos.....	12
V. MARCO DE REFERENCIA	13
1. Marco conceptual	13
a. Micorrizas	13
b. Arbusculos	13
c. Vesículas.....	13
d. Endomicorrizas	14
2. Marco teórico.....	14
a. Microorganismos	14
b. Clasificación de los microorganismos	15
c. Microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPR).....	16
d. Micorrizas	16
e. Clasificación de micorrizas arbusculares (HMA)	17
f. Ciclo de vida.....	19

g.	Clasificación de las micorrizas	20
h.	Clasificación de las hifas de las HMA.....	21
i.	Tipos morfológicos de colonización de las micorrizas	21
j.	Importancia de los HMA en la agricultura.....	22
k.	<i>Urochloa decumbens</i>	24
l.	Número más probable	25
VI.	PROCEDIMIENTO	26
VII.	RESULTADOS	33
a.	Comparación de metodologías:	33
b.	Muestra de referencia:	38
VIII.	DISCUSIÓN.....	45
a.	Comparación de metodologías	45
b.	Análisis de la muestra de referencia.....	48
IX.	CONCLUSIONES	52
X.	RECOMENDACIONES	53
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	54
XII.	ANEXOS	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clasificación de Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares</i>	18
Tabla 2, <i>Preparación de sustratos</i>	29
Tabla 3, <i>Preparación de diluciones en base 4</i>	29
Tabla 4, <i>Tinción azul de Tripano</i>	30
Tabla 5, <i>Comparación de métodos de tinción de tripano para la observación de porcentaje de colonización de HMA</i>	33
Tabla 6, <i>Comparación métodos de separación de esporas</i>	36
Tabla 7, <i>Conteo y/o identificación de esporas</i>	37
Tabla 8, <i>Conteo de esporas</i>	38
Tabla 9, <i>Identificación de géneros</i>	39
Tabla 10, <i>Resultado propágulos infectivos HMA</i>	43
Tabla 11, <i>Tabla Fisher and Yates</i>	59

TABLA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. <i>Simbiosis planta- hongo</i>	21
Ilustración 2. <i>Simbiosis planta- hongo</i>	22
Ilustración 3. <i>Significado y aplicación de micorrizas en la agricultura</i>	24
Ilustración 4, <i>Tinción azul de tripano, UNAL</i>	35
Ilustración 5, <i>Tinción azul de tripano, Instituto Colombiano Agropecuario</i>	35
Ilustración 6, <i>Diluciones seriadas en base cuatro, controles positivos y negativos</i>	42
Ilustración 7, <i>Diferencia en la densidad y longitud del sistema radicular de la Urochloa decumbens</i>	50
Ilustración 8, <i>Formación de las tres capas con la aplicación de sacarosa al 80%</i>	58
Ilustración 9, <i>Extracción capa central (suspensión de esporas)</i>	58

I. RESUMEN

En el Laboratorio Nacional de Insumos Agrícolas (LANIA) perteneciente al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), se hizo la comparación de dos metodologías para la identificación de endomicorrizas y se analizó una muestra de referencia perteneciente a LANIA cuyo propósito fue la demostración experimental de la metodología proporcionada por el ICA. En la comparación de metodologías, se utilizaron dos métodos estipulados: el primero desarrollado en el año 2017 por el ICA y el segundo método fue proporcionado por la Universidad Nacional de Colombia (UN) en el año 2010, cuya finalidad es analizar los procedimientos de Tinción con azul de Tripán y la separación e identificación de esporas. Para el análisis de la muestra de referencia se utilizó como especie vegetal *Urochloa decumbens* (pasto alambre), y tuvo como objetivo analizar la metodología dada por el ICA, logrando realizar el análisis del número de propágulos infectivos por medio del método número más probable (NMP). Al finalizar la comparación de los dos métodos se dedujo que tienen un mismo objetivo, donde los materiales e insumos utilizados no afectan los resultados. Por otra parte en el método de identificación y conteo, se logra observar la presencia de esporas pertenecientes al género *Glomus* sp. Se logra concluir que con la implementación de la metodología descrita por el ICA, se logró visualizar, observar e identificar las estructuras típicas de las micorrizas vesículo-arbusculares HMA, pertenecientes a una muestra de referencia enriqueciendo la viabilidad y la exactitud para trabajar las muestras de bioinsumos agrícolas que ingresan al laboratorio LANIA.

Palabras clave: Colombia, Endomicorrizas, ICA, Micorrizas, *Urochloa decumbens*.

II. ABSTRACT

In the National Laboratory of Agricultural Inputs (LANIA) belonging to the Colombian Agricultural Institute (ICA), a comparison of two methodologies for the identification of endomicorrizas was made and a reference sample belonging to LANIA was analyzed whose purpose was the experimental demonstration of the methodology provided by the ICA. In the comparison of methodologies, two stipulated methods were used: the first one developed in 2017 by the ICA and the second method was provided by the National University of Colombia (UN) in 2010, whose purpose is to analyze the Staining procedures with Tripan blue and the separation and identification of spores. For the analysis of the reference sample, *Urochloa decumbens* (wire grass) was used as a plant species, and aimed to analyze the methodology given by the ICA, managing to perform the analysis of the number of infective propagules by means of the most probable number method (MPN). At the end of the comparison of the two methods it was deduced that they have the same objective, where the materials and supplies used do not affect the results. On the other hand, in the identification and counting method, it is possible to observe the presence of spores belonging to the genus *Glomus sp.* It is concluded that with the implementation of the methodology described by the ICA, it was possible to visualize, observe and identify the typical structures of the HMA vesicular-arbuscular mycorrhizae, belonging to a reference sample, enriching the viability and accuracy to work the samples of Agricultural bio-inputs entering the LANIA laboratory.

Keywords: Colombia, Endomicorrizas, ICA, Micorrizas, *Urochloa decumbens*.

III. INTRODUCCIÓN

El aumento de la producción agrícola en Colombia juega un papel fundamental en la contribución a la economía y desarrollo del país. En este ámbito el sector agrícola promueve la generación de empleo, reducción de pobreza, proporciona una mejor calidad de vida al sector rural y urbano, siendo el principal factor predominante en la seguridad y soberanía alimentaria.

Sin embargo este sector conlleva y genera diversas problemáticas en ámbitos relacionados con los recursos naturales y medio ambiente, en estos aspectos abunda el mal uso del suelo, afectación de recursos hídricos, sobre explotación de recursos naturales, contribución al cambio climático y degradación del suelo. Estas problemáticas han aumentado debido al mal uso de las diversas técnicas agrícolas, el elevado consumo de productos inorgánicos de procedencia química, la producción a gran escala de monocultivos y la falta de asistencia técnica, generando impactos negativos en el medio ambiente (Perfetti, Balcázar, Hernández & Leibovich 2012).

A causa de los daños generados al medio ambiente, se han establecido diversas estrategias que minimicen la utilización de productos químicos, los bioinsumos agrícolas surgen como una alternativa cuya importancia radica en la disminución de plagas y enfermedades, mejorando a su vez la fertilidad del suelo promoviendo así una agricultura sostenible y sustentable (Aristizábal, 2013).

De este modo surgen los bioinsumos agrícolas, estos se derivan de la combinación de sustancias de origen biológico o natural, cuyo propósito es disminuir la infestación de plagas y enfermedades, contribuir a una fertilización más sostenible y amigable con los recursos naturales y mejorar la productividad de los cultivos (ICA, 2011).

Finalizando logramos destacar la importancia de los bioinsumos como un eje positivo en la agricultura, destacando la interacción simbiótica de hongos micorrízicos arbusculares con el

sistema radicular de las plantas, cumpliendo un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de estas (Mojica et al., 2014),

IV. OBJETIVOS

a. General

Comparar dos metodologías para identificación de endomicorrizas en bioinsumos agrícolas en una especie vegetal en el Instituto Colombiano Agropecuario Mosquera Cundinamarca.

b. Específicos

Realizar la comparación de tres procedimientos para la identificación de endomicorrizas.

Cuantificar los propágulos infectivos de micorrizas, mediante la metodología del (NMP), identificación y enumeración de esporas en la especie *Urochloa decumbens* por el método descrito por el ICA.

Analizar los datos obtenidos a partir de la tabla descrita por Fisher y Yates (1970).

V. MARCO DE REFERENCIA

1. Marco conceptual

a. Micorrizas

Las micorrizas son una asociación simbiótica entre las raíces de plantas vasculares y hongos del suelo, Generalmente estos hongos necesitan de la plantas para la captación de carbono y energía entregando los nutrientes y minerales no móviles como el Fosforo (P). Estos hongos a la vez tienen la capacidad de brindar sustancias reguladoras de crecimiento y la captación de Nitrogeno (N) por medio de bacterias fijadoras (Blanco & Salas , 1997).

b. Arbusculos

Se clasifican como estructuras características de la simbiosis, donde se genera un intercambio de nutrientes entre las plantas y los hongos. Realizando la planta un intercambio de carbohidratos, mientras el hongo le induce cambio de nutrientes con iones de fosfatos (Sainz, 2005).

c. Vesículas

Algunos géneros de hongos micorrízicos tienen la capacidad de formar vesículas, las cuales están principalmente compuestas por lípidos y se encuentran intercelularmente en la corteza de la raíz, las vesículas son definidas como reservorios de nutrientes para los hongos (Gomez, Portugal, Arriaga, & Contreras 2007).

d. Endomicorrizas

El proceso de colonización es realizado intercelularmente, por lo que su identificación no se observa a simple vista. En este proceso las hifas ingresan entre las células de las raíces, para posteriormente penetrar en el interior de estas, donde se lleva a cabo la formación de vesículas o arbusculos. Generalmente estas micorrizas se encuentran en asociación con las gramíneas (Roman & De Miguel, 2000).

2. Marco teórico

a. Microorganismos

Microscópicamente el suelo está constituido por diferentes organismos, cuyas diferencias se basan en los tamaños, morfología, división celular, grupos y procesos que desempeñan de manera indirecta y directa en la movilización y asimilación de nutrientes para las especies vegetales, junto con la formación de algunas estructuras del suelo (Garzon, 2015).

Dichos procesos realizados por los microorganismos han sido basados en procesos biotecnológicos como lo es la formación de fármacos y el funcionamiento de los ecosistemas, demostrando una disminución en las pérdidas económicas en diferentes sectores tales como la agricultura. Sin embargo algunos organismos vivos presentes en la microbiota del suelo pueden llegar a causar enfermedades, que al no ser controladas aumentan el umbral de daño económico (UDE), identificado como el punto máximo de pérdida que puede generar una población (Pedigo, S.f).

La diversidad microbiana es muy amplia, pero muy poco investigada, Cavalier (2004) afirmó... “Aun cuando se estima que sólo se conoce el 3% de los microorganismos y que pocos se han estudiado con profundidad, resulta sorprendente su diversidad en relación con la variedad de plantas y animales”, justificando la importancia del estudio de estos organismos para la

ampliación histórica y su aplicación a campos experimentales de acción positiva frente al ambiente, la biotecnología, los animales y los humanos.

b. Clasificación de los microorganismos

Gamboa, Heredia, Reyes , & Garcia (*S.f*) demostraron que hay aproximadamente 11.000 sp., de bacterias y entre 10.000 sp., de hongos filamentosos y levaduras, (Asociación Española de Fabricantes de Agro Nutrientes, 2017) afirmó que: *Hay diversos grupos de organismos como las bacterias, cianobacterias, micro algas, protozoos, levaduras y hongos filamentosos, también podemos incluir a los virus, aunque no son considerados seres vivos por muchos investigadores, pero tienen determinadas aplicaciones en la agricultura, como en la elaboración de fertilizantes, descomposición de materia orgánica o productos fitosanitarios.*

La composición de la microbiota del suelo con la presencia de organismos vivos radica fundamentalmente en la descomposición de materia orgánica por medio de la presencia de hongos y bacterias que ayudan a liberar diferentes nutrientes como carbono, nitrógeno, fósforo etc., dejándolos disponibles para que las plantas realicen procesos de absorción (Montaño, et al., 2010).

Este desarrollo se realiza de manera directa mediante el sistema radicular de las especies vegetales o indirectamente con microorganismos que son capaces de realizar simbiosis en las raíces conocidos como (hongos formadores de micorrizas); cuyo propósito se basa en la acción mutualista que pueden llegar a tener los organismos, realizando un beneficio mutuo en los procesos de desarrollo. (Perez, Montes & Rojas, 2011).

Suarez & Moreno (2010) recalcaron que hace más de 25 años, se distinguió la aplicación de enmiendas orgánicas, cuyos resultados en los procesos de descomposición realizado por los microorganismos, tiene como finalidad llegar a tener efectos positivos sobre enfermedades

causadas por patógenos e incluso en la presencia de plagas, logrando brindar defensas y mayor cantidad de nutrientes a las plantas.

c. Microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPR)

El avance de la tecnología ha permitido introducir organismos biológicos que han logrado demostrar una relación directamente relacionada con la rizosfera y el sistema radicular de las plantas, como por ejemplo organismos capaces de fijar nitrógeno, producción de ácidos orgánicos y la solubilización de algunos elementos químicos (Puente, Garcia, Rubio & Peticari, 2010).

Según Gonzales & Fuentes (2017), las interacciones que realizan los hongos formadores de micorrizas arbusculares como promotores de crecimiento vegetal y hongos del genero *Trichoderma*, pueden llegar a ejercer beneficios en los procesos de crecimiento y productividad de las plantas, estos actualmente están catalogados como agentes de control biológico cuya función está ampliamente ligada a los factores bióticos, como la composición del suelo y el reconocimiento de la planta frente a los microorganismos.

d. Micorrizas

El botánico francés Albert Bernhard Frank en 1885, observo, describió y bautizo las micorrizas, mediante la identificación de estos microorganismo en diferentes árboles frutales, describiéndolos como estructuras resultantes de la asociación simbiótica del micelio de un hongo y el sistema radicular de las plantas, dicho proceso “simbiosis”, es fundamental en el desarrollo y establecimiento de ecosistemas, ya que si se generan cambios biofísicos internos en el suelo, se verá afectada la densidad de las micorrizas pero las esporas suelen quedar latentes (Diaz, et al., 2016).

Razón por la se ha logrado demostrar que la presencia de estos hongos en el suelo se ven influenciados por: la composición química, humedad y estructura, correlacionándolos en los procesos de distribución de estos hongos, siendo así Martínez & Pugnaire (2009) indicaron que el Nitrogeno (N), es uno de los elementos que ha demostrado mayor distribución en las comunidades de HMA, teniendo como base que las plantas que suelen componer una comunidad vegetal están relacionadas directamente ya que dependen de las micorrizas, teniendo aspectos positivos en los procesos de simbiosis donde ambos organismos se benefician y negativa donde una especie HMA pueda aportar el máximo beneficio a una especie de dicha comunidad vegetal pero puede mostrar un mejor desarrollo al realizar simbiosis con otra especie diferente, produciendo así un beneficio en el ciclo manteniendo la diversidad ecosistémica.

Lo anterior concuerda con lo expuesto por (Miller & Fitzsimons, 2008) quienes demostraron en sus investigaciones al probar 3 nichos descritos como: especie de composición de plantas, historial de perturbaciones y la composición química del suelo, las cuales se compararon con las comunidades de las micorrizas, donde dedujeron que cada una de las variables se relacionó significativamente con el cambio de la comunidad.

Para lograr evaluar las diferentes relaciones de las HMA con las especies vegetales y cuál es su grado de colonización, se realizan por medio de ensayos de identificación, mediante la observación microscópica del micelio y la descripción taxonómica de las esporas presentes en el suelo, para la parte radicular de las plantas se basa en procesos de tinción y decoloración con el fin de cuantificar el porcentaje de colonización (Martínez & Pugnaire, 2009).

e. Clasificación de micorrizas arbusculares (HMA)

Actualmente los estudios taxonómicos de estos hongos se han basado en la morfología y la apariencia de las esporas. La identificación de géneros y familias se han basado principalmente

en la unión de las hifas de los hongos y el modo en que estas forman las esporas. (Perez *et al.*, 2011) realizó estudios sobre el aislamiento y el porcentaje de colonización de hongos formadores de micorrizas en la rizosfera del pasto (*Dichanthium aristatum*), en el municipio de Tolú-Colombia donde obtuvo como resultado que aproximadamente el 92% de las especies encontradas pertenecían a las características de HMA del género *Glomus* sp., el 4% al género *Gigaspora* sp., y el 4% restante a *Paraglomus* sp., en total se encontraron 25 morfo tipos.

(Ramos, Marrufo, Guadarrama, & Carrillo, S.f), citaron la clasificación donde se demuestra que hay nueve familias de hongos micorrizógenos y aproximadamente 200 especies en todo el mundo (Ver tabla1).

Tabla 1. Clasificación de Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares.

Orden	Familia	Género
Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i>
	Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i>
		<i>Scutellospora</i>
		<i>Acaulospora</i>
Diversisporales	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>
	Entrophosporaceae	<i>Kuklospora</i>
		<i>Entrophospora</i>
		<i>Pacispora</i>
Paraglomerales	Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
	Diversisporaceae	<i>Diversispora</i>
	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
Archaeosporales	Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>
	Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i>
		<i>Intraspora</i>

Fuente: (Ramos, Marrufo, Guadarrama & Carrillo, S.f). Recuperado de: <https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap4/07%20Hongos%20micorrozicos.pdf>

f. Ciclo de vida

Las micorrizas arbusculares se originan a partir de hifas que pueden existir en el suelo, estas se pueden evidenciar en restos del sistema radicular que hayan sido colonizados y por otro lado la existencia de esporas micorrizicas maduras. Cuando las hifas presentes en el suelo logran tener contacto con células epidérmicas de las raíces de las plantas hospederas, realizan el proceso de penetración formando un apresorio (modificación de las hifas para la infección de una célula epidérmica del huésped), el cual atraviesa el espacio intercelular, formando arbusculos y logrando producir un desarrollo de micelio externo el cual se encarga de la captación de nutrientes y la formación de esporas maduras que dan por terminado el ciclo (Leon, 2006).

(Barrer, 2009) Explica que los hongos micorrízicos se caracterizan por tener dos procesos de crecimiento intracelular e intercelular, donde se logran formar dos tipos de estructuras, como las vesículas (Estructuras de almacenamiento que se forman en la parte terminal de las hifas) y los arbusculos (Hifas que se caracterizan por una división dicotómicamente, con periodo de vida muy corto), teniendo en cuenta que algunos géneros como *Gigaspora* sp., producen células auxiliares en vez de vesículas. Cuando las plantas son colonizadas por las micorrizas HMA, el hongo logra transmitir señales a la planta y produciendo cambios fisiológicos y bioquímicos que hacen que el hospedero emita compuestos volátiles los cuales intervienen en el crecimiento de las hifas.

g. Clasificación de las micorrizas

Ectomicorrizas: Se caracterizan por desarrollar el micelio sobre la parte cortical de las raíces, sin el proceso de penetración a las células. Esta clasificación se encuentra asociadas con plantas forestales y leñosas. El porcentaje de estas especies capaces de realizar simbiosis con estas micorrizas es muy bajo. La visualización de estas se facilita porque la raíz produce un cambio morfológico (Roman & De Miguel , 2000).

Endomicorrizas: El proceso de colonización es intercelularmente, por lo que su identificación no se observa a simple vista. En este proceso las hifas ingresan entre las células de las raíces, para posteriormente penetrar en el interior de estas, donde se llevara a cabo la formación de vesículas o arbusculos. Generalmente estas micorrizas se encuentran en asociación con gramíneas. (Roman & De Miguel , 2000) Afirman que en este proceso no se producen cambios morfológicos en las raíces, por lo que se es necesario realizar decoloración y tinciones, con el fin de lograr observar la presencia de esporas dentro de las células.

(Noda, 2009) describió que los arbusculos que presenta esta clasificación se basan por presentar estructuras altamente ramificadas, cuya función radica en la transferencia de nutrientes desde el suelo hacia la planta huésped, mientras las hifas son estructuras que se van a localizar y a extender varios centímetros por fuera de la raíz, con el fin de aumentar la absorción de los mismos.

Ectendomicorrizas: El proceso que realizan estas micorrizas se encuentra intermedio en las endomicorrizas y Ectomicorrizas, ya que estas tienen la capacidad de establecerse en la parte externa y también ejercer el proceso de penetración intercelular. La diferencia es que durante el proceso no hay formaciones vesículas ni arbusculos, tanto así que su utilización es restringida (Roman & De Miguel , 2000).

h. Clasificación de las hifas de las HMA

Hifas efectivas: Son aquellas que inician el proceso de colonización en una o varias raíces

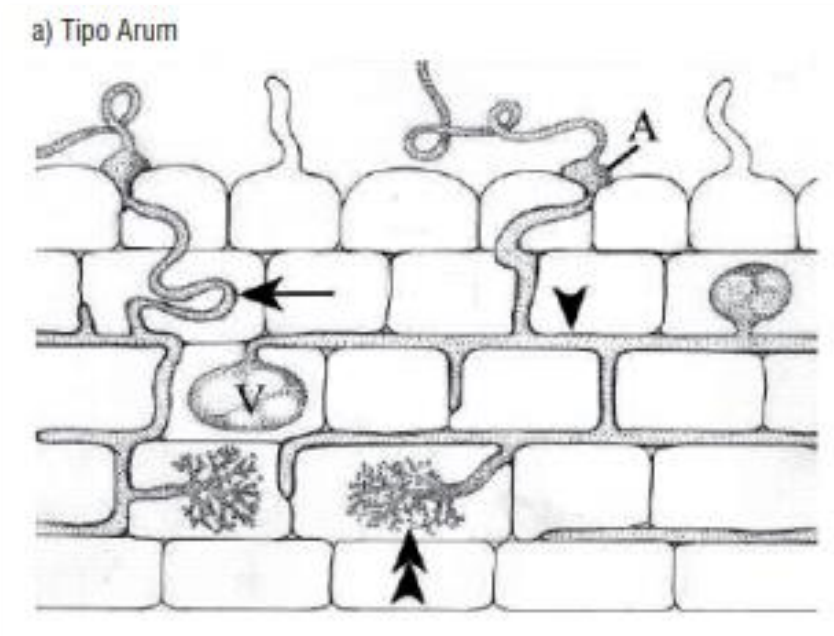
Hifas absorbentes: Exploran el suelo para la extracción de nutrientes

Hifas fértiles: Son aquellas que llevan las esporas.

i. Tipos morfológicos de colonización de las micorrizas

Tipo arum: Crecimiento intercelular de hifas y formación de arbusculos en las células corticales de la raíz, ilustración 1.

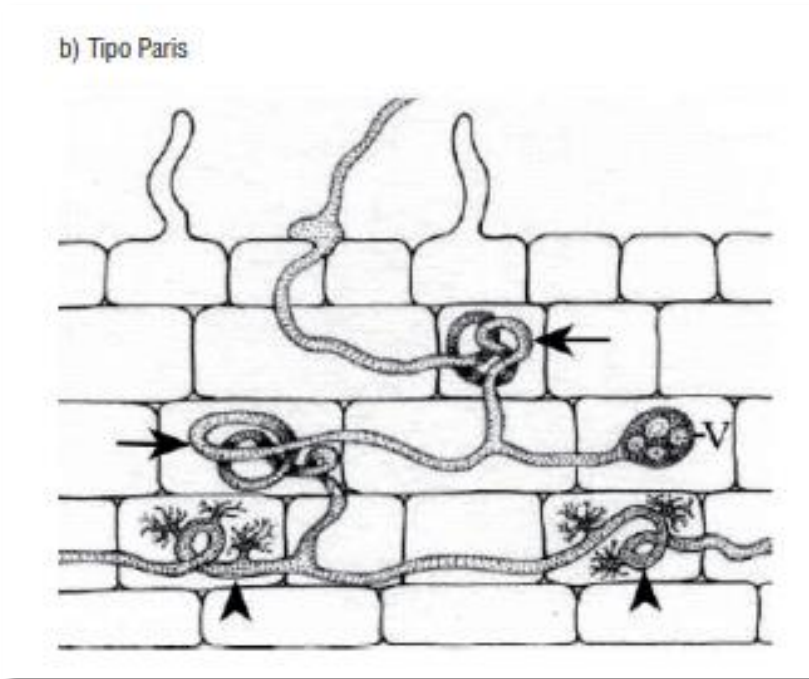
Ilustración 1. *Simbiosis planta- hongo*



Fuente: de: (Barrer, 2009).
Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n1/v7n1a14.pdf>

- **Tipo parís:** Crecimiento intracelular y los arbusculos forman un enrollamiento cuando se encuentran dentro de las células, ilustración 2.

Ilustración 2. *Simbiosis planta- hongo.*



Fuente: de: (Barrer, 2009). Recuperado de:
<http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n1/v7n1a14.pdf>

j. Importancia de los HMA en la agricultura

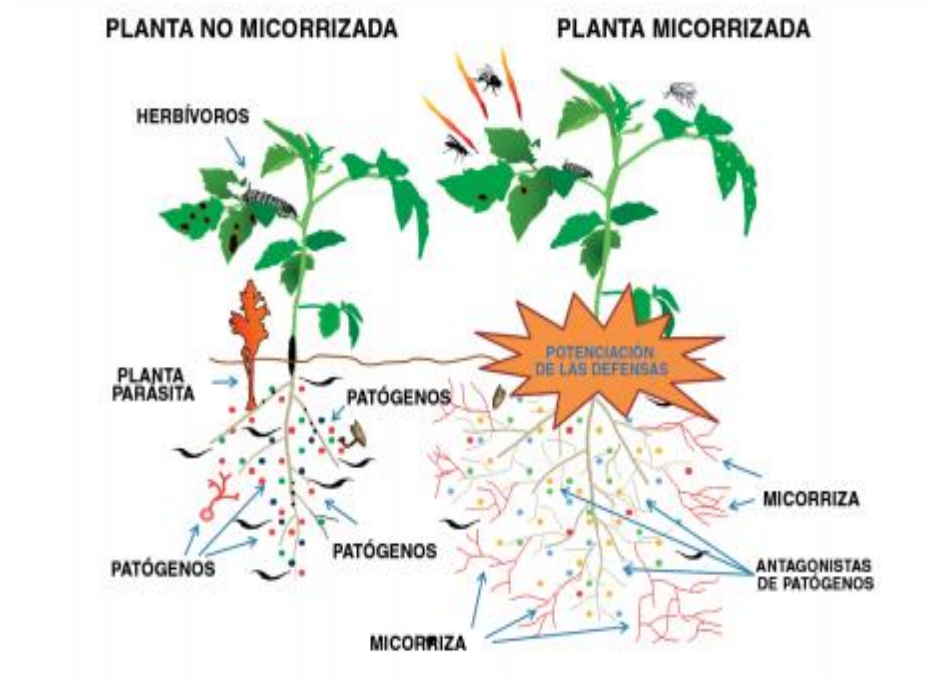
(Noda , 2009) Explico que la presencia de micorrizas en especies frutales está altamente ligada a los procesos de absorción de nutrientes hacia la planta huésped, alta producción de hormonas y mayor concentración de clorofila. En Colombia se han identificado limitantes en los procesos de producción sostenible y eficiente de especies vegetales; razón por la cual se han venido utilizando la aplicación de biofertilizantes en la agricultura obteniendo un amplio

espectro en la capacidad de retención y absorción de nutrientes dentro de las plantas (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2015).

Por otro lado Barea & Azcon (2018), describieron que las micorrizas aparte de ayudar a incrementar la absorción de nutrientes en las plantas, tienen la capacidad de realizar activación de mecanismos defensivos tanto radicularmente como en la parte aérea de estas (Ver ilustración 3). Los fenómenos de sequía y salinidad en el suelo han sido otro limitante en donde la planta entra en un proceso de estrés tanto hídrico como fisiológico, razón por la cual esta tiene que soportar condiciones adversas para no estancar los procesos de productividad; una de las estrategias planteadas por el autor está enfocada en la formación de micorrizas, pues estudios realizados por (Barea *et al.*, 2018) describen que las HMA han tenido la capacidad de mejorar la producción en zonas afectadas por condiciones adversas.

Los ecosistemas semi-áridos se caracterizan por presentar extensas temporadas de sequía durante todo el año, siendo así una consecuencia negativa en los procesos de desarrollo de las especies vegetales, razón por la cual los organismos que viven en estos ecosistemas han desarrollado alternativas de supervivencia para soportar condiciones de estrés hídrico, basadas en la capacidad de generar interacciones de las comunidades vegetales con las HMA, las cuales están presentes en suelos áridos tienen la capacidad de captar de manera más eficaz los nutrientes y el agua en condiciones de sequía ayudando a las plantas a superar las condiciones adversas (Martinez *et al.*, 2009).

Ilustración 3. Significado y aplicación de micorrizas en la agricultura.



Fuente: (Barea et al., 2018).

k. *Urochloa decumbens*

Es una gramínea perenne originaria de África tropical, importante en la alimentación de bovinos ya que presenta buena producción de forraje y a la vez contiene altos porcentajes de nutrientes; por otro lado, es una de las especies que resiste sequías, conteniendo su vigor y rusticidad. En cuanto a las características morfológicas se puede recalcar que su crecimiento es rastrero, presenta hojas pubescentes y medianas lanceoladas. El manejo que se le da a esta especie puede ser para pastoreo, para corte o para ensilaje, mostrando una altura de 30 a 100 cm (Olivera, Machado & Del pozo, 2006).

Urochloa decumbens ha sido catalogada como una especie que tiene capacidad de dependencia micorrizica del 80%, lo cual influye en la mayor capacidad en toma de nutrientes,

minerales y agua, dejándolos disponibles para la especie. Durante varios años se han trabajado estudios de inoculación de las HMA en este pasto, logrando obtener pastizales de alto contenido de nutrientes y materia seca, ahorrando la aplicación de fertilizantes. Como por ejemplo el estudio realizado por (Rivera, Fernandez, & Rodriguez, 2010), donde explican que al inocular HMA *Glomus hoi-like* en *Urochloa decumbens* realizando muestreos a los 30, 60,90 y 120 días después de la siembra, tomaron el sistema radicular a dos profundidades diferentes (0-10 y 10-20 cm), determinando también el número de esporas y porcentaje de colonización. Obteniendo como resultados aumento en la masa seca radicular en la profundidad de 0-10cm pasados los 90 días, llegaron a pesar 0.84 kg/ metro cuadrado, mientras que en la profundidad de 10-20 cm no se presentaron diferencias significativas en los días de muestreos con un valor de 0.11kg/ metro cuadrado. Por lo que los autores dedujeron que los volúmenes del sistema radicular de *Urochloa decumbens* en la profundidad de 0-10 cm es mayor, ya que según investigaciones el 80% de las HMA se encuentran en los primeros 10 cm de profundidad.

1. Número más probable

Estimación de densidades poblacionales, basándose en determinar la ausencia o presencia en replicas a partir de diluciones en muestras de microorganismos que puede contener el suelo, teniendo la capacidad de estimar el tamaño de las poblaciones (Soler, 2006).

Bagyaraj & Stürmer (S.f) describieron que el método del número más probable, se basa principalmente en el número de propágulos infectivos que pueden presentarse en diferentes suelos a partir de una serie de diluciones, donde se estima la presencia o ausencia de micorrizas.

VI. PROCEDIMIENTO

Separación de esporas:

Se pesaron 10 gramos de la muestra de referencia (Realizando 4 réplicas del mismo), aforando con agua corriente a 1000 ml en un Erlenmeyer, posteriormente se procedió a realizar agitación constante durante 30 minutos, dejando reposar las muestras. Pasados cinco (5) minutos, se depositó la muestra en los tamices de 35 y 38 Micrómetros, realizando enjuagues con agua corriente hasta obtener la separación máxima de partículas.

La muestra obtenida en el tamiz de menor tamaño, se traspasó en cuatro tubos falcón 15 mililitros de la muestra obtenida, adicionando a cada uno 20 mililitros de sacarosa al 80% con ayuda de una jeringa especial para micorrizas la cual se introdujo hasta el fondo de la muestra.

Posteriormente se llevó a centrifugar por 20 minutos a 1500 rpm, presentando la formación de tres capas como se observa en la ilustración 8 y 9 en el anexo 1.

, de las cuales se extrajo la capa central (suspensión de esporas), colocándolas sobre el tamiz de 38 mm y realizando varios enjuagues con agua corriente.

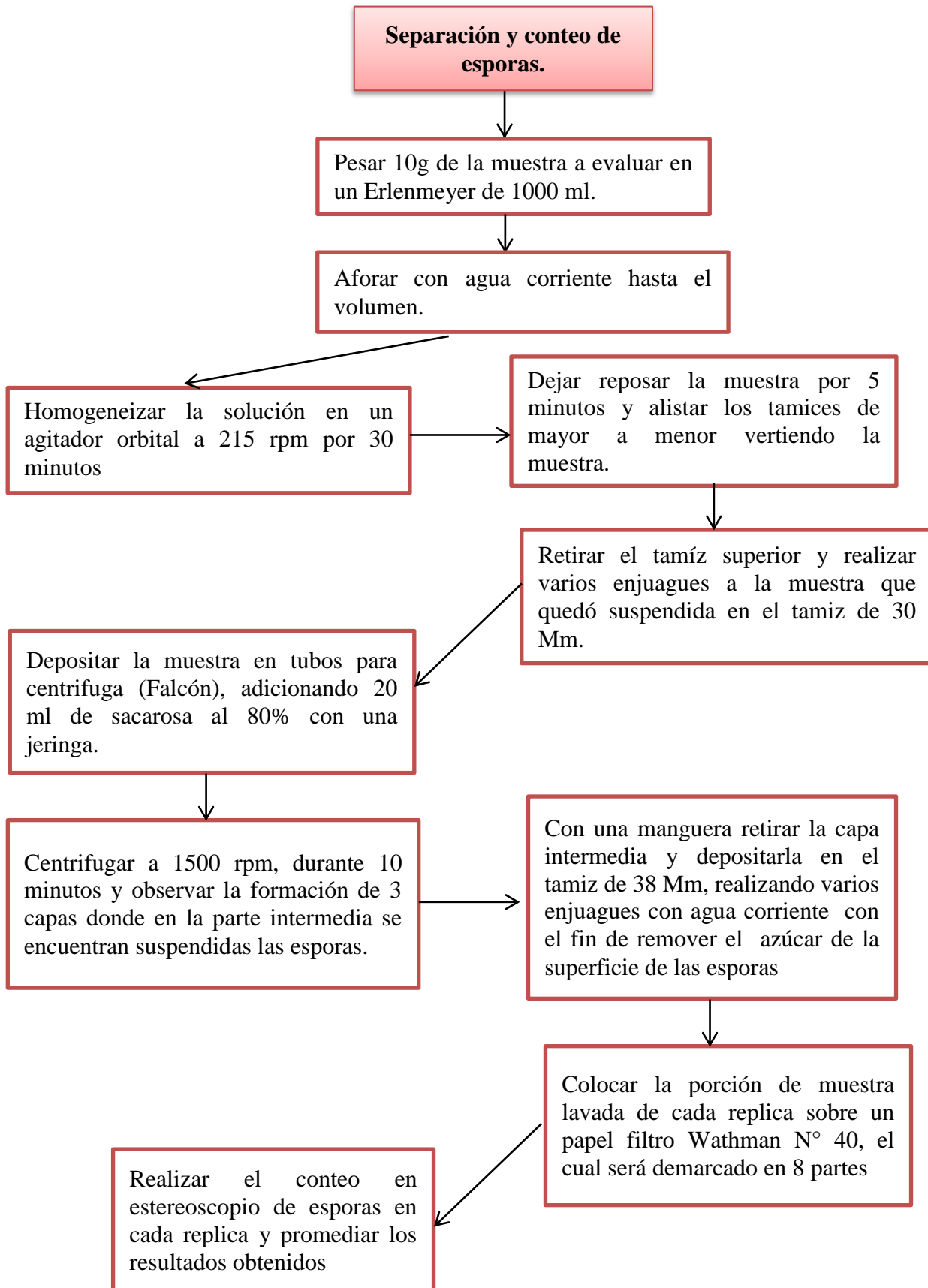
La muestra obtenida de los enjuagues se colocó sobre el papel filtro donde se realizó una cuadrícula con 8 cuadrantes, colocándolo sobre un embudo de vidrio soportado en un Erlenmeyer de 2000 ml y se dejó filtrar por 15 minutos.

Posteriormente se procedió a colocar la cuadrícula sobre una caja de Petri realizando la visualización en el estereoscopio, realizando el conteo de esporas con un contador manual (ICA, 2019, p.8-9).

Montaje e identificación de las esporas:

Posterior a la visualización en el estereoscopio, se procedió a separar las esporas presentes en la cuadrícula, las cuales se colocaron sobre una lámina, que estaba dividida en dos fracciones: La primera se basó en la aplicación de la mezcla Melzer + Poli- Vinílico (PVGL) el cual genera una coloración amarillenta y la segunda se dejó suspendida en PVGL. Seguidamente se realizó la visualización microscópica, con el fin de identificar el género observando la forma, número de paredes, textura, tamaño y color.

Diagrama de flujo:



✚ Metodología NMP

El ensayo se realizará bajo condiciones de invernadero, registrando datos de temperatura y humedad semanalmente mediante un higrotermómetro.

Procedimiento:

Realizar la preparación de tres sustratos:

Tabla 2, Tabla 2, Preparación de sustratos.

Sustrato A	1 kg de la muestra de referencia.
Sustrato B	4 kg de suelo homogenizado seco y tamizado en 0.5 cm.
Sustrato C	11 kg de suelo homogenizado.

Fuente: “Método analítico: Cuantificación de propagulos infectivos de micorrizas utilizando el método NMP”, ICA 2018, p. 4-9.

.A partir de la preparación de la tabla 1, se realizaran diluciones en base cuatro (4), cada una con cinco (5) repeticiones, depositando en los recipientes o materas las siguientes cantidades:

Tabla 3, Tabla 3, Preparación de diluciones en base 4.

Dilución	4^0	4^{-1}	4^{-2}	4^{-3}	4^{-4}	4^{-5}	4^{-6}	4^{-7}	4^{-8}	4^{-9}
Cantidad de sustrato.	150g C+	85 g A +255g B (mezclar)	85 g 4^{-1} + 255g B	85g 4^{-2} + 255g B	85g 4^{-3} + 255g B	85g 4^{-4} + 255g B	85g 4^{-5} + 255g B	85g 4^{-6} + 255g B	85 g 4^{-7} + 255g B	85g 4^{-8} + 255g B
Sobrante	5g	5g	5g	5g	5g	5g	5g	5g	5g	5g

Fuente: “Método analítico: Cuantificación de propagulos infectivos de micorrizas utilizando el método NMP”, ICA 2018, p. 4-9.

Posteriormente se humedecerá cada una de las réplicas y se sembraran 10 semillas de la especie vegetal (*Brachiaria decumbens*) por cada replica.

Pasadas 4 semanas se realizara la cosecha de las plantas, enjuagando con agua corriente el sistema radicular obtenido en las réplicas, para proceder a la tinción de la siguiente manera:

Tabla 4, Tabla 4, Tinción azul de Tripano.

Decoloración H2O2	10%	10 minutos	Temperatura ambiente	
Alcalinización KOH	10%	10-30 minutos	Baño de María 80-90°C	
Acidificación HCl	10%	8-15 minutos	Temperatura ambiente (Agitación constante)	
Coloración Azul de Tripano + Agua	10 %	10 Minutos	Baño de María 80-90°C	
Porcentaje de colonización				

Fuente: ICA, ICA, (2018, julio). Método analítico: Cuantificación de propagulos infectivos de micorrizas utilizando el método NMP (4-9).

Análisis:

Para cada una de las diluciones y sus respectivas replicas se realizó el conteo de las raíces positivas para aquellas que contienen infección y negativas para el caso contrario, Estos resultados serán obtenidos por medio de la formula descrita por (Fisher & Yates, 1970) (Ver anexo 2).

$$\text{Log} = x. \text{Log } a-k$$

Dónde:

x = número de macetas colonizadas / número de repeticiones por dilución.

y = (s) – x. (Esta variable se requiere para hallar K en la tabla de Fisher)

a = factor de dilución

k = se encuentra en la tabla VIII de Fisher y Yates (1970), Anexo 1. Y determina el valor de x o y. Si $x > 2,5$ o alternativamente $y > 3,5$, el valor de K aplicado es 0,552.

s= Numero de niveles de dilución.

Los resultados obtenidos serán descritos como número de propagulos infectivos en 100 gramos de suelo seco.

 **Límites con el 95% de confianza de Ω superior e inferior:**

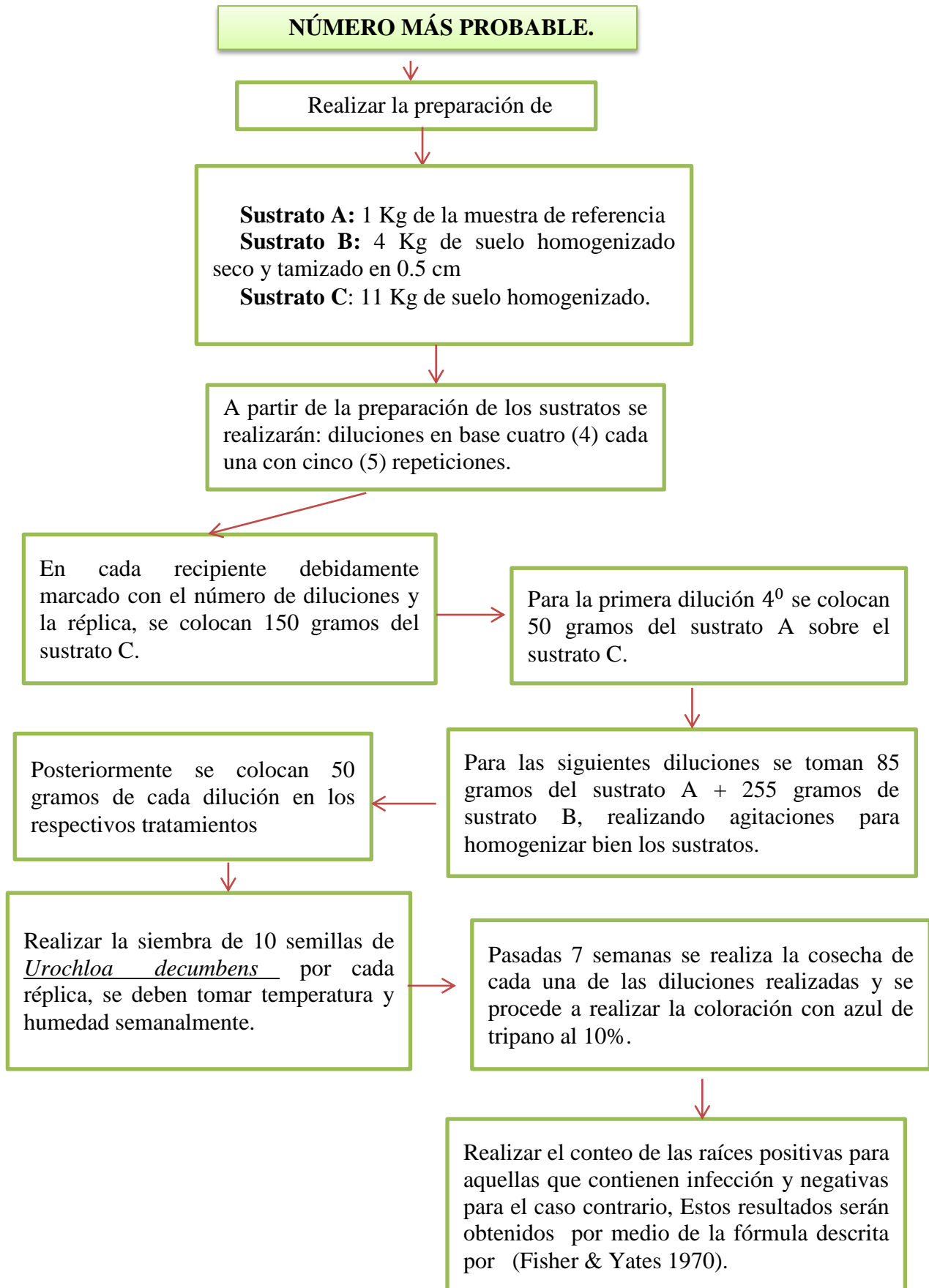
$$\log s. i = \log \Omega \pm \left[\left(\frac{s \Omega}{(n \cdot \frac{1}{2})} \right) * 1.645 \right]$$

S = 0,2011/2 para la cuádruple dilución.

n = número de réplicas por dilución.

z = 1,645 para el 95% de probabilidad.

Diagrama de flujo:



VII. RESULTADOS

a. Comparación de metodologías:

Al realizar la comparación de los dos métodos estipulados se logró identificar que las diferencias de estos, radicó principalmente en la aplicación de lacto glicerol o lacto-glicerol en la parte final del proceso de tinción, por otra parte los procesos de decoloración, alcalinización y acidificación a pesar que los tiempos son de rangos diferentes muestran la misma efectividad en los procesos de observación como se observa en la tabla 5.

Tabla 5, Tabla 5. Comparación de métodos de tinción de tripano para la observación de porcentaje de colonización de HMA.

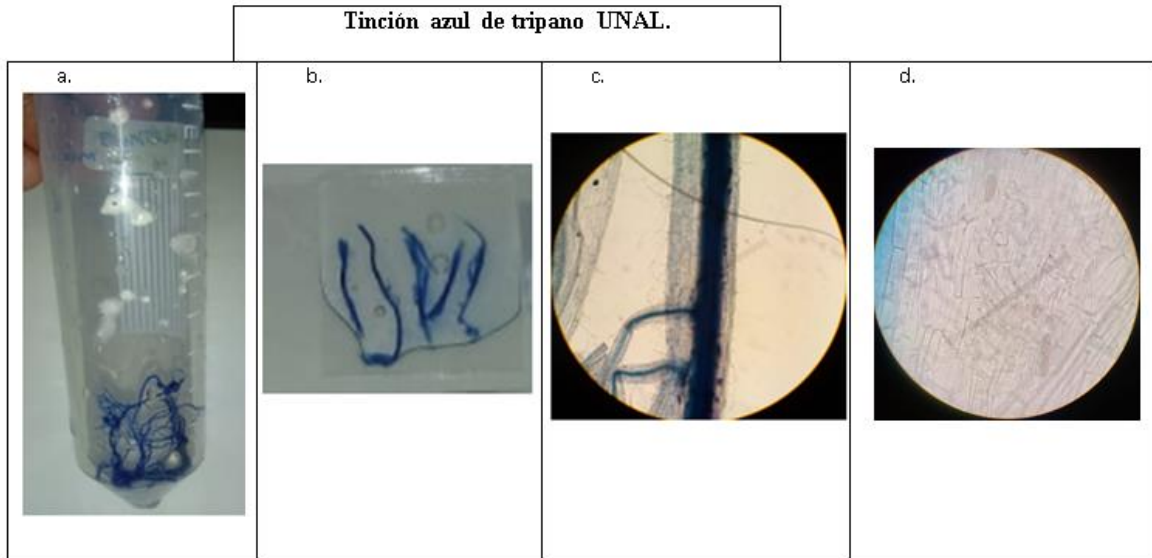
Metodología	Tinción azul de tripano.			
UNAL	Decoloración H2O2	10%	Si se requiere	-
	Alcalinización KOH	10%	Hasta que las raíces tornen transparentes.	Baño de maría 60-90°C
	Acidificación HCl	10%	2 minutos	Temperatura ambiente
	Coloración Azul de Tripano + Glicerol o lacto glicerol	0.05%	5-10 minutos	Baño de María.
	Porcentaje de colonización			

ICA	Decoloración H ₂ O ₂	10%	10 minutos	Temperatura ambiente	
	Alcalinización KOH	10%	10-30 minutos	Baño de María 80-90°C	
	Acidificación HCl	10%	8-15 minutos	Temperatura ambiente (Agitación constante)	
	Coloración Azul de Tripano + Agua	0.05%	10 minutos	Baño de María 80-90°C	
	Porcentaje de colonización				Raíces teñidas en fragmentos de 2cm

Fuente: “Método separación y conteo de esporas” (Sanchez, et al., 2010), p. 1-4. Recuperado de: file:///C:/Users/lina.rada/Downloads/SnchezdePrageretal.2010.pdf

Para corroborar que la implementación de Lacto glicerol o glicerol en la preparación del colorante como parte final del proceso de tinción, se realizó el ensayo con pasto *Urochloa pinacoides*, implementando las dos metodologías propuestas, donde se logró observar que al momento de terminar la coloración, las raíces teñidas con el método de la Universidad Nacional mostraron gran concentración del colorante a pesar de realizar los enjuagues estipulados, pero no influyó en la observación microscópica logrando identificar intraradicularmente la presencia o ausencia de estructuras micorrizicas; mientras que en la metodología ICA, se logró identificar que a pesar que las raíces no mostraran mayor concentración de colorante, en el proceso de observación se logró identificar características de micorrizas como se puede estimar en las ilustraciones 4-5.

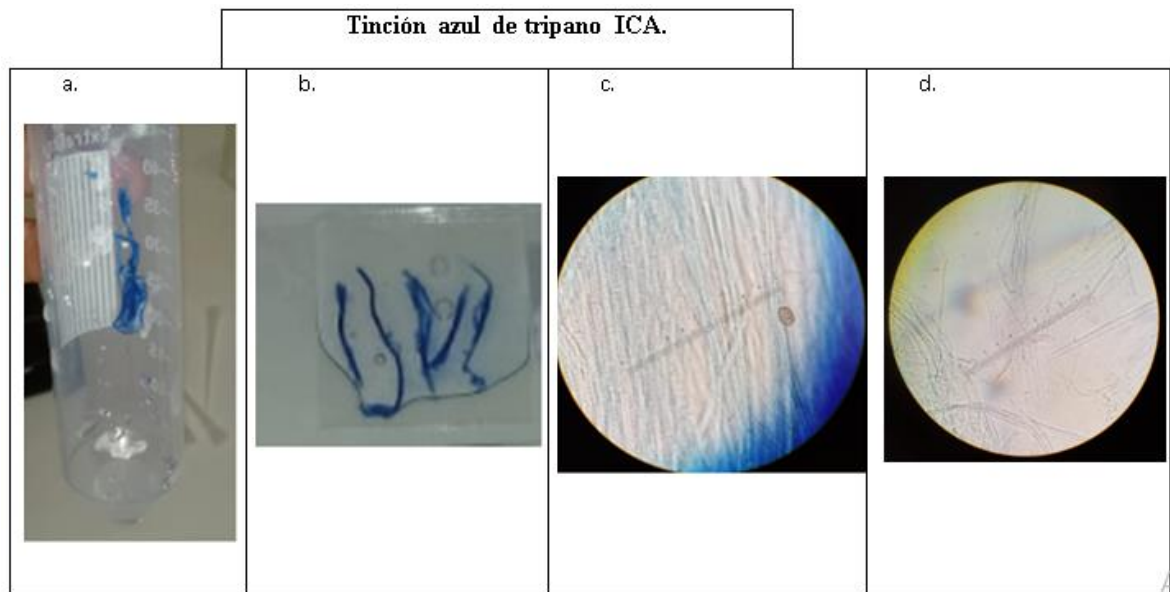
Ilustración 4, Tinción azul de tripano, UNAL.



A: Proceso final coloración radicular control positivo; **b:** Montaje sistema radicular 2cm; **c:** Observación microscópica 10x; **d:** Coloración control negativo.

Fuente: López I., (2019).

Ilustración 5, Tinción azul de tripano, Instituto Colombiano Agropecuario.



A: Proceso final coloración radicular control positivo; **b:** Montaje sistema radicular 2cm; **c:** Observación microscópica 10x; **d:** Coloración control negativo.

Fuente: López I., (2019).

✚ Separación y enumeración de esporas:

En la comparación realizada de los dos métodos se logró observar que no existe mayor diferencia en el procedimiento de separación y enumeración de esporas, siendo así que la cantidad de muestra y la aplicación de sacarosa influyen directamente en la cantidad exacta de sacarosa que se debe aplicar.

Tabla 6, Comparación métodos de separación de esporas.

UNAL	ICA
<ul style="list-style-type: none"> • Pesar de 20 gramos de suelo, el cual se debe colocar en una serie de tamices en tamaños de poro 450~500 μm – 120 μm y 40 μm. • Posteriormente con agua corriente se realiza un lavado con el fin de obtener en el último tamiz la mayor separación de partículas. • La muestra final se coloca en tubos de 50 ml, agregándole 40 ml de sacarosa al 70%, y centrifugando a 3350 rpm por 4 minutos. (Obtención de 3 capas). • Para extraer la capa intermedia de cada uno de los tubos se utiliza una jeringa, depositando la muestra recolectada sobre el tamiz de 40 μm. • Finalmente se realiza enjuague de la muestra y se deposita sobre una caja de Petri pequeña la cual debe tener una cuadrícula de 5mm x 5mm. • Observación en el estereoscopio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar 10 gramos de suelo, depositándolo sobre un Erlenmeyer, aforando con agua corriente hasta 1000 ml. • Se realiza la homogenización del suelo, en un agitador orbital por 30 minutos a 215 rpm. • Sobre el conjunto de tamices organizados de mayor a menor se deposita la muestra. • Realizar varios enjuagues hasta obtener la mayor distribución de partículas. • La porción de muestra que ha quedado en el tamiz de 38 μm, se lava con agua corriente y se traspasan a tubos de 50 ml para centrifuga. • Se adicionan 20 ml de sacarosa al 80%, se procede a centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos. • Se realiza la extracción de la capa intermedia y se deposita en el tamiz de 38 μm y se realiza un enjuague durante 5 minutos para remover el azúcar. • La muestra final se coloca sobre un papel filtro cuya división deberá estar en 8 partes iguales, colocándolo sobre un embudo

	para el proceso de filtración. <ul style="list-style-type: none"> • Observación en el estereoscopio
--	--

Fuente: (Sanchez, et.al., 2010), Recuperado de:
 file:///C:/Users/lina.rada/Downloads/SnchezdePrageretal.2010.pdf
 “Método separación y conteo de esporas”, ICA 2017, p.1-4.

 **Conteo e identificación de esporas:**

Tabla 6, Conteo y/o identificación de esporas.

UNAL	ICA
<p>Una vez trazada la cuadrícula en la caja de Petri se procede a coleccionar las esporas con la ayuda de una pipeta. La muestra se analiza por la siguiente ecuación:</p> <p><i>Nº de esporas</i></p> $= \frac{\text{Esporas contadas}}{\text{Peso de la muestra}} \times \frac{\pi}{\text{pf}} \times 100$	<p>Por cada una de las réplicas se realiza el conteo de esporas adheridas al papel filtro, realizando un promedio. El cálculo se realiza por la siguiente ecuación:</p> <p><i>Nº de esporas</i></p> $= \frac{\text{Esporas contadas}}{\text{Peso de la muestra}} \times \frac{\pi}{\text{pf}} \times 100$
<p>Identificación: se realizan montajes en portaobjetos agregando 2 gotas de PVGL, se deja reposar la muestra por 2, minutos y se sellan los bordes con esmalte transparente. Utilización de claves taxonómicas de géneros, familias y especies descrita por la universidad Nacional.</p>	<p>Identificación: Se realizan montajes de las esporas observadas, agregando sobre la lámina PVGL. Observar en objetivos 10X y 40X, identificando: Color de la espora, diámetro, presencia de hifas, contenido de la espora y ornamentación.</p>

Fuente: (Sanchez, et.al., 2010), Recuperado de:
 file:///C:/Users/lina.rada/Downloads/SnchezdePrageretal.2010.pdf
 “Método separación y conteo de esporas”, ICA 2017, p. 1-4.

b. Muestra de referencia:

✚ Separación y conteo de esporas:

De acuerdo con la metodología anteriormente descrita se logró obtener, que por cada una de las tres réplicas del suelo de referencia micorrizado, la presencia de esporas fue en las siguientes cantidades por cuadrantes:

Tabla 7, Conteo de esporas.


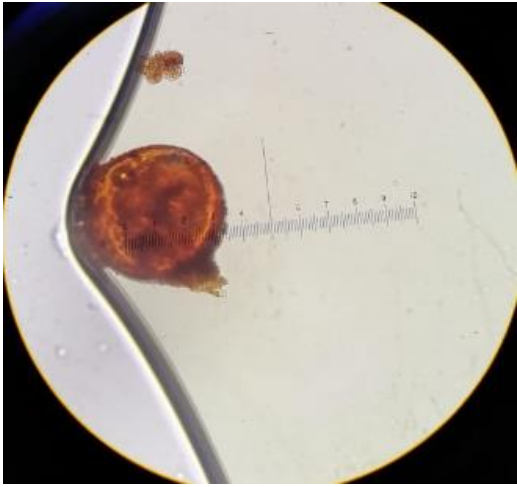
Cuadrante	Replica I	Replica II	Replica III	Replica IV
1	134	141	145	106
2	165	140	130	156
3	186	176	196	230
4	171	161	176	109
5	192	110	129	155
6	152	193	115	167
7	128	168	196	189
8	109	130	179	289
Promedio Cuadrantes	154,6	152,3	158,2	175,1
Promedio general				160,05

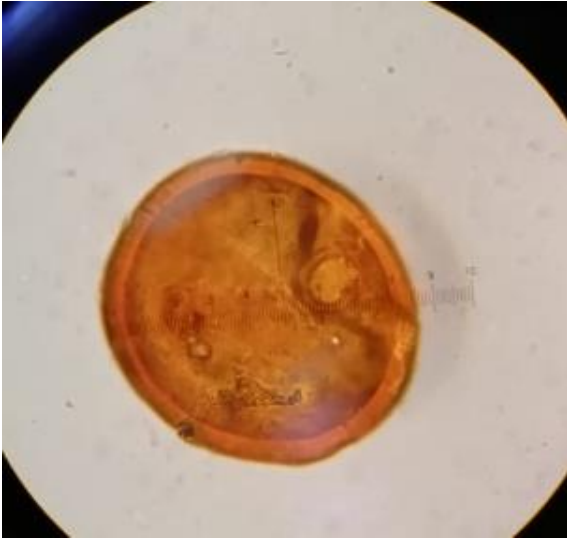

Fuente: Autor, 2019.



✚ Identificación géneros:

En la identificación de géneros de algunas de las esporas encontradas, se realizó la observación microscópica, en la solución de (PVGL), logrando identificarlas según su tamaño, color, forma y número de paredes de acuerdo a la clave taxonómica descrita en las metodologías básicas de la Universidad Nacional de Colombia, obteniendo:

Tabla 8, Identificación de géneros.

Imagen	Tamaño/ forma/ color
	Tamaño: 300 μm
	Genero: <i>Glomus</i> sp.
	Forma: Globosa
	Color: Amarillo pardo
	Tamaño: 430 μm
	Genero: <i>Glomus</i> sp.
	Forma: Subglobosa
	Color: Amarillo castaño, hasta café oscuro,
Numero de paredes: 2	

	Tamaño: 80 μm
	Genero: <i>Glomus</i> sp.
	Forma: Globosa
	Color: Amarillo naranja.
	Numero de paredes: 2
	Tamaño: 220 μm
	Genero: <i>Glomus</i> sp.
	Forma: Globosa
	Color: Pardo claro.
	Numero de paredes: 2

	Tamaño: 320 μm
	Genero: <i>Glomus</i> sp.
	Forma: Globosa
	Color: Pardo rojizo.
	Numero de paredes: 2
	Tamaño: 400 μm
	Genero: <i>Glomus</i> sp.
	Forma: subglobosa
	Color: Pardo claro.
	Numero de paredes: 2

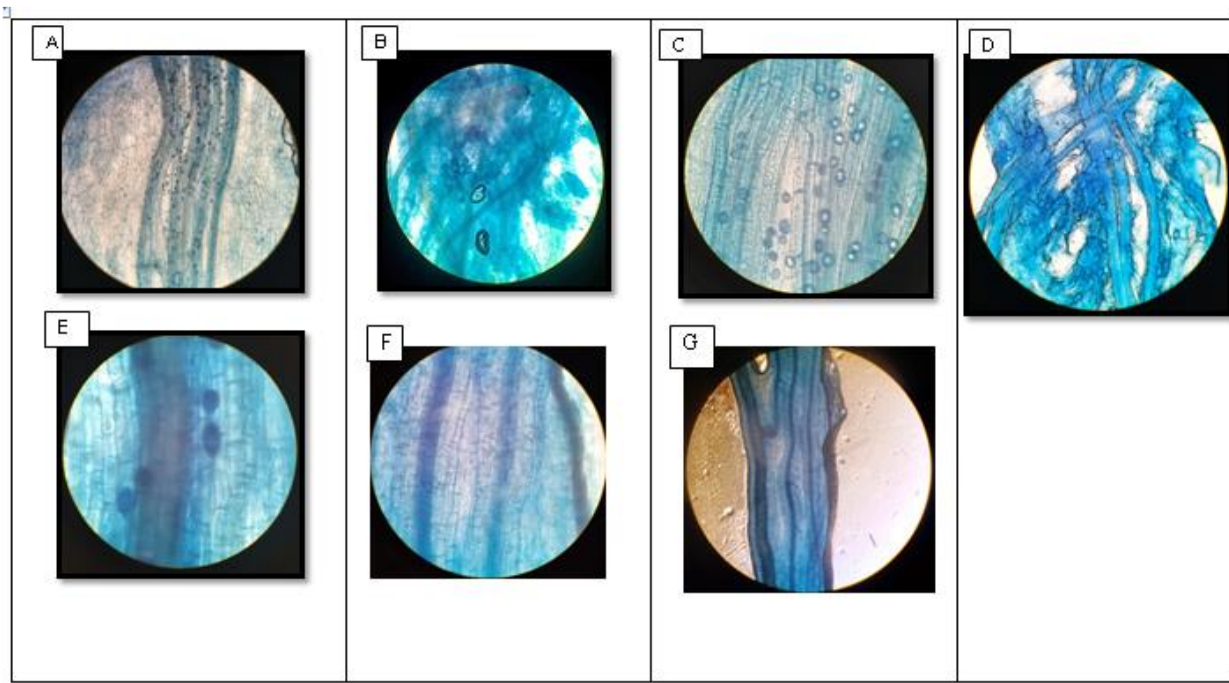
Fuente: Autor, 2019.

🚩 Montaje Numero Más Probable (NMP):

En cuanto a los resultados obtenidos en el ensayo realizado en el Laboratorio Nacional de Insumos Agrícolas, se observó que en las diluciones (4^0 a 4^4), se identificaron 26 propágulos infectivos (+) en las plantas de *Urochloa decumbens* en cada una de las réplicas establecidas como se evidencian en las ilustraciones 6.

En la dilución 4^5 , se evidenció el 20% de colonización, donde se encontraron estructuras típicas de micorrizas, en su mayoría esporas que se encontraban intracelularmente, las cuales se observaron mediante microscopia en el objetivo 10 x y 40x (Ver tabla 12) . En las siguientes diluciones (4^6 a 4^9), no se evidencio ninguna asociación simbiótica, siendo clasificadas como negativos (-).

Ilustración 6, Diluciones seriadas en base cuatro, controles positivos y negativos.



Fuente: Autor, 2019.

Tabla 9, Tabla 10, Resultado propágulos infectivos HMA

Nivel de dilución	Replica I	Replica II	Replica III	Replica IV	Replica V	Suma de materas infectadas.
4 ⁰	+	+	+	+	+	5
4 ¹	+	+	+	+	+	5
4 ²	+	+	+	+	+	5
4 ³	+	+	+	+	+	5
4 ⁴	+	+	+	+	+	5
4 ⁵	-	-	-	+	-	1
4 ⁶	-	-	-	-	-	0
4 ⁷	-	-	-	-	-	0
4 ⁸	-	-	-	-	-	0
4 ⁹	-	-	-	-	-	0
Total de macetas colonizadas.						<u>26</u>

Fuente: Autor, 2019.

✚ Cálculos:

$$X = (26/5) = 5.2$$

$$Y = (10 - 5.2) = 4.8$$

$$A = 4$$

$$\log \Omega = [5.2 * \log (4)] - 0.552$$

$$\log \Omega = 2.57871$$

$$\Omega = 10^{2.57871} = 379$$

En 50 gramos de muestra en campo hay **379** propágulos infectivos de micorrizas arbusculares, el suelo presento 5% de humedad por lo que se calculó que en 100 gramos de suelo hay **758** propágulos infectivos.

✚ **Límites con el 95% de confianza:**

$$\log s.i = \log \Omega \frac{+}{-} \left[\left(\frac{0.4483}{(5 \cdot \frac{1}{2})} \right) * 1.645 \right]$$

$$\log s.i = \log \Omega \frac{+}{-} - [(0.1793) * 1.645]$$

$$\log s.i = 2.5784 \frac{+}{-} = 0.1090$$

Incertidumbre:

$$\lim s = 2.6874$$

$$\lim s = 10^{2.6874}$$

$\lim s = 487$ *Propagulos infectivos en 50 gramos de suelo seco (95% de probabilidad).*

$\lim s = 974$ *Propagulos infectivos en 100 gramos de suelo seco (95% de probabilidad)*

$$\lim i = 2.4694$$

$$\lim i = 10^{2.4694}$$

$\lim i = 295$ *Propagulos infectivos en 50 gramos de suelo seco (95% de probabilidad).*

$\lim i = 590$ *Propagulos infectivos en 100 gramos de suelo seco (95% de probabilidad).*

VIII. DISCUSIÓN

a. Comparación de metodologías

Al implementar la dos metodologías basadas en la tinción con azul de tripano expuestas en la tabla 5, en raíces de la especie vegetal *Urochloa decumbens*, se logró deducir que la diferencia se basa principalmente en la aplicación de Glicerol o Lacto Glicerol en la preparación del colorante como parte final del proceso. Por lo anterior en el proceso de penetración del colorante intraradicular en la especie trabajada, no influyó en la observación de las estructuras típicas de micorrizas vesiculo- arbusculares HMA.

Lo anterior concuerda con los expuesto por (Valencia & Zuñiga, 2015), quienes describieron en materiales y métodos implementados en su estudio que en el proceso de tinción se aplica lacto glicerol junto con el azul de tripan hasta cubrir el sistema radicular, con el objetivo de preservar los segmentos radiculares y al mismo tiempo generar un proceso de decoloración.

Por otro lado en la metodología realizada por la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira descrita por (Sanchez, Posada, Velasques, & Narvaéz, 2010) quienes afirmaron que la preparación del colorante mas la adición de lacto glicerol o glicerol, se hace con el fin de producir un proceso de decoloración y preservación del sistema radicular, sin llegar a incidir en la observación microscópica.

Razón por la cual se puede concluir que en el método del ICA, la adición del agua junto con el colorante, no influye de manera negativa en la observación. Logrando deducir que las metodologías analizadas logran cumplir el objetivo de visualizar las células internas del sistema radicular, dejando visibles las estructuras típicas de las micorrizas con o sin la aplicación del glicerol en la preparación del colorante.

En los procedimientos descritos en la separación de esporas se identificó que la diferencia en las concentraciones de sacarosa dependen principalmente de la cantidad de muestra a analizar, siendo así que entre más concentrado sea el gradiente de densidades mayor es la separación de moléculas en la muestra. Por lo anterior Salgado, Castelan, Jimenez, Gomez, & Osorio (2014) describieron en la metodología de separación de esporas, que la concentración de sacarosa es llamada gradiente de densidades en centrifugación continua, la cual se basa principalmente en la separación de partículas, según las densidades trabajadas, por lo general los resultados obtenidos en estos procedimientos se basa en la separación o formación de bandas o capas de diferentes densidades, quedando en la parte inferior aquellas partículas cuya densidad es mayor y en la parte intermedia partículas con densidades menores.

Por otro lado en la enumeración y /o identificación de esporas, se logró obtener que las diferencias radican principalmente en las divisiones realizadas en el material donde se depositan las esporas en cajas de Petri, razón por la cual la metodología descrita por el ICA basada en el proceso de filtración de la muestra por medio de un papel filtro de (55 mm de diámetro), permite mayor dispersión de las esporas en cada uno de los cuadrantes diseñados, y la vez la visualización estereoscópica se facilita puesto que las esporas están completamente suspendidas y estables, con la ventaja de lograr separarlas a láminas para los procesos de identificación de géneros.

Una vez las esporas estén aisladas o separadas en los portaobjetos se procede a la identificación por color, tamaño, textura, número de paredes, presencia de hifas, entre otras, descrito en el método del ICA; mientras la UN se basa en la identificación mediante claves taxonómicas.

Según Jimenez & Núñez (2013), describieron que en los procesos de identificación de morfo tipos se basaba en la calibración del micrómetro, logrando identificar en las esporas aisladas el tamaño, presencia de peridio o poro, unión hifal, ancho de la hifa y la composición y tipo de paredes.

Por lo anterior se logró concluir que las dos metodologías comparadas, no presentan dificultades al momento de identificar los géneros de las esporas a observar, puesto que las claves taxonómicas expuestas en la UN, describen la forma, diámetro, hifa y número de paredes de cada uno de los géneros de esporas micorrizicas; mientras el ICA se basa únicamente en la identificación con las mismas descripciones (tamaño, hifa, etc), sin la utilidad de una clave taxonómica.

b. Análisis de la muestra de referencia

✚ Conteo de esporas:

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la tabla 2 se logró deducir que en 10 gramos de suelo seco analizado se encontraron 160,5 esporas, siendo así hay 16,05 esporas/gramo en la muestra de referencia analizada; siendo así, entre mayor densidad de esporas/ gramo de suelo seco, mayor es la capacidad de infección radicular en las plantas hospederas.

Lo anterior concuerda con expuesto por (Bolaños, Rivillas, & Suárez, 2000) quienes en su investigación lograron encontrar que los valores más bajos de esporas/ gramo se presentaron en una zona cuyo terreno presentaba concentraciones de aluminio y de textura arcillosa, lo cual pudo interferir de manera negativa impidiendo la producción de esporas. Por lo cual deducen que suelos con texturas livianas favorecen los procesos de esporulación, logrando llegar a la conclusión de que entre menos transformado se encuentre el suelo mayor será la concentración de las esporas.

✚ Identificación de géneros:

A partir de las características expuestas en la identificación de géneros tabla 10, se logró deducir que las esporas encontradas presentaron formas globosas o Subglobosa, con la presencia de 2 paredes cuyo color variaba entre amarillo pardo, amarillo castaño, hasta café oscuro y amarillo naranja, con un tamaño de aproximadamente (30-350) μm .

Por lo anterior se logró deducir que las esporas de la muestra de referencia analizada pertenecían al género *Glomus* sp., lo cual concuerda con lo expuesto por (Tapia, et al. 2008), donde demuestran que en la identificación morfológica de hongos formadores de micorrizas analizadas en su estudio, pertenecían a *Glomus* sp., describiendo que las características

representativas se basaban en esporas solitarias, globosas o Subglobosa, de color paja hasta café amarillento con un tamaño de 70- 160 μm .

(Lovera & Cuenca, 2007) Lograron deducir que encontraron 29 morfo tipos de esporas donde la especie más abundante fue *Glomus* sp., cuyas características radicaron en el color marrón, amarillo y rojo vino.

(Medina, Rodriguez, & Herrera, 2010), expusieron que realizaron la separación de las esporas obtenidas de acuerdo a tamaño y color, forma y tipo de paredes, se presentaron cuatro géneros entre los cuales esta *Glomus* sp., como genero dominante, cuya medición estuvo entre el rango de 40 a 360 μm .

🚩 Montaje NMP:

Los resultados obtenidos mediante la tabla descrita por Fisher & Yates, (1990), implementado en el presente estudio, demostró que en 50 gramos de suelo seco hay aproximadamente 379 propágulos infectivos de endomicorrizas, por lo que se deduce que en 100 gramos de suelo seco hay 758 Propagulos infectivos.

En los controles positivos de las diluciones (4^0 a 4^4), se observó mayor desarrollo radicular en cuanto longitud y densidad como se puede apreciar en la ilustración 8, lo cual influye de manera positiva en la capacidad de la planta en la absorción de agua y nutrientes, facilitando una buena evapotranspiración y a la vez un buen funcionamiento fisiológico de las plantas, impidiendo la movilización de metales por el sistema radicular.

La dilución 4^5 , presento esporas únicamente en la réplica IV, identificando que el porcentaje de infección no fue completamente disponible para las plantas ya que no se observó crecimiento del sistema radicular en comparación con las diluciones anteriores.

Ilustración 7, Diferencia en la densidad y longitud del sistema radicular de la *Urochloa decumbens*.



Fuente: Autor, 2019

Por lo anterior se deduce que entre más se diluya la muestra de referencia, menor establecimiento simbiótico, y por ende menor desarrollo radicular de la especie vegetal, influyendo de manera negativa en realizar exploraciones profundas en el suelo con el fin de obtener elementos tales como el Fosforo (P) disponible para el proceso de absorción.

Lo anterior concuerda con lo expuesto por (Garza & Valdés, 2000) quienes desarrollaron los estudios del número más probable en *Desmanthus virgatus* (L.) Willd, identificando propágulos infectivos positivos a partir de las diluciones 4^0 a 4^4 , pero únicamente en el 80% de las plantas establecidas en la dilución 4^5 se observaron estructuras micorrizicas intracelulares, por lo cual deducen que se produjo un proceso de sinergismo por parte de la bacteria *Rhizobium* spp., trabajada para el proceso de fijación de nitrógeno (N), logrando concluir que a menor dilución aumenta la presencia de poblaciones microbianas, aumentando el desarrollo radicular y en la biomasa aérea de las plantas, mientras en suelos con mayor dilución, las plantas no realizan ningún proceso simbiótico.

Por otro lado la asociación simbiótica trae consigo factores importantes para el desarrollo de las plantas, como lo es aumentar la absorción de nutrientes, mayor disponibilidad de agua, protección ante el ataque hongos patógenos y nemátodos, limitación en la absorción de metales pesados o tóxicos como el cadmio, generando sustancias defensivas por parte de la misma planta (Camargo, Montaña, Rosa & Montaña, 2012).

IX. CONCLUSIONES

Al comparar las dos metodologías para la identificación de endomicorrizas, en los procedimientos de tinción con azul de tripan, identificación y enumeración de esporas se logró deducir que las diferencias radicaron principalmente en la implementación de diferentes materiales los cuales no influyen de manera negativa en la observación de las estructuras internas del sistema radicular.

La cuantificación de los propágulos infectivos por medio del (NMP), de la muestra de referencia trabajada, mostró que entre mayor sea la concentración de esporas/ gramo de HMA en suelo seco, mayor capacidad de infección raicular y por ende mayor crecimiento en cuanto longitud y densidad de las raíces, por el establecimiento simbiótico que actúa de manera positiva en el intercambio de nutrientes y disponibilidad de fósforo a las plantas.

En la identificación de géneros se logró observar la presencia del género *Glomus* sp., el cual se caracteriza por la facilidad de adaptación a diferentes suelos, logrando establecer mayor capacidad simbiótica con las plantas hospedadas.

Al analizar la muestra de referencia en cada uno de los procedimientos descritos, se logró concluir que la implementación de micorrizas en suelos destinados para la agricultura, tienen un rol positivo en los procesos de absorción de nutrientes, crecimiento radicular y foliar.

X. RECOMENDACIONES

La implementación de HMA micorrizas vesículo- arbusculares , en los campos Colombianos cumplen un rol importante, puesto que realizan procesos que permiten mayor crecimiento radicular dejando disponible la absorción de nutrientes entre los cuales se destaca el Fósforo por ser uno de los elementos más escasos en el suelo, influyendo de manera positiva en la obtención de plantas vigorosas.

A nivel profesional:

-Generar mayor conocimiento sobre las micorrizas vesículo arbusculares (HMA) y su importancia en la agricultura, con el fin de ayudar al campo Colombiano con la implementación de estos organismos simbióticos, logrando esclarecer las soluciones en los procesos de crecimiento y desarrollo de los cultivos que estas brindan.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Aristizábal., O. (2013). *Evaluación de la comercialización y mercadeo de los Bioinsumos de uso agrícola registrados en Colombia*, p (35). Recuperado de: http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1539/1/Evaluacion_comercializacion_mercadeo_Bioinsumos_Colombia.pdf
- Asociación Española de Fabricantes de Agro Nutrientes. (2017). *Uso de microorganismos en la agricultura*. Recuperado el 08 de 03 de 2019, de <https://aefa-agronutrientes.org/uso-de-microorganismos-en-la-agricultura>
- Bagyaraj , J., & Stürmer, S. (S.f). Hongos micorrizógenos Arbusculares (HMA). *Manual de biología de suelos tropicales*, (7), 217-232.
- Barea, M. & Azcon, C. (2018). *Significado y aplicacion de las micorrizas en la agricultura*. Descriptivo, Estación Experimental del Zaidín, CSIC.
- Barrer, S. (2009). El uso de hongos micorrizicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Scielo. org*, 7(1), 124-129.
- Barriga, J., Visbal, M., & Acero, J. (11 de 01 de 2011). Relación entre los caracteres de las micorrizas arbusculares nativas con las propiedades físicoquímicas del suelo y bromatología del pasto estrella en ganadería de carne. *UDO*, 11(1), 134-141.
- Blancol, F., & Salas , E. (1997). Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigacion realizada en Costa Rica. *Agronomfa Costarricense*, 21(1), 56-57.
- Bolaños, M., Rivillas, O., & Suárez, S. (05 de 2000). Identificacion de micorrizas arbusculares en suelos de la zona cafetera Colombiana. *Cenicafe*, 51(4), 245-262.
- Camargo , S., Montaña , N., Rosa , C., & Montaña, S. (01 de 07 de 2012). Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria*, 13(7), 5-10.
- Cavalier, T. (02 de 2004). Only six kingdoms of life. *The royal society*, 1251-1254.
- Diaz , G., Torres, P., Sanchez, F., Garcia, G., & Carrillo, C. (11 de 2016). Primeras tesis doctorales sobre micorrizas. *Eubacteria*(36), 39-42.
- Garza, F., & Valdés , M. (2000). Tamaño de la población microbiana del suelo y desarrollo inicial de *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. *Redalyc.org*, 34(4), 445-451.
- Garzon, L. (09 de 11 de 2015). Importancia de las micorrizas arbusculares (MA) Para un uso sostenible del suelo en la AMazonia Colombiana. *Luna azul*(42), 219-229.
- Gomez, L., Portugal, V., Arriaga, M., & Contreras , A. (2007). Micorrizas arbusculares. *Redalyc.org*, 14(3), 300-303.

- Gonzales, H., & Fuentes, N. (04 de 06 de 2017). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de ciencias agrícolas*, 34(1):17-31, 18-30.
- Instituto Colombiano Agropecuario ICA (Julio 2018). Método analítico cuantificación de propagulos infectivos p. 4-9
- Instituto Colombiano Agropecuario ICA (Febrero 2011), *Resolución 000698, registro y control de bioinsumos agrícolas*, Obtenido de: <https://www.ica.gov.co/getattachment/225bd110-d1c4-47d7-9cf3-43745201e39a/2011R698.aspx>
- Jimenez, R., & Núñez, A. (2013). *Diversidad de generos de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a pasto colosuana (Bothriochloa pertusa (L) A. Camus) en suelos compactados y no compactados del municipio de San Marcos-Departamento de Sucre*. Obtenido de <https://repositorio.unisucre.edu.co/bitstream/001/570/1/T589.2%20J61.pdf>
- Leon, D. (2006). *Evaluacion y caracterizacion de micorrizas arbusculares asociadas a yuca en dos regiones de la amazonia Colombiana*. Obtenido de <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis296.pdf>
- Lovera, M., & Cuenca, G. (02 de 2007). Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares (hma) y potencial micorrízico del suelo de una sabana natural y una sabana perturbada de la gran sabana, venezuela. *Scielo*, 32(2).
- Martinez, A. (2012). *Impacto social y ambiental de la explotación de los recursos naturales en Colombia*. Recuperado el 2019, de https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/9912/MartinezLopezAnaMari_a2012.pdf;jsessionid=F9184EF7696413F2253B216F77B25DC6?sequence=2
- Martinez, L., & Pugnaire, F. (15 de 04 de 2009). Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiaridos. *Revista científica y tecnica de ecologi y medio ambiente*, 45-50.
- Medina, L., Rodriguez, Y., & Herrera, R. (07 de 2010). Aislamiento e identificación de hongos micorrízicos arbusculares nativos de la zona de las Caobas, Holguín. *Scielo*, 31(3).
- Miller, M., & Fitzsimons, M. (09 de 08 de 2008). Scale-dependent niche axes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Researchgate*, 118-122.
- Montañez, I., Vargas, C., Cabezas, M., & Cuervo, J. (2010). Colonización micorrizica en plantas de aguacate (*Persea americana* L.). *U.D.C.A*, 13(2), 51-60.
- Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., & Sanchez, J. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Revista de ciencia y cultura*, 15-22.

- Noda , Y. (2009). Las Micorrizas: Una alternativa de fertilización ecológica en los pastos. *Scielo.org*, 32(2), 1-8.
- Olivera, Y., Machado, R., & Del pozo, P. (2006). Características botánicas y agronómicas de especies forrajeras importantes del genero *Brachiaria*. *Pastos y forrajes*, 29(1), 1-2.
- Paillacho , F. (2010). “Evaluación de la efectividad de las micorrizas arbusculares nativas sobre el desarrollo y estado nutritivo del palmito (*Bactris gasipaes HBK*) en etapa de vivero, en Santo Domingo de los Tsáchilas. Santo Domingo de los Tsáchilas – ECUADOR : *ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO* ,p(5).
- Pedigo, L. (S.f). *Umbrales economicos y niveles de daños economicos*. Cientifico, Universidad del estado LOWA.
- Pentón, G., Oropesa, K., & Peñalver , P. (2013). Multiplicación de propágulos infectivos HMA en una plantación de morera (*Morus alba L.*). *Scielo.org*, 36(1), 22-27.
- Perez, A., Montes, D., & Rojas, J. (16 de 06 de 2011). HONGOS formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biologica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el Caribe Colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 367-376.
- Perfetti, J., Balcazár, A., Hernández, A., & Leibovich, J. (2013). Políticas para el desarrollo de la agricultura en Colombia, p (33-45). Obtenido de https://www.repository.fedesarrollo.org.co/bitstream/handle/11445/61/LIB_2013_Pol%C3%ADticas%20para%20el%20desarrollo%20de%20la%20agricultura_Completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Puente, M., Garcia, J., Rubio , E., & Peticari, A. (2010). Microorganismos promotores del crecimiento vegetal empleados como inoculantes en trigo. 39.
- Ramos, J., Marrufo, D., Guadarrama, P., & Carrillo, L. (S.f). *Hongos micorrizicos arbusculares*. Recuperado el 11 de 03 de 2019, de Biodiversidad: Recuperado de: <https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap4/07%20Hongos%20micorrozicos.pdf>
- Rivera, R., Fernandez, K., & Rodriguez, Y. (09 de 2010). Caracterización del comportamiento micorrízico en *Brachiaria decumbens* inoculada con *Glomus hoi-like*. *Researchgate*, 31(3), 21-26.
- Roman, M., & De Miguel , A. (2000). Identificación y descripción de las ectomicorrizas de *Quercus ileX subsp ballota* (desf) samp en una zona quemada y una zona sin alterar del Carrascar del Nazar (Navarra). *publicaciones de biologia*, 13(1), 4-8.
- Sainz, M. (2005). *Miorrizas Arbusculares*. Recuperado de <http://www.efa-dip.org/comun/publicaciones/FTecnicas/Download/49ok%20micorrizasarbusculares.pdf>

- Salgado, S., Castelan, M., Jimenez, R., Gomez, J., & Osorio, M. (2014). Diversidad de hongos micorrícicos arbusculares en suelos cultivados con caña de azúcar en la región de la Chontalpa, Tabasco. *Scielo*, 40.
- Sanchez, M., Posada, R., Velasques, D., & Narvaéz, M. (2010). Metodología básicas para el trabajo con micorriza arbuscular y hongos formadores de micorriza arbuscular. *Researchgate*, 41-102.
- Soler, J. (30 de 06 de 2006). Validacion secundaria del metodo de numero mas probable y recuento en placa profunda para coliformes totales y fecales en muestra de alimentos basada en la norma ISO 17025. Recuperado de <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis273.pdf>
- Suarez, F., & Moreno, J. (11 de 2010). Los microorganismos al servicio de la agricultura agentes microbianos de control biologico. *CEA01*, 75-77.
- Tapia , J., Ferrera, R., Varela, L., Rodriguez, J., Cuellar, H., Angel , M., y otros. (06 de 2008). Caracterización e identificación morfológica de hongos formadores de micorriza arbuscular, en cinco suelos salinos del estado de San Luis Potosí, México. *Scielo*, 26.
- Valencia, C., & Zuñiga, D. (16 de 05 de 2015). Análisis de la presencia natural de micorrizas en cultivos de algodón (*Gossypium barbadense*) inoculados con *Bacillus megaterium* y/o *Bradyrhizobium yuanmingense*. *Ecologia aplicada*, 14(1), 65- 69.

XII. ANEXOS

Ilustración 8, Formación de las tres capas con la aplicación de sacarosa al 80%.



Ilustración 9, Extracción capa central (suspensión de esporas).



 Tabla 10, Tabla Fisher and Yates.

X	Valor de K	Y	Valor de K
0,4	0,707	3,5	0,550
0,6	0,618	3,0	0,548
0,8	0,577	2,5	0,545
1,0	0,559	2,0	0,537
1,5	0,555	1,5	0,522
2,0	0,553	1,0	0,488
2,5	0,552	0,8	0,464
		0,6	0,431
		0,4	0,375

Instituto Colombiano Agropecuario ICA (Julio 2018).
Método analítico cuantificación de propagulos infecciosos p.
4-9