



UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

Evaluación del efecto de la co-inoculación de *Rhizophagus irregularis* y *Paenibacillus* sp. En el crecimiento de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.)

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Del Pozo Meza, David Emmanuel

DIRECTOR: Loján Armijos, Paul Diego, Ing.

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ing.

Paul Diego Loján Armijos

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: "Evaluación del efecto de la co-inoculación de *Rhizophagus irregularis* y *Paenibacillus sp.*" En el crecimiento de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum L.*) realizado por Del Pozo Meza David Emmanuel ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, junio de 2015

f. 

Cédula: 1103885396

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Del Pozo Meza David Emmanuel declaro ser el autor del presente trabajo de titulación: Evaluación del efecto de la co-inoculación de *Rhizophagus irregularis* y *Paenibacillus sp.* En el crecimiento de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum L.*) de la titulación de Biología siendo Ing. Paúl Diego Loján Armijos Director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f.

Autor: Del Pozo Meza David Emmanuel

Cédula: 13118341760

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación lo dedico a todas las personas que confiaron en mí, de manera especial a mi familia por brindarme su apoyo y ayuda en todo momento al igual que a los profesores de los que pude aprender de ellos día a día en estos 5 años de vida universitaria; a mis amigos de curso con los que compartimos muchos momentos agradables y así mismo a mis amigos en general.

AGRADECIMIENTOS

No podría enumerar a todas las personas que directa o indirectamente estuvieron al tanto de mí y de este proyecto, de manera general agradezco a mis compañeros de curso de quienes aprendí mucho a lo largo de todo este proceso.

Al Ingeniero Paul Lojan, por toda su ayuda y confianza en este proyecto, sin su motivación y estima hubiese sido mucho más complejo llegar al objetivo.

A todos los docentes de la UTP de los que tuve el honor de ser su alumno y que a lo largo de estos 5 años impartieron sus conocimientos haciéndome crecer ideológica e intelectualmente

A mis padres y a mi hermano por apoyarme en todas las decisiones tomadas a lo largo de mi vida universitaria y por estar siempre conmigo en los momentos difíciles.

A Dios porque sin el nada de lo antes mencionado hubiese sido posible.

David

INDICE DE CONTENIDOS

CARATULA	
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE DE CONTENIDOS	v
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO 1.....	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1. Micorriza	6
1.1.1. Definición	6
1.1.2. Asociaciones micorrízicas	6
1.1.3. Evidencia fósil	7
1.1.4. Clasificación de las micorrizas.....	7
1.1.5. Ectomicorriza.....	7
1.1.6. Ectendomicorriza.....	8
1.1.7. Endomicorrizas.....	8
1.2. Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)	9
1.2.1. Descripción de los HMA	9
1.2.2. Estructura de la micorriza Arbuscular	10
1.2.3. Clasificación de los HMA	11
1.2.4. Cultivo in vitro de hongos micorrízicos arbusculares	12
1.3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	14
1.3.1. Rizobacterias.....	15
1.3.2. Ventajas de las bacterias promotoras del crecimiento	15
1.3.3. Mecanismos promoción del crecimiento vegetal.....	15
1.3.4. Interacción entre HMA y Bacterias promotoras de crecimiento.....	16
1.3.5. Métodos de inmovilización de microorganismos.....	16

1.4.	Origen e importancia del cultivo de la papa.....	19
1.5.	Objetivos y / o preguntas de investigación	21
1.5.1.	Objetivo general y pregunta de investigación:	21
1.5.2.	Objetivo específico:	21
CAPITULO II.....		22
MATERIALES Y MÉTODOLOGIA		22
2.1.	Sitio del experimento.....	23
2.2.	Material vegetal.....	23
2.3.	Rhizophagus irregularis y Paenibacillus sp.	23
2.4.	Encapsulación de microorganismos	24
2.5.	Establecimiento del ensayo.....	24
2.6.	Diseño del experimento.....	25
2.7.	Porcentaje de colonización micorrízica: Frecuencia e intensidad	26
CAPÍTULO III.....		27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		27
3.1.	Resultados	28
3.1.1.	Porcentaje de colonización radicular	32
3.2.	Discusión:	35
CONCLUSIONES		39
RECOMENDACIONES		40
BIBLIOGRAFÍA:.....		41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Análisis del suelo	24
Tabla 2.	Interpretación del análisis	24
Tabla 3.	Altura de las plantas tomadas en el día 30, 60 y 90 DDS (días después de la siembra).....	28
Tabla 4.	Peso seco de las hojas, raíz y tubérculos a los 90 DDS	28
Tabla 5.	Altura de las plantas (bintjie) tomadas en el día 30, 60 y 90 DDS	29
Tabla 6.	Peso seco de las hojas, raíz y tubérculos	30
Tabla 7.	Evaluación de los porcentajes de frecuencia en intensidad de la colonización micorrízica	32
Tabla 8.	Evaluación de los efectos de colonización micorrízica	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de los 4 tratamientos en la altura de las dos variedades de papas a los 90 DDT	30
Figura 2. Comparación entre tratamientos de las variables del peso seco del área foliar, radicular y tubérculo de la variedad Única.....	31
Figura 3. Comparación entre tratamientos de las variables del peso seco del área foliar, radicular y tubérculo de la variedad Bintjie	31
Figura 4. Porcentaje de la frecuencia de cada planta por tratamiento cada tratamiento de la variedad única	33
Figura 5. Porcentaje de la Intensidad de cada planta por tratamiento cada tratamiento de la variedad única.....	33
Figura 6. Porcentaje de la frecuencia de cada planta por tratamiento cada tratamiento de la variedad única.....	34
Figura 7. Porcentaje de la Intensidad de cada planta por tratamiento cada tratamiento de la variedad única.....	35

RESUMEN

En este estudio se evalúa el efecto de la co-inoculación del hongo micorrízico arbuscular: *Rhizophagus irregularis* (DAOM197198) y la bacteria *Paenibacillus* sp. (R47065) en el crecimiento de dos variedades de papa. La selección de estos microorganismos se realizó en base a experimentos previos in-vitro; se determinó un efecto sinérgico entre el hongo y la bacteria. Los microorganismos fueron encapsulados en una matriz de alginato a una concentración de 25 esporas de *R. irregularis* y 3×10^5 CFU. (Unidades formadoras de colonias) por capsula de alginato.

Distintos tratamientos fueron probados: (1) solamente *Paenibacillus* sp., (2) solo *R. irregularis*, (3) la combinación de ambos, (4) control no inoculado. Cada tratamiento fue replicado 10 veces dando un total de 40 plantas para cada variedad de papa. Las variables a medir fueron: altura de las plantas a los 30, 60 y 90 días después de la siembra, biomasa seca, y porcentajes de colonización micorrízica. Los resultados obtenidos se encontraron diferencias entre los tratamientos utilizados.

PALABRAS CLAVES: *Rhizophagus irregularis*, micorriza, *Paenibacillus*, rhizosfera

ABSTRACT

In this project the effect of co-inoculation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* (MUCL41833) and the bacterial strain *Paenibacillus* sp (R47065) was tested in 2 in-vitro produced potato cultivars. For this purpose we conducted a pot test consisting of a randomized complete block design with 4 treatments consisting in the single inoculations of *R. irregularis*, *Paenibacillus* sp and their combination and a non-inoculated control. Each treatment had 10 replicates for a total of 40 plants of each variety. The variables measured were: plant height at 30, 60 and 90 days after planting. In addition, dry biomass, and percentage of mycorrhizal colonization was assessed in treatments. The results obtained were favorable in most of these variables, differences between treatments in which microorganisms were used compared to the control.

KEYWORDS: *Rhizophagus irregularis*, mycorrhiza, *Paenibacillus*, rhizosphaera

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de fin de titulación denominado; evaluación del efecto de la co-inoculación de *Rhizophagus irregularis* y *Paenibacillus* sp. en el crecimiento de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) se lo desarrolló con el objeto de determinar los posibles impactos de la co-inoculación de ambos microorganismos en el desarrollo de la micorriza y en el crecimiento de dos variedades de papa.

Este documento de tesis se encuentra dividido en cuatro capítulos, en el primer capítulo encontramos el marco teórico en donde se introduce al lector en temas como la definición, importancia, reseña histórica, caracterización; de las micorrizas, hongos micorrízicos arbusculares, además de la importancia las bacterias promotoras del crecimiento en el crecimiento y desarrollo vegetal; en el segundo capítulo se explica la metodología realizada y en el tercer capítulo presentamos los resultados obtenidos una vez finalizado el experimento al cabo de tres meses, así como una breve discusión.

La creciente demanda de productos agrícolas para satisfacer las necesidades alimenticias de la también creciente población provocó el desarrollo de técnicas de producción caracterizadas por el uso indiscriminado de fertilizantes y pesticidas conocida como revolución verde (Tilman, Cassman, Matson, Naylor, & Polasky, 2002). Como una forma de conseguir una producción abundante y rápida con el consiguiente deterioro ambiental.

La papa considerada entre uno de los cultivos que tienen mayor demanda requiere de una alta adición de insumos para mantener un nivel adecuado de producción, lo que provoca severos cambios en el agro ecosistema y genera una inversión muy alta por parte de los agricultores. (Davies, 2005, pág. 281).

La tendencia actual de la agricultura moderna apunta al uso de técnicas menos dañinas y de bajo impacto ambiental para lograr sustentabilidad a largo plazo de la agricultura al mantener niveles adecuados de fertilidad del suelo. En este contexto, el uso de microorganismos benéficos del suelo en la se presenta como una alternativa importante para disminuir el uso desmesurado de agroquímicos, especialmente en el cultivo de la papa donde la aplicación de fertilizantes y pesticidas ha sido tradicionalmente muy alta.

Los microorganismos del suelo cumplen una función fundamental en la fertilidad de los suelos al estar involucrados en el ciclaje de nutrientes, producción de metabolitos, solubilización de nutrientes, etc. Entre los microorganismos benéficos con un mayor potencial de explotación para su uso en la producción agrícola se encuentran los hongos micorrízicos arbusculares y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Adicionalmente se conoce que algunas de estas bacterias podrían tener un efecto sinérgico con los hongos micorrízicos arbusculares, mejorando los niveles de colonización micorrízicos y optimizando de esta forma la toma de nutrientes minerales del suelo (Romero et al., 2003) por parte de la planta.

Al final del proyecto el objetivo planteado fue cumplido ya que se logró determinar el efecto de la co-inoculación de *R. irregularis* y *Paenibacillus sp.* en el crecimiento de las dos variedades de papa.

CAPITULO 1
MARCO TEÓRICO

1.1. Micorriza

1.1.1. Definición.

“Las micorrizas se definen como asociaciones simbióticas mutualistas entre raíces de plantas y determinados hongos del suelo” (Azcon-Aguilar & Barea, 1980, pág. 9).

Esta relación hongo-planta ha sido objeto de intensos estudios en el presente siglo, concentrándose especialmente en las últimas dos décadas, con lo que se ha podido determinar que las micorrizas son una parte integral de la planta con un importante papel en el crecimiento y desarrollo del vegetal (Linderman R. , 1988; Honrubia, Torres, Díaz, & Cano, 1992). La mayoría de las plantas que viven en la superficie terrestre presentan esta simbiosis.

“El término micorriza proviene del griego: myco (hongo), y rhyza, (raíz), el término micorriza” fue acuñado por (Frank, 1885), quien estaba bastante seguro de que estas asociaciones simbióticas planta-hongo eran requeridas para la nutrición de ambos socios. “Las micorrizas han sido definidas como las asociaciones entre las hifas de hongos y los órganos de plantas superiores en cuestión con la absorción de sustancias desde el suelo” (Harley & Smith, 1983). “En la actualidad se estima que el 90% de las plantas que crecen sobre la tierra están micorrizadas” (Smith & Read, 2008).

1.1.2. Asociaciones micorrízicas.

Las micorrizas, son un fenómeno simbiótico general que se produce al asociarse uno o varios hongos con las raíces de las plantas en la cual hay un intercambio de nutrientes y minerales. Son asociaciones que comprenden diversas categorías morfológicas, funcionales y evolutivas. (Smith & Read, 2008).

“Algunos tipos de micorrizas son similares y comparten linajes de plantas, mientras otros tienen características anatómicas muy distintas e historias evolutivas separadas” (Brundrett, 2002). “Los hongos que participan como socios en esta relación hongo-planta, son del filum: Basidiomycota, Ascomycota y Glomeromycota” (Brundrett 1991; Harley & Smith 1983).

“El término mutualismo implica beneficios mutuos en las asociaciones entre dos o más organismos vivos diferentes” (Boucher, 1985; Lewis, 1985). “Las asociaciones mutualistas incluyen un amplia gama de asociaciones directas e indirectas, o simbióticas y no simbióticas, muchas de las cuales funcionan mediante transferencia de nutrientes” (Boucher et al., 1982; Paracer & Ahmadjian, 2000). “Todas las asociaciones micorrízicas son simbióticas, pero no todas son mutualistas” (Brundrett, 2004).

“Actualmente se considera que difieren de otras asociaciones planta - hongo principalmente porque son asociaciones íntimas con una interfaz especializada donde el intercambio de material se produce entre células vivas” (Nehls, Mikolajewski, Magel, & Hampp, 2001).

1.1.3. Evidencia fósil.

“La evidencia fósil indica que la asociación de micorrizas se remonta a 400 millones de años” (Remy et al. 1994). “Esta larga co-evolución de plantas y hongos que se produjo en presencia de comunidades bacterianas, lo que la presencia de estas últimas podrían tener efectos positivos en la formación de la micorriza” (Pivato et al, 2009). “De hecho, hay varias evidencias que muestran que ciertas bacterias de vida libre pueden mejorar la asociación de micorrizas y por lo tanto estas bacterias se conocen como bacterias promotoras de la micorrización (MHB)” (Garbaye, 1994).

1.1.4. Clasificación de las micorrizas.

Se pueden distinguir tres grupos fundamentales según la estructura de la micorriza formada: Ectomicorrizas o formadoras de manto; Ectendomicorrizas, que incluye Arbutoides y Monotropoides; y las Endomicorrizas, caracterizadas por la colonización intracelular del hongo, y que a su vez se subdividen en Ericoides, Orquioides y Arbusculares (Read, 1999).

1.1.5. Ectomicorriza.

Se caracteriza por tener un manto compuesto de hifas que envuelve la parte apical de la raíz, haciendo ver a la raíz ensanchada con diferente ramificación, textura y/o color. El manto puede variar extensamente en grosor, color y textura dependiendo de la combinación particular del hongo-planta (Halling, 2001).

“Del manto a veces se desprenden algunas hifas emergentes que pueden llegar a formar una red, esto es micelio externo que incluye hifas absorbentes, cordones miceliales y rizomorfos” (Brundrett, Bougher, Dell, Grove, & Malajczuk, 1996), estos últimos presentan una parte interna parecida a tubos que se especializan en transportar nutrientes y agua desde largas distancias.

“El manto incrementa el área de la superficie absorbente de la raíz y con frecuencia afecta la morfología de las raicillas” (Halling, 2001).

1.1.6. Ectendomicorriza.

Las ectendomicorrizas comparten características con las endo y ectomicorrizas, pero también penetran las células corticales de la planta como en las endomicorrizas sólo que no existen vesículas ni arbusculos. En algunos casos no se forma el manto, pero siempre la red de Hartig (Peterson & Farquhar, 1994).

1.1.7. Endomicorrizas.

“Es una asociación simbiótica interna en la cual las hifas de los hongos invaden las partes jóvenes de las raíces y colonizan los espacios intercelulares e intracelulares del parénquima sub epidérmico de la célula” (Sieverding & al., 1998). “Se caracterizan porque el hongo penetra inter e intracelularmente, ausencia de manto y acentuadas modificaciones anatómicas en las raíces no visibles a simple vista” (Coyne, 2000). Éste Grupo se subdivide en:

1.1.7.1. Ericoide.

Se establece principalmente en plantas de brezales, con altos niveles de carbono y nitrógeno y bajo pH. Los hongos tienen capacidades saprofitas, por lo que son capaces de asimilar formas complejas de nitrógeno y fósforo, así como secuestrar iones metales tóxicos de los vástagos de las plantas que pueden interferir en la fotosíntesis.

Distribución: zonas polares y alpinas.

Plantas hospedadoras: ericales.

Hongos endófitos: ascomicetos y basidiomicetos (Alvarez & Ramos, 2004).

1.1.7.2. Orquideoide.

Las orquídeas en sus primeros estadios, no contienen clorofila. En estas etapas los hongos con los que se asocian, al ser saprobios o parásitos de otras plantas, son capaces de transferir a la orquídea compuestos orgánicos de carbono y otros nutrimentos.

Distribución: zonas templadas y tropicales.

Plantas hospederas: orquídeas.

Hongos endófitos: basidiomicetos (Alvarez & Ramos, 2004).

1.1.7.3. Arbusculares.

“Se caracterizan por la penetración de las hifas del hongo en las células de la epidermis y córtex de la raíz y por la ausencia de manto sobre la superficie de la misma” (Brundrett, Bougher, Dell, Grove, & Malajczuk, 1996) .

1.2. HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA).

1.2.1. Descripción de los HMA.

“La interacción entre raíces de plantas y hongos Glomeromycetes” (SchÜßler et al. 2001) “es probablemente la asociación simbiótica más importante en la naturaleza” (Brachman & Parniske, 2006). Más del 80% de las plantas superiores de la tierra son capaces de beneficiarse de la “habilidad” del hongo de extraer nutrientes del suelo, principalmente fósforo.

“A cambio, se ha estimado que cerca del 20% del carbono fijado fotosintéticamente a nivel mundial podría depositarse en el hongo simbiote. Ello convierte a esta asociación en la más distribuida sobre el planeta” (Gianinazzi-Pearson, 1996; Bundrett, 2002; Harrison, 2005). “La asociación micorrízica ha existido desde hace 350 millones de años” (Simon et al., 1993; Taylor et al. 1995).

1.2.2. Estructura de la micorriza Arbuscular.

“Las estructuras del mico-simbionte que se extienden dentro de la raíz de la planta hospedera y en el sustrato circundante, son características de cada tipo de micorriza y sirven para su diferenciación” (Allen, 2007).

1.2.2.1. Hifas.

“Tienen contacto con la célula epidérmica o con un pelo radical y se forma un apresorio, a partir del cual se desarrollan ramificaciones infectivas. Posteriormente se produce la penetración de la epidermis” (Harley & Smith, 1983), “por actividad mecánica y enzimática, este proceso de penetración puede tardarse desde unas pocas horas y hasta tres días después de iniciado el contacto con la raíz” (Declerck, Strullu, & Fortin, 2005).

1.2.2.2. Esporas.

“Son estructuras de reproducción de los hongos y plantas criptógamas (sin flores), poseen resistencia para sobrevivir en el suelo durante muchos años y cuya germinación inicia un nuevo ciclo de simbiosis” (Duran, 2003).

1.2.2.3. Apresorios.

“Apéndices especializados del micelio externo de una hifa o tubo germinativo, imitando una bomba, ejerce presión sobre el tejido que se va a colonizar y facilita la penetración del hongo” (García-Garrido & Ocampo, 2002).

1.2.2.4. Vesículas.

Son las estructuras de almacenamiento de los hongos, cuya formación de sustancias como lípidos es posterior a la de los arbusculos y tiene lugar a partir del hinchamiento de una hifa generalmente terminal. Esta estructura principalmente en las especies del género *Glomus* puede llegar a engrosar sus paredes y convertirse en esporas (Escobar et al., 1998).

1.2.2.5. Arbúsculos.

Estos forman la ramificación dicotómica repetida de hifas intracelulares, hasta la formación de hifas de menos de 0.2 micrómetros de diámetro.

Cuando se forma un arbúsculo el almidón de la célula invadida desaparece al tiempo que el núcleo se alarga y se divide. Los arbúsculos son digeridos rápidamente y reabsorbidos por el huésped. Después que los arbúsculos son digeridos, los núcleos vuelven a su tamaño normal y el almidón suele reaparecer (Morton, 1996 y Sylvia, 1999).

1.2.2.6. Células auxiliares.

Son estructuras abultadas de paredes delgadas, que se agrupan en las hifas extra radicales.

“Puede presentar una superficie espinosa o lisa y son característicos de *Scutellospora* y *Gigaspora*, son abundantes durante la colonización temprana, pero disminuyen durante la esporulación. Al parecer no funcionan como propágulos” (Blaszkowski, 2003).

1.2.3. Clasificación de los HMA.

Tradicionalmente la espora ha sido la estructura más usada para la identificación de HMA en los primeros estudios de taxonomía. Actualmente se han venido usando estudios moleculares para el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre hongos, que revela un gran número de nuevas especies. (Smith & Read, 1997).

1.2.3.1. Multiplicación de inóculo Micorrízico.

“El carácter de simbiote obligado de los HMA conlleva al uso de plantas hospederas para que éstos puedan completar su ciclo de vida” (Usuga, Castañeda, & Franco, 2008).

Los ecosistemas naturales ofrecen comunidades de hongos micorrízicos nativos que frecuentemente son usados como fuente de inóculo. Estos propágulos fúngicos están constituidos por trozos de raíces colonizadas, esporas y segmentos de hifas que por lo general se encuentran concentrados en los primeros centímetros del suelo (Bellgard, 1993).

“Las muestras de suelo generalmente son tomadas de porciones cercanas a la raíz, éstas, pueden contener diferentes tipos de propágulos, pero son las esporas que por sus características morfológicas permiten la identificación de las especies” (Brundrett, 1996).

Sin embargo las esporas provenientes de estas porciones de suelo pueden no estar en buenas condiciones para su identificación, por lo que el inóculo tiene que multiplicarse en plantas hospederas micotróficas cultivadas en sustratos o suelo estéril. Este sistema conocido como cultivo trampa permite multiplicar las especies nativas colectadas del campo. (Sieverding E. , 1991)

“No todas las asociaciones entre HMA-planta son compatibles, pudiendo en algunos casos beneficiar en mayor grado a un hospedero y adaptarse a determinadas condiciones edafoclimáticas evidenciando marcadas diferencias no sólo estructurales sino también entre especies” (Linderman & Davis, 2004).

1.2.4. Cultivo in vitro de hongos micorrízicos arbusculares.

En las últimas décadas el cultivo in-vitro de HMA se presenta como una alternativa de producción de inóculo de HMA limpio que garantiza la inocuidad del inóculo al evitar la presencia de otro tipo de organismos patógenos que podrían estar presentes en el suelo.

1.2.4.1. Cultivo monoxénico:

El cultivo monoxénico, es un técnica que ha logrado producir cultivo *in vitro* de raíces, a las cuales se les ha inoculado esporas de hongos MA previamente desinfectadas, de tal forma que se la asociación micorrízica *in vitro* sin la necesidad de contar con una planta hospedera completa. (Bago, Sachar, & Pfeffer, 2000).

Esta técnica ofrece propágulos puros, estériles, libre de contaminantes, que hasta ahora no ha sido posible lograrlo utilizando los modos convencionales de cultivo en macetas.

1.2.4.2. Raíces Hospederas transformadas.

Agrobacterium rhizogenes es una bacteria Gram negativa del suelo que induce un fenotipo particular denominado “raíz pilosa” en plantas dicotiledóneas. En las raíces transformadas con esta bacteria, un segmento de ADN de la bacteria, llamada región T (ADN transferido)

del plásmido Ri (inducción de la raíz) se incorpora a las células de la planta hospedera. La integración y la expresión de este ADN en el genoma de la planta provocará el desarrollo del fenotipo “raíz peluda” y la síntesis de un compuesto de bajo peso molecular llamada opina (Chilton, Tepfer, Petit, & Tempé, 1982).

1.2.4.3. Elección de los HMA en los hospederos.

“Se ha demostrado que la asociación de HMA y plantas no es específica, puesto que cualquiera de los HMA puede colonizar a cualquiera de las plantas susceptibles de formar simbiosis” (Brundrett, 1996).

“Algunos hongos muestran un mejor grado de efectividad que beneficia el establecimiento de la micorriza bajo determinadas condiciones” (Pozo, 1999).

Las principales condiciones que se deben tomar en cuenta para la elección de una planta hospedera óptima son: ser micótrofa obligada y no selectiva a las diferentes especies de hongos micorrízicos arbusculares; adaptarse a un rango amplio de condiciones de suelo y clima; rústica para que su mantenimiento no requiera mucho espacio ni cuidados en el invernadero o en condiciones de vivero; con semillas con un alto porcentaje de germinación; no deben enfermedades radicales en común con los cultivos en los cuales se utilizara el inoculo (Linderman & Davis, 2004).

El sistema radicular posee una de las condiciones más importantes, ya que se ha visto que en plantas con raíces finas existe una mejor esporulación de HMA y aquellas plantas con rápido desarrollo del sistema de fibras radicales son consideradas como un cultivo trampa ideal para la producción de esporas de HMA (Chaurasia & Khare, 2005).

1.2.4.4. Simbiosis para formar micorrizas.

Según (De la Vega, 2006), la simbiosis se realiza mediante los siguientes pasos:

Primer paso.- Se produce identificación mutua planta/hongo-planta en la rizósfera, o en regiones próximas a las raíces o pelos radicales. La identificación es al parecer por

sustancias exudadas desde la raíz que provocan el crecimiento del micelio y un biotropismo positivo del mismo hacia la raíz.

Segundo paso.- Consiste en el acercamiento y acoplamiento progresivo y gradual del micelio y raicilla produciéndose el contacto intercelular al formarse una estructura que ata ambas biomásas.

Tercer paso.- Se realiza la colonización y se producen cambios morfológicos y estructurales tanto en los tejidos colonizados por el hongo, como en la organización de la pared celular de la raíz. Posteriormente se produce la integración fisiológica de ambos simbios (hongo-raíz) y, simbios para integrar sus procesos metabólicos.

Este proceso de asociación para formar micorrizas provoca alteraciones morfológicas y anatómicas en las plantas colonizadas tales como cambios en: la relación tallo raíz; la estructura de los tejidos radicales; el número de cloroplastos; aumento de la lignificación; alteración de los balances hormonales, etc. Efectos que no sólo son explicables como simple mejora nutritiva de la planta debido al aumento de eficacia en la absorción de nutrientes por la raíz gracias a la formación de la micorriza, sino que responde a cambios metabólicos más profundos y complejos, debidos a la integración fisiológica de los simbios.

1.2.4.5. Importancia de los HMA a nivel agrícola.

“La diversidad funcional de las distintas especies de HMA es de gran importancia en los sistemas agrícolas” (Gosling, Hodge, Goodlass, & Bending, 2006) ya que no todos los HMA son igualmente efectivos en promover el crecimiento de todos los hospederos, condiciones ambientales, de suelo etc. “Por lo que varias pruebas fisiológicas deben llevarse a cabo para encontrar las condiciones más adecuadas de planta-hongo-ambiente” (Brundrett, 2002).

Además de la mejorar la captación de nutrientes, los MA confieren a la planta otros beneficios, tales como: estimulación del crecimiento, resistencia al ataque de plagas y enfermedades, tolerancia a estrés hídrico, y contribuye a mejorar la estructura del suelo (Bethlenfalvay & Linderman, 1992).

1.3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

1.3.1. Rizobacterias.

Rizobacterias (bacterias que habitan la rizósfera) es el grupo más abundante de los microorganismos en los suelos, que son capaces de colonizar todos los nichos ecológicos que se encuentran en las raíces de las plantas en todas las etapas de crecimiento y pueden mejorar el rendimiento de los cultivos por modos directos o modos indirectos de acción (Allur, Megadi, & Ninnekar, 2009).

Se ha propuesto que, haciendo coincidir los genotipos de rizobacterias (con posibles características de promoción de crecimiento de las plantas) con cultivos para los que tienen preferencia de colonización, el grado de colonización de las raíces podría aumentarse y por tanto, el rendimiento global de la planta (Singh y Mukerji, 2006).

1.3.2. Ventajas de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal BPCV.

Las ventajas del uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal han sido ampliamente demostradas.

Adicionalmente (Romero, Correa, Moccia, & Rivas, 2003) señala que:

Algunas de estas bacterias podrían tener un efecto sinérgico con los hongos micorrízicos arbusculares, mejorando los niveles de colonización micorrízicos y optimizando de esta forma la toma de nutrientes minerales del suelo por parte de la planta.

1.3.3. Mecanismos promoción del crecimiento vegetal.

“Los mecanismos directos de promoción vegetal encierran varios procesos en los cuales, las bacterias alteran el desarrollo vegetal” (Ahmad et al., 2006; Leisinger y Margraff, 1979; Matheron, 2001; Wildermuth et al., 2002).

Estos mecanismos, empleados por bacterias, son muy diversos y en algunos casos poco estudiados, sin embargo, se pueden diferenciar claramente dos procesos esenciales:

El primero consiste en la producción de sustancias orgánicas, producto del metabolismo secundario de las bacterias, que son capaces de promover respuestas fisiológicas específicas en las células vegetales.

El segundo mecanismo se puede encontrar en la intervención directa de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos, en los cuales pueden hacer disponibles compuestos orgánicos e inorgánicos que son aprovechados por las plantas (Romero, Correa, Moccia, & Rivas, 2003).

1.3.4. Interacción entre HMA y Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV).

“Varios experimentos que tratan de mejorar los rendimientos de los cultivos a través de la inoculación combinada de PGPR y AMF se centraron principalmente en las respuestas de las plantas a la inoculación” (Linderman R. , 1988).

Sin embargo, (Honrubia, Torres, Díaz, & Cano, 1992), indica que “el conocimiento de los impactos potenciales de las rizobacterias en hongos micorrízicos incluyendo cambios en la raíz-hongo de señalización, el reconocimiento y la receptividad, el crecimiento de hongos y la germinación es escasa” (p. 47).

Bajo condiciones in vitro los efectos positivos de algunas cepas bacterianas para promover la germinación de esporas y el crecimiento de las hifas de *G. mosseae* BEG12 se demostraron. Un posterior experimento in vivo usando *Medicago truncatula* y *Lycopersicon esculentum* muestra un aumento en la colonización de la raíz AMF en presencia de una de las cepas bacterianas probadas (Pivato, y otros, 2009).

“Las rizobacterias puede aumentar o inhibir el crecimiento de la planta, a través de efectos en la competencia con micorriza arbuscular o incluso tener un efecto perjudicial sobre la asociación de micorrizas” (Linderman R. , 1988).

1.3.5. Métodos de inmovilización de microorganismos.

Un soporte adecuado para la inmovilización de microorganismos con aplicación en el área ambiental debe proporcionar condiciones apropiadas para la supervivencia de las células y su funcionamiento como inóculo, lo cual da como resultado una vida media suficientemente larga así como el mejoramiento de la supervivencia y de la actividad en el suelo.

“Se requiere que el soporte no sea tóxico, ni contaminante y que tenga una calidad constante, para permitir una liberación precisa de los microorganismos en el sitio de interés y eventualmente se evite la dispersión de los microorganismos” (Veen, J., Overbeek, & Elsas, 1997).

1.3.5.1. Alginato de calcio.

El alginato es un componente de la pared celular de las algas pardas, está formado por dos tipos de unidades monoméricas: el ácido $\beta(1-4)$ D-manurónico y el ácido $\alpha(1,4)$ -L-gulurónico. Cuando el alginato es expuesto a la presencia de iones calcio se forma una red de entrecruzamiento con los polímeros del ácido gluónico, que permite la inmovilización de células. (Smidsrød & Skjak-Brka, 1990).

“La inmovilización de microorganismos en alginato de calcio es el método más usado, debido a que en su preparación no se requieren condiciones de reacción extremas, es de bajo costo y de baja toxicidad” (Sanjay, y otros, 2008, pág. 249).

A pesar de sus características (Bashan, Holguin, & Bashan, 2003) sostiene que “el uso del alginato de calcio se ha considerado adecuado solo para pruebas de laboratorio pero no para la aplicación en campo, debido a su baja resistencia mecánica, incompatibilidad con ciertos iones y su susceptibilidad a la biodegradación”.

No obstante (Coradin, Nassif, & Livage, 2003), manifiesta que “recientes investigaciones han sugerido que la resistencia mecánica de las perlas de alginato de calcio puede incrementarse mediante la adición de silica, logrando la inmovilización de células e incluso de biomoléculas”.

1.3.5.2. Agar.

El agar es una mezcla de polisacáridos extraída a partir de diferentes especies de algas rojas, principalmente del género *Gracilaria*. El polisacárido fundamental es la agarosa que

posee propiedades gelificantes y tiene una estructura alternante de 3,6 anhidro-L-galactosa (3,6-AG) y D-galactosa.

El agar es ampliamente usado como aditivo alimenticio y en numerosas aplicaciones médicas, farmacéuticas y biotecnológicas (Pulz & Gross, 2004). Aunque típicamente se ha utilizado como agente gelificante en cultivos microbianos, su uso como soporte para inmovilización de células se ha extendido debido a su nula toxicidad y a las condiciones de reacción suaves que se requieren llevar a cabo la matriz de inmovilización. Entre otras ventajas, se puede mencionar la diversidad en la formación y licuefacción del gel, su estabilidad química y térmica, y su capacidad para el entrecruzamiento (Guiseley, 1989).

1.3.5.3. Poliuretano.

El poliuretano es un polímero derivado de la condensación de poli-isocianatos y polialcoholes. Es químicamente inerte, completamente elástico y mecánicamente resistente a la abrasión. Una de las ventajas del poliuretano es su alta porosidad, que permite retener a las células sin limitaciones de difusión para el sustrato, el producto e incluso para el oxígeno (Manohar, Kim, & Karegoudr, 2001, pág. 311).

Entre otras cualidades el poliuretano es de fácil disponibilidad y manejo para la inmovilización de microorganismos, extremadamente versátil y de bajo costo, altamente estable y permite una mayor viabilidad de las células inmovilizadas durante varios usos (Sharanagouda & Karegoudar, 2002, pág. 225).

Los primeros trabajos de inmovilización en poliuretano emplearon pre polímeros a partir de los cuales se generó el poliuretano que contenía a las células inmovilizadas. Sin embargo, se tienen evidencias de que los grupos isocianato, producidos durante la polimerización de este soporte, pueden tener un efecto tóxico sobre las células, por lo que una práctica común ha sido el uso de polímeros prefabricados (Brányik & Kuncová, 2000).

“Algunas de las aplicaciones de microorganismos inmovilizados en espuma de poliuretano ha sido en la degradación de compuestos fenólicos (O'Reilly & Crawford, 1989b), 2-metilnaftaleno” (Sharanagouda & Karegoudar, 2002).

1.3.5.4. Matrices de silica gel.

Las matrices de silica se forman por reacciones de hidrólisis y poli condensación que ocurren en soluciones acuosas a temperatura ambiente, que generan una estructura porosa inorgánica cuando las células son adicionadas a una solución de silica pre hidrolizada de tetraetoxisilicato o metoxisilicato (Bhatia, Brinker, Gupta, & Singh, 2000).

La química sol-gel, basada en reacciones inorgánicas de polimerización, ha sido empleada en diferentes áreas de investigación, y debido a las condiciones en las cuales ocurre la reacción puede aplicarse para el atrapamiento de diferentes sistemas biológicos.

“Las principales características de los materiales usados en los métodos sol-gel, y que los hacen adecuados para aplicaciones en biotecnología ambiental, son su bajo costo, su carácter hidrofílico y su resistencia al ataque microbiano” (Bhatia, Brinker, Gupta, & Singh, 2000).

Adicionalmente “son químicamente inertes, presentan una alta estabilidad mecánica, térmica y no se disuelven en solventes orgánicos como ocurre con la mayoría de los polímeros orgánicos” (Nassif, y otros, 2003).

A pesar de sus características, una desventaja de las matrices de silica gel es que durante su formación por procesos convencionales, se generan matrices con una porosidad promedio menor al tamaño de las células comunes. A lo que se debe sumar la toxicidad de los alcoholes que se liberan (metanol o etanol) durante las reacciones de hidrólisis y condensación de alcoxidos de silicio $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$. Con la finalidad de proteger a las células de la toxicidad de los compuestos que se forman durante el proceso de inmovilización, se ha probado el uso de compuestos químicos que, entre otras características deseables, deben ser solubles en agua, biocompatibles y mantener la cohesión del gel (Nassif, y otros, 2003, pág. 204).

“El compuesto que mejores resultados ha proporcionado es el glicerol, que incluso puede tener un efecto en el tamaño del poro y en el área superficial del gel” (Alvarez, Foglia, Copello, Desimone, & Díaz, 2009).

Sin embargo, existen pocos estudios sobre el efecto de estos solutos compatibles sobre la estructura del gel y respecto a su función como una fuente de nutrientes para los microorganismos inmovilizados.

1.4. Origen e importancia del cultivo de la papa.

La mayor diversidad genética de papa (*Solanum tuberosum* L.) cultivada y silvestre se encuentra en las tierras altas de los Andes de América del Sur. La primera crónica conocida que menciona la papa fue escrita por Pedro Cieza de León en 1538. Cieza encontró tubérculos que los indígenas llamaban “papas”, primero en la parte alta del valle del Cuzco, Perú y posteriormente en Quito, Ecuador. El centro de domesticación del cultivo se encuentra en los alrededores del Lago Titicaca, cerca de la frontera actual entre Perú y Bolivia. Existe evidencia arqueológica que prueba que varias culturas antiguas, como la Inca, la Tiahuanaco, la Nazca y la Mochica, cultivaron la papa.

Aparentemente la evolución de las especies de papa cultivada se originó a partir del nivel diploide (dos pares de cromosomas). Por ejemplo, la especie diploide *Solanum phureja* se encontraba distribuida en tiempos prehispánicos desde el centro del Perú hasta Ecuador, Colombia y Venezuela. La diversificación posterior del cultivo ocurrió a través de la hibridación intra e interespecífica.

De aproximadamente 2.000 especies conocidas dentro del género *Solanum*, entre 160 y 180 forman tubérculos; pero de éstos, sólo ocho son especies comestibles cultivadas. Existen cerca de 5.000 cultivares de papa, de los cuales hoy en día se cultivan en los Andes menos de 500. En 1994, el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) realizó una colección de papas cultivadas en el Ecuador, y encontró más de 400 diferentes tipos entre especies antígenas y phureja. Sin embargo, en el país sólo comúnmente se siembran 30 cultivares, de los cuales las variedades INIAPGabriela y Superchola representan más de la mitad del área sembrada.

Los agricultores han reconocido el valor de las raíces y tubérculos en términos de producción de energía cosechada por hectárea por día, de los cuales la papa es el más eficiente entre los cultivos comestibles comunes. La calidad y cantidad de las sustancias nutritivas del tubérculo varían por variedad de papa y condiciones de campo. El contenido de agua en un tubérculo fresco varía entre 63% a 87%; de hidratos de carbono, 13% a 30% (incluyendo el contenido de fibra 0.17% a 3.48%), de proteínas 0.7% a 4.6%; de grasas entre 0.02% a 0.96%; y de cenizas, 0.44% a 1.9%. Los otros constituyentes básicos son: azúcares, ácido ascórbico y vitaminas. La papa es la principal fuente de alimento para los habitantes de las zonas altas del país, con un consumo anual per cápita que fluctúa según las ciudades: 122 kg en Quito, 80 kg en Cuenca y 50 kg en Guayaquil. Los restaurantes de Quito y Guayaquil consumen alrededor de 16.294 t/año, principalmente de papa frita, a la francesa.

El 90% de la papa a nivel nacional se consume en estado fresco. Los usos industriales son variados: como papas fritas en forma de “chips”, a la francesa, congelada, pre frito y enlatada. También se obtiene almidón, alcohol y celulosa de la cáscara. A partir de 1994 el consumo de comidas rápidas en el país ha aumentado a un ritmo anual del 6%. Hoy en día las industrias procesadoras utilizan 50.000 t/año, lo cual representa el 10% de la producción nacional.

1.5. Objetivos y / o preguntas de investigación.

1.5.1. Objetivo general y pregunta de investigación:

Evaluar el efecto de la co-inoculación de *R. irregularis* y *Paenibacillus sp.* en cápsulas de alginato en el crecimiento de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.), Única, y Bintjie.

¿Existe un efecto en el crecimiento de las dos variedades de papa al ser co-inoculadas con *R. Irregularis* y *Paenibacillus sp.*?

1.5.2. Objetivo específico:

- Determinar la altura de las plantas a los 30, 60, y 90 días
- Determinar peso seco del área radicular y el peso seco del área foliar después de 90 DDS
- Determinar el porcentaje de la raíz colonizada a los 90DDS.

CAPITULO II
MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1. Sitio del experimento.

El ensayo se llevó a cabo en la finca de Zamora Huayco de la Universidad Técnica Particular de Loja, con las coordenadas 04°0'1.59"S, 79°10'48.46"W – 2160 m amsl, los experimentos se llevaron a cabo entre los meses de Julio a diciembre del 2014. Para el primer sembrío (variedad única) que empezó el 18 de julio y finalizó el 18 de octubre la temperatura media fue de 15,63 ° C y la humedad fue de 80,87 % y para el segundo sembrío (variedad bintjie) que empezó el 26 de septiembre y finalizó el 26 de diciembre la temperatura media fue de 14,43 ° C con una humedad de 78,12 %.

2.2. Material vegetal.

Se utilizaron vitroplántulas de papa de las variedades: Única y Bitjie fueron obtenidas del departamento de Micro propagación Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y la "Station de Haute Belgique" in Libramont, Belgium, respectivamente.

Las vitroplántulas fueron subcultivadas in vitro en medio Murashige & Skoog pH 5.9 hasta alcanzar el número necesario para el ensayo. Cuando las plantas tuvieron 30 días fueron plantadas en cada maceta en sustrato estéril. La composición química del sustrato utilizado y su interpretación se detallan en las tablas 1 y 2.

2.3. *Rhizophagus irregularis* y *Paenibacillus* sp.

Se utilizó un producto comercial de micorriza basado en la cepa de *R. irregularis* DAOM 197198 de la empresa alemana Symplanta (<http://www.symplanta.com/>). Se trata de una especie ampliamente distribuida, por lo que es considerada una especie modelo debido a su facilidad para multiplicarla de varias maneras.

La cepa de *Paenibacillus* provino de la colección de microorganismos de la UTPL, el código de la cepa es R47065 y proviene de un cultivo de papa de la provincia de Cañar obtenido en el año 2009. En experimentos previos esta cepa demostró tener buenas cualidades en los tests in vitro para determinar su capacidad para solubilizar fósforo, producir ácido indolacético y **acc deaminase**.

2.4. Encapsulación de microorganismos.

La encapsulación de los microorganismos se realizó en el Departamento de Ciencias Naturales de la UTPL; en la cual los microorganismos fueron encapsulados en una matriz de alginato de sodio (2%) y polimerizado en una solución de cloruro de calcio (1%), formando un gel de alginato de calcio en forma de capsula encerrando así a los microorganismos. Las capsulas fueron elaboradas en una cámara de flujo laminar en la cual utilizando micro pipetas se hizo gotear la solución de alginato con los microorganismos en la solución de cloruro de sodio.

Cada cápsula de alginato contenía aproximadamente 25 esporas de *R. Irregularis* y 3×10^5 CFU de *Paenibacillus* sp.

2.5. Establecimiento del ensayo.

El ensayo de inoculación de las cápsulas de alginato conteniendo los microorganismos se desarrolló en macetas de aproximadamente 1kg de capacidad en la cual se adicionó sustrato de vivero que consistió en arena de mina y suelo agrícola en proporciones 1:3 v/v; El sustrato se esterilizó en autoclave antes de usarse, para eliminar su contenido de hongos y bacterias. Cada sesión de tratamiento en autoclave duró una hora a 120 ° C.

Tabla 1. Análisis del suelo

Cód. Lab.	Cód. Campo	Análisis Mecánico % TFSA			Textura	pH	M.O %	N ppm	P_2O_5 ppm	K_2O ppm
		Ao	Lo	Ac						
1247	1	69.2	22.4	8.4	FoAo	6.8	5.0	167.47	327.13	170.5

Tabla 2. Interpretación del análisis

Cód. Lab.	Cód. Campo	Textura	Ph	M.O	N	P_2O_5	K_2O
				%	ppm	ppm	ppm
1247	1	Franco Arenoso	Ligeramente alcalino	Medio	Alto	Alto	Medio

Las macetas se llenaron con el sustrato hasta aproximadamente las $\frac{3}{4}$ partes y se realizó un pequeño hoyo en el centro del sustrato húmedo en el cual se insertó una vitroplanta de papa

de 31 días de edad, luego 20 cápsulas (conteniendo los microorganismos de acuerdo se dispusieron en contacto con las raíces y posteriormente se cubrieron con sustrato. Las plántulas fueron cubiertas con vasos plásticos desechables transparentes durante 25 días para evitar el estrés de la planta por el trasplante debido al paso de las condiciones in-vitro a condiciones in-vivo.

2.6. Diseño del experimento.

El experimento consistió en un diseño de bloques completos al azar con 4 tratamientos en los que; en el tratamiento uno añadimos *R irregularis*, en el segundo tratamiento añadimos *Paenibacillus* sp., en el tercer tratamiento utilizamos una combinación de *R. irregulares* y *Paenibacillus* sp, y el cuarto tratamiento fue un control con alginato, de los cuales existieron 10 repeticiones por cada tratamiento dando un total de 40 plantas por Variedad de Papa.

Se utilizaron vitroplántulas de papa de las variedades mencionadas Una vez realizado el tratamiento se evaluó periódicamente la altura (30, 60, 90 Días), y después de los 90 días en la cosecha evaluamos; el peso seco del área radicular, el peso seco del área foliar y el porcentaje de la raíz colonizada.

Se inocularon 20 cápsulas de alginato por cada planta.

Análisis de los datos se analizaron con Anovas de una vía el programa SPSS Statistics 20, se hizo una prueba post-hoc con la prueba de Tukey con un P=0.05. Los análisis se realizaron por separado para cada una de las 2 variedades de papa

Código	Descripción del tratamiento
T1	Variedad de papa 1 (Unica) + Combinación 1 (AMF)
T1	Variedad de papa 2 (Bitjie) + Combinación 1 (AMF)
T2	Variedad de papa 1 (Unica) + Combinación 2 (PGPR)
T2	Variedad de papa 2 (Bitjie) + Combinación 2 (PGPR)
T3	Variedad de papa 1(Unica) + Combinación 3 (AMF + PGPR)
T3	Variedad de papa 2 (Bitjie) + Combinación 3 (AMF + PGPR),
T4	Control 1 (Variedad de papa 1 (Unica), (no micorriza, no bacteria)
T4	Control 2 (Variedad de papa 2 (Bitjie), (no micorriza, no bacteria)

2.7. Porcentaje de colonización micorrízica: Frecuencia e intensidad.

Para calcular el porcentaje de frecuencia e intensidad de la colonización micorrízica de cada planta se utilizó siguiente fórmula:

$$F\% = \frac{100(N - n_0)}{N}$$

Dónde: **(F%)** = frecuencia, **N** = número total de fragmentos observados por planta, es decir en este estudio fueron 20 fragmentos analizados por planta; **n₀** = número de fragmentos con rango cero de colonización (0 colonización).

Y para calcular la intensidad de R, irregularis. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$I\% = \frac{95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1}{N}$$

En donde: I% = intensidad de la colonización, n₅, n₄, n₃ etc. indican el número de fragmentos con rango 5, rango 4, rango 3, etc. y N es el número total de fragmentos analizados para esa muestra.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados.

En la primera variedad de papa (Única) en el transcurso de los 3 meses 4 plantas murieron en el proceso dando un total de 41 plantas que se dividieron de la siguiente manera; 12 plantas para el primer tratamiento, 11 plantas para el segundo tratamiento, 12 plantas para el tercer tratamiento y 10 plantas para el primer tratamiento. Los resultados de altura, y peso seco de hojas raíces y tubérculos se a los 30 días después de la siembra (DDS), 60 DDS y 90 DDS se presentan en las tablas 3 y 4 respectivamente.

Variedad Única

Tabla 3. Altura de las plantas tomadas en el día 30, 60 y 90 DDS (días después de la siembra)

Tratamiento	Altura 30 DDS (cm)	Altura 60 DDS (cm)	Altura 90 DDS (cm)
T1 (AMF)	6.16±0.71	12.45±0.91 <i>a</i>	21.20±0.96 <i>a</i>
T2 (Bac)	5.43±0.56	10.83±0.85 <i>ab</i>	19.75±0.70 <i>b</i>
T3(AMF+Bac)	5.98±0.60	10.88±0.65 <i>ab</i>	17.67±1.11 <i>bc</i>
Control	3.98±0.70	8.80±0.92 <i>b</i>	14.80±0.88 <i>c</i>
P value	0.102	0.040	<0.0001

Se muestra muestran las medias ± error estándar de al menos 10 réplicas. En negras se resaltan las diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). Tratamientos, seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey test).

Tabla 4. Peso seco de las hojas, raíz y tubérculos a los 90 DDS

Tratamiento	Peso seco(g)	Peso seco raíz (g)	Peso seco tubérculos (g)
T1 (AMF)	0.509±0.025	0.108±0.020	3.672±0.53 <i>b</i>
T2 (Bac)	0.509±0.035	0.159±0.032	5.839±0.70 <i>a</i>
T3(AMF+Bac)	0.586±0.028	0.086±0.020	3.718±0.69 <i>b</i>
Control	0.488±0.053	0.096±0.023	5.988±0.69 <i>a</i>
P value	0.286	0.173	0.024

Se muestran las medias ± error estándar de al menos 10 réplicas. En negras se resaltan las diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). Tratamientos, seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes. En la segunda

variedad de papa (Bintjie) Logramos obtener un total de 40 vitroplántulas de las cuales en el transcurso de los tres meses que duro el sembrío murieron 2 plantas dando un total de 38 plantas de las cuales 9 pertenecían al primer tratamiento, 10 al segundo tratamiento, 10 al tercer tratamiento y 9 al cuarto tratamiento.

Los resultados de altura, y peso seco de hojas, raíces y tubérculos a los 30 días después de la siembra (DDS), 60 DDS y 90 DDS se presentan en las tablas 5 y 6 respectivamente.

Variedad Bintjie

Tabla 5. Altura de las plantas (Bitjie) tomadas en el día 30, 60 y 90 DDS

Tratamiento	Altura 30 días (cm)	Altura 60 días (cm)	Altura 90 días (cm)
T1 (AMF)	9.20±1.18	12.80±1.42	15.60±1.48
T2 (Bac)	7.90±1.82	12.60±0.79	15.10±0.89
T3(AMF+Bac)	11.10±0.82	13.88±0.77	16.44±0.58
Control	7.80±1,39	10.33±1.21	12.44±0.096
P value	0.294	0.172	0.096

Se muestra muestran las medias \pm error estándar de al menos 10 réplicas. En negras se resaltan las diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). Tratamientos, seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes.

En la variedad única a los 90 DDS tuvo mejor resultado el tratamiento 1 (AMF), pese a que haciendo una comparación con el control, los dos restantes tratamientos a los que añadimos microorganismos presentan un resultado positivo, siendo el control el que medidas más bajas de altura presento. En la variedad bintjie pese a que no existen mayores diferencias entre los tres tratamientos a los que añadimos microorganismos el resultado más favorable fueron las plantas con las que se utilizó el tratamiento 3 (AMF+Bac) siendo el control el que nos dio las medidas más bajas de altura de igual manera para esta variedad (figura 1)

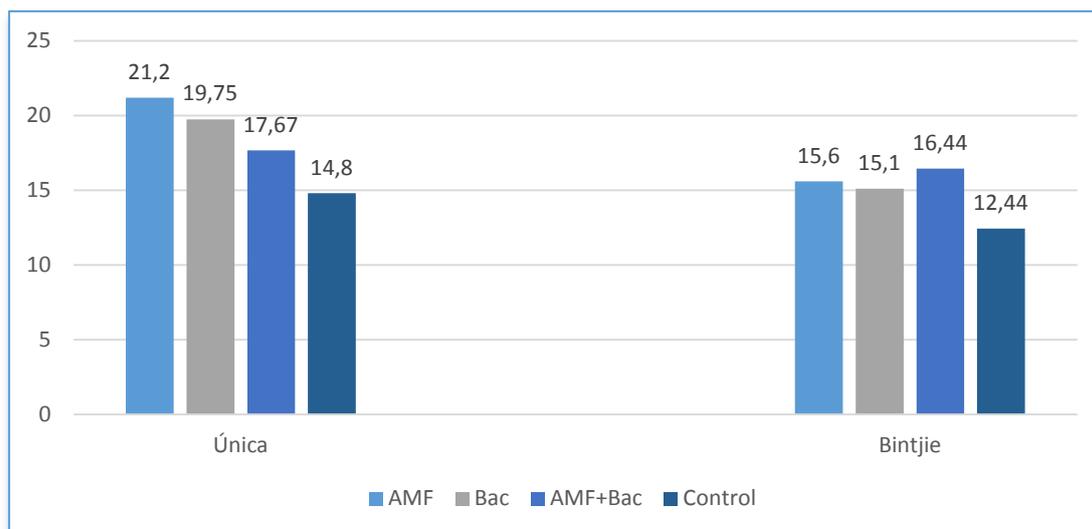


Figura 1. Comparación de los 4 tratamientos en la altura de las dos variedades de papas a los 90 DDT

Tabla 6. Peso seco de las hojas, raíz y tubérculos

Tratamiento	Peso seco hojas (g)	Peso seco raíz (g)	Peso seco tubérculos (g)
T1 (AMF)	0.505±0.021 <i>ab</i>	0.073±0.007	3.63±0.38 <i>a</i>
T2 (Bac)	0.467±0.029 <i>ab</i>	0.076±0.006	3.05±0.36 <i>ab</i>
T3(AMF+Bac)	0.542±0.040 <i>a</i>	0.066±0.006	3.63±0.77 <i>ab</i>
Control	0.416±0.030 <i>b</i>	0.061±0.006	1.83±0.40 <i>b</i>
P value	0.027	0.329	0.033

Se muestra muestran las medias \pm error estándar de al menos 10 réplicas. En negras se resaltan las diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). Tratamientos, seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes.

En la variedad Única cada tratamiento responde de una manera distinta a cada variable propuesta a medir, en el caso del peso seco del área foliar obtuvimos los mejores resultados con el tratamiento 3 (AMF+Bac), el peso seco de la raíz se obtuvo valores superiores con el tratamiento 2 (Bac) y el peso seco de los tubérculos los valores superiores se los obtuvo con el tratamiento 2 (Bac) y tratamiento 4 (bacteria).

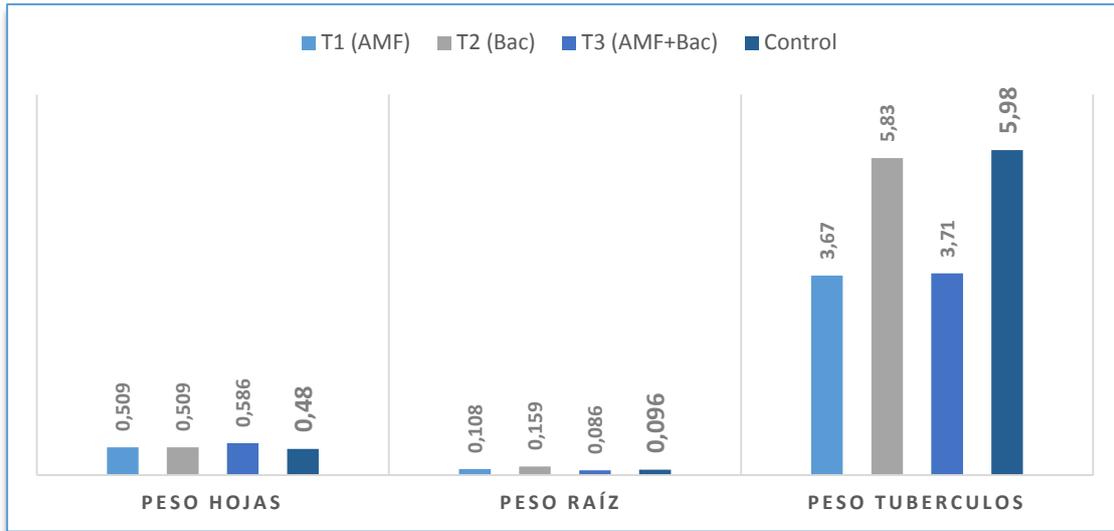


Figura 2. Comparación entre tratamientos de las variables del peso seco del área foliar, radicular y tubérculo de la variedad Única

Entre los tratamientos utilizados en la variedad Binjie sucede algo parecido a la variedad Única, para el peso seco del área foliar los resultados más altos fueron las plantas inoculadas con el tratamiento 3 (AMF+Bac) así mismo en el peso seco radicular el tratamiento 2 (Bac) fue el más efectivo y en donde encontramos diferencia con la variedad anterior es en el peso seco de los tubérculos, aquí (figura 3) el tratamiento 1(AMF) y tratamiento 3 (AMF+Bac) fueron los más efectivos.

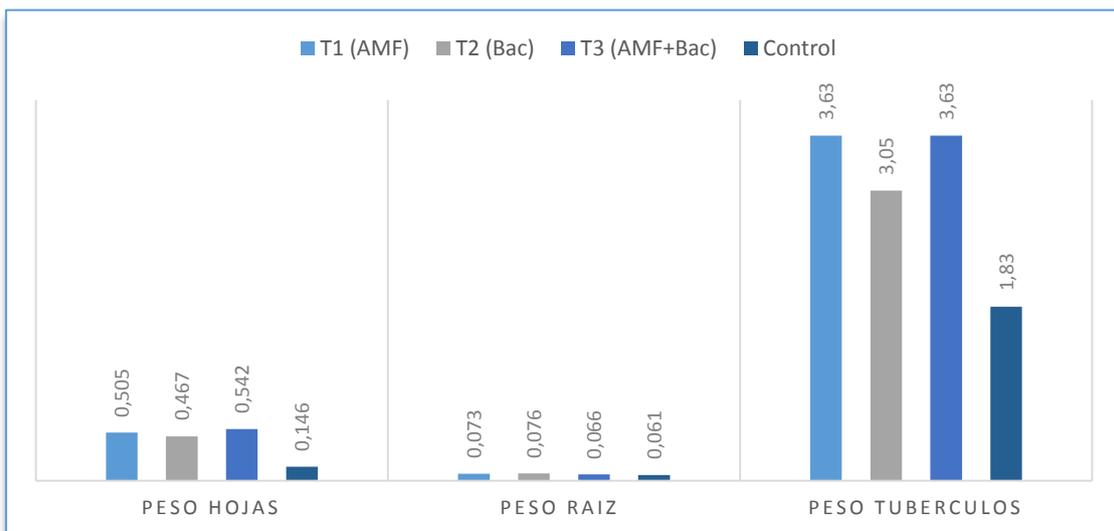


Figura 3. Comparación entre tratamientos de las variables del peso seco del área foliar, radicular y tubérculo de la variedad Binjie

3.1.1. Porcentaje de colonización radicular

Los porcentajes de frecuencia e Intensidad micorrízica en la raíces de las plántulas de papa de la variedad Única y Bintjie a los 90DDS se presentan en las tablas 7 y 8 respectivamente.

Variedad Única

Tabla 7. Evaluación de los porcentajes de frecuencia en intensidad de la colonización micorrízica

	Frecuencia %	Intensidad %
U+AMF	91.54±1.8 <i>a</i>	5.42±1.2 <i>a</i>
U+Bac	15.94±1.6 <i>b</i>	0.15±0.01 <i>b</i>
U+AMF+Bac	83.81±11.5 <i>a</i>	7.37±1.7 <i>a</i>
Control	4.00±1.5 <i>b</i>	0.04±0.01 <i>b</i>
	<0.0001	0.002

Al medir la frecuencia micorrízica en la variedad única podemos mencionar que los tratamientos que incluyeron a la micorriza obtuvieron valores netamente altos, a nivel de cada planta obtuvimos incluso valores de una frecuencia del 100% con el tratamiento 1 (AMF) así mismo el tratamiento 3 (AMF+BAC), y a nivel general el tratamiento con el que se obtuvo mejor respuesta fue el primero, por el contrario los niveles más bajos de frecuencia los tuvo el control como se puede observar en la siguiente figura 4.

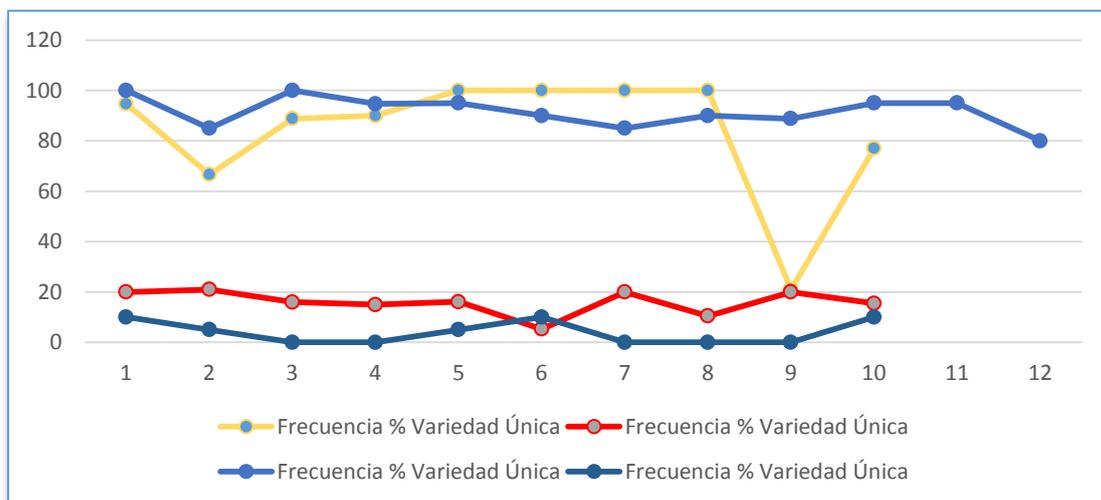


Figura 4. Porcentaje de la frecuencia de cada planta por tratamiento cada tratamiento de la variedad única

Al analizar la intensidad micorrízica en la variedad única existe una relación directa entre las plantas que se inocularon con el tratamiento 1 (AMF) y tratamiento 3 (AMF+Bac), es decir los tratamientos que poseían la micorriza, siendo el tratamiento 3 el que mejores resultados nos dio, los niveles más bajos fueron los del control en conjunto con las plantas que tuvieron solo la bacteria (Figura 5)

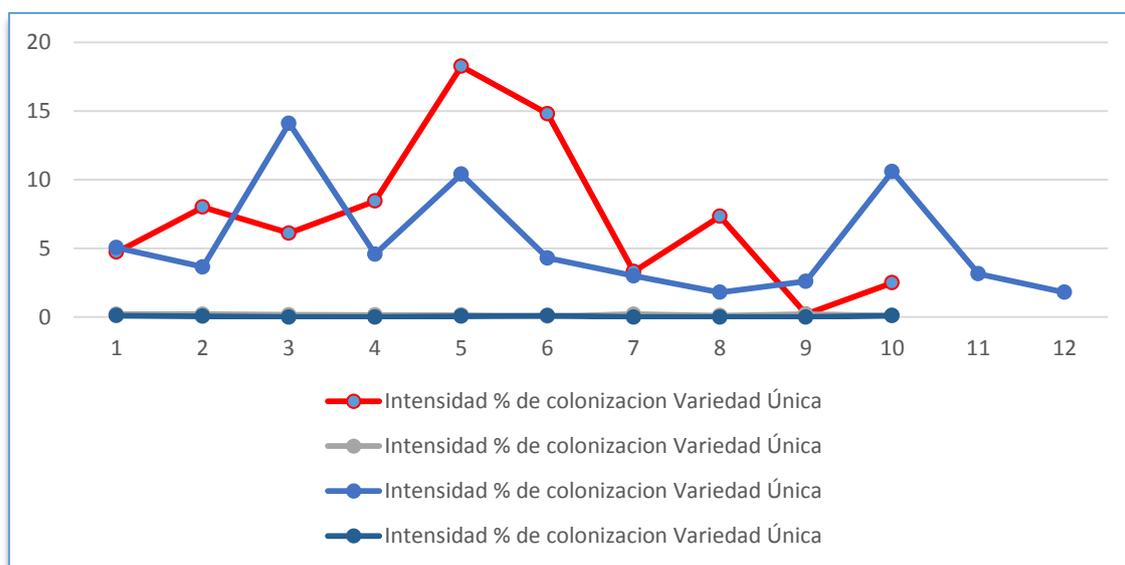


Figura 5. Porcentaje de la Intensidad de cada planta por tratamiento cada tratamiento de la variedad única

Variedad Bintjie

Tabla 8. Evaluación de los efectos de colonización micorrízica

	Frecuencia %	Intensidad %
U+AMF	91.97±3.9 <i>a</i>	6.32±1.5 <i>a</i>
U+Bac	18.65±1.5 <i>b</i>	0.18±0.01 <i>b</i>
U+AMF+Bac	93.20±1.4 <i>a</i>	5.80±0.5 <i>a</i>
Control	12.58±2.4 <i>b</i>	0.12±0.02 <i>b</i>
	<0.0001	<0.0001

Tal y como sucedió en la variedad única, en la variedad Bintjie se repite, las plantas que fueron inoculadas con micorrizas; tratamiento 1 (AMF) y tratamiento 3 (AMF+Bac) fueron las que presentaron los porcentajes más altos, pese a que en esta variedad específicamente el tratamiento 3 fue el que nos arrojó los datos más elevados así como los valores más bajos nos los dio el tratamiento 4 (control) como se representa en la figura 5

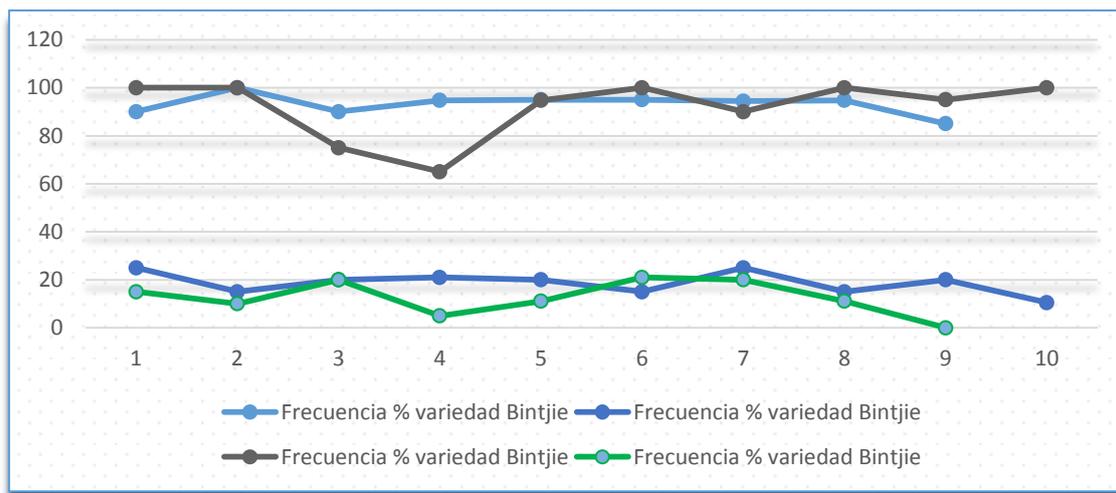


Figura 6. Porcentaje de la frecuencia de cada planta por tratamiento cada tratamiento de la variedad única

En el porcentaje de intensidad nuevamente sucede lo mismo, las plantas que fueron inoculadas con micorrizas o con micorrizas y bacterias obtuvieron los porcentajes más altos, con los valores que obtuvimos en esta variedad en conjunto con la variedad única podríamos inferir que existe una relación en el porcentaje de frecuencia con el porcentaje de intensidad. Los valores más bajos de intensidad fueron los arrojados por el control.

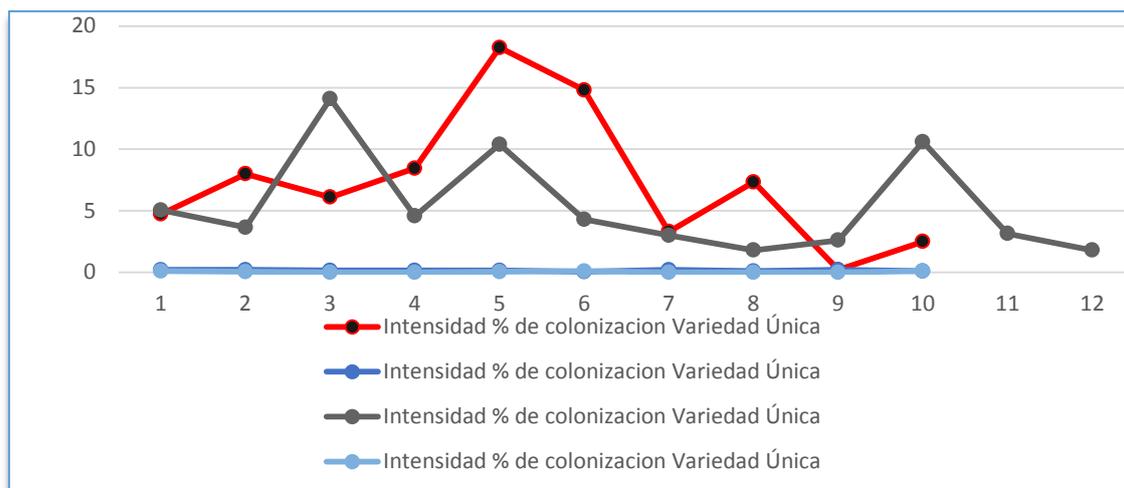


Figura 7. Porcentaje de la Intensidad de cada planta por tratamiento cada tratamiento de la variedad única.

3.2. **Discusión:**

En este estudio sobre el efecto de crecimiento de las variedades de papa al ser co-inoculadas con *Rhizophagus irregularis* y *Paenibacillus sp*, en la variedad Única y Bintjie se puede mencionar que tuvieron una respuesta positiva en algunas variables a considerar en comparación con el control, siendo la variedad Única la que presentó mejores resultados en cuanto a la altura de las plantas con el tratamiento 1 (AMF) como se puede observar en la tabla 1. El aumento de la disponibilidad de P con la simbiosis micorriza-planta está ampliamente documentado en la literatura, hecho particularmente importante sobre todo en suelos que tienen altas tasas de retención de P, como los usados en el presente ensayo (Coyne, 2000), menciona que: Las micorrizas aumentan la disponibilidad del fósforo mediante una serie de mecanismos como la excreción de fosfatasas, ácido carbónico y ácido orgánico, así como mediante la extensión de la superficie de la raíz expuesta al fósforo, significando que las micorrizas estimulan el crecimiento de las plantas. Pese a esto en un estudio similar realizado por (Black & And Tinker P, 1977) no encontraron diferencias en el rendimiento final entre los tratamientos de las plantas que inocularon y no inocularon.

En la variedad Única, los resultados muestran un efecto positivo de la simbiosis a partir de los 60 DDS, lo que concuerda a lo obtenido por (Enríquez, 2008), quien obtuvo respuesta en altura a partir de los 75 DDS, confirmando que la simbiosis micorriza-planta tiene un periodo de establecimiento variable, durante este lapso de tiempo incluso puede haber un retardo en el crecimiento del hospedero hasta que se

establezca la simbiosis. Es posible que el efecto de la simbiosis haya empezado a partir de los 60 DDS, época en donde ya se observa significación estadística sobre todo en altura de planta, algunos autores reportan que para que se establezca la simbiosis se requiere un periodo de incubación incluso de 75 a 90 días.

Enríquez (2008), en un ensayo similar en plantas de palmito, obtuvo resultados en las mismas variables a partir de los 70 a 90 DDS; motivo por el cual se podría inferir que pese a que encontramos diferencias en la altura de la variedad Bitjie en comparación con el control, estas no están tan establecidas en comparación con la variedad única. Los resultados que se observan en la tabla 1 y 3, muestran el efecto positivo de la aplicación de micorrizas arbusculares en sustrato estéril a partir de los 60 días después del trasplante, lo que concuerda con (Duchicela & Gonzales, 2003) quien manifiesta que para ver el efecto benéfico de la simbiosis se requiere de la esterilización del sustrato.

Estudios previos han informado de que la aplicación combinada de PGPR y AMF aumenta el crecimiento y el desarrollo en las plantas inoculadas (De-Bashan, Hernández, Money, & Bashan, 2004).

En nuestro estudio, logramos obtener resultados positivos en algunas variables cuando se aplicó el tratamiento 3 (AMF+Bac), como en la altura a los 90 DDS de la variedad Bitjie, y el peso seco de las hojas en ambas variedades. El efecto incipiente en el crecimiento de las plantas con la combinación de rizobacterias y micorriza puede estar relacionado con la competencia de cada simbionte, una situación en la que la planta huésped debe tanto satisfacer sus necesidades fisiológicas y proporcionar energía a los microorganismos simbiotes (Azcon, 2000).

En cuanto al peso seco del área radicular a los 90 DDS, se puede encontrar que en ambas variedades existen valores más altos en las plantas a las que se añadió el tratamiento 2 (PGPR), como se muestra en la tabla 2 y tabla 4.

Según (Tsavkelova, Klimova, Cherdyntseva, & Netrusov, 2006), los más eficientes productores de auxinas son las bacterias promotoras del crecimiento. El Ácido Indol Acético (AIA) producido por las bacterias representa una capacidad PGPR importante ya que beneficia a la planta contribuyendo con el crecimiento radicular, pues esta auxina es capaz de promover la formación de raíces laterales y adventicias, sin embargo el efecto de ésta sobre la planta depende de su concentración y el tipo de cultivo en el que éste se evalúe. Observando las tablas 2 y 4, en lo referente al peso

seco del área foliar después de 90 DDS se puede manifestar que la variedad Única y Bintjie tienen diferentes formas de responder a la aplicación de los tratamientos con *R irregularis* y *Paenibacillus* sp. Siendo la variedad Bintjie la que presentó una respuesta efectiva al aumento del peso foliar.

La variabilidad del área específica de las hojas entre los diferentes tipos dentro de una misma especie de planta puede estar relacionada a la diferente capacidad fotosintética, una de las variables que afectan el crecimiento de la planta, está relacionada con la eficiencia fotosintética, es decir, cuanto mayor sea, mayor será la producción de sustancias de reserva como el almidón, lo que favorece el rendimiento de los cultivos como en el caso de la papa, pues se produciría mayor desarrollo de las hojas, y mejorara la cantidad de tubérculos (Steinbauer, 2000); (Wei-xing & Tibbitts, 1997). Lo que origina que en cierta variedad como la Binjie tenga una respuesta efectiva al aumento del peso foliar en diferencia a la Única que presenta valores más equilibrados en los 4 tratamientos.

En nuestro estudio en relación al peso seco de los tubérculos sucede algo inesperado (tabla 2) el control al que no se añadió microorganismos presenta resultados superiores a los que utilizamos los HMA y PGPR, motivo por el cual podríamos asumir que las plantas utilizaron mayor cantidad de energía para producir tubérculos evitando su desarrollo foliar y prestando mayor cantidad de recursos al área radicular. En la variedad Binjie sucede lo contrario el mejor nivel en cuanto a producción de tubérculos nos dan las plantas en las que se utilizó el tratamiento 1 (HMA) dando a entender que las dos variedades de papa utilizadas no reaccionan de la misma forma ante un mismo tratamiento de HMA.

La efectividad que obtuvimos con los inóculos de HMA, y de HMA+ PGPR son favorables al hablar en la frecuencia de colonización de HMA encontradas en las plantas de las dos variedades de papa utilizadas, la variedad única presentó mejores niveles de colonización utilizando el tratamiento 1 (AMF), a diferencia de la variedad Binjie que presentó mejores niveles de colonización utilizando el tratamiento 3 (AMF+Bac).

Estos resultados afirman lo propuesto por (Fitter & Garbaye, 1994) quien informó que: Las rizobacterias pueden aumentar la capacidad de AMF para colonizar las raíces de las plantas. Pese a que los valores que reflejan la intensidad encontrada en las plantas son bajos (tabla 5-6), la promoción del crecimiento asociado con bajos niveles iniciales de colonización de HMA también se demostró por O Keefe usando un set de plantas

de papas. Además existen varios estudios que reportan niveles de colonización bajos para el cultivo de la papa (Cesaro, y otros, 2008).

Por otro lado el porcentaje de colonización no va en relación directa con el beneficio neto que obtienen las plantas de la asociación con los HMA. “Se ha reportado que incluso niveles muy bajos de colonización pueden tener un impacto positivo en la producción de papa” (Niemira, Safir, Hammerschmidt, & Bird, 1995).

CONCLUSIONES

La papa es un cultivo que puede adaptarse bien a la inoculación de *R irregularis*. Aunque se pudo demostrar que la misma puede variar dependiendo el tipo de variedad de papa y de acuerdo al tiempo de cosecha.

Existe un efecto clave con la inoculación de *R irregulares* para el crecimiento de la planta, ya que en ambas variedades pudimos conseguir un desarrollo amplio en comparación al control, y sin dejar alado que tampoco se logró encontrar diferencias marcadas entre el uso de *R Irregularis* en conjunto con *Paenibacillus sp*, así como el uso de las mismas por separado.

Se pudo deducir que no existe relación entre el porcentaje de colonización micorrízica con la influencia de la misma en el desarrollo de la planta, niveles bajos de inoculación lograron resultados favorables en el crecimiento del vegetal.

Las respuestas positivas en este estudio fueron al emplear a los microorganismos por separado.

RECOMENDACIONES

Al trabajar con vitroplántulas resulta complicado conseguir un número efectivo de plantas para poder empezar con el sembrío, la contaminación es un problema que dificulta llegar a la cantidad efectiva razón por la cual es necesario considerar todos los niveles de asepsia en la cámara de flujo laminar para hacer la replicación de las plantas.

Hasta llegar a la cantidad necesaria de vitroplántulas es necesario continuar la replicación hasta obtener el número exacto de plantas a sembrar con la misma fecha de replicación.

Es preciso tener en claro la morfología que adquieren las micorrizas en las raíces para así poder evitar confusiones al momento de determinar los porcentajes de inoculación.

BIBLIOGRAFÍA:

- Allen, M. (2007). *Mycorrhizal fungi: Highways for water and nutrients in arid soils*. *Vadose Zone Journal*.
- Allur, P., Megadi, V., & Ninnekar, H. (2009). *Biodegradation of p-cresol by immobilized cells of Bacillus sp. strain PHN 1*. *Biodegradation*.
- Alvarez, & Ramos, J. (2004). *Hongos y Plantas". Beneficios a diferentes escalas en micorrizas arbusculares*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Alvarez, G., Foglia, M., Copello, G., Desimone, M., & Díaz, L. (2009). *Effect of various parameters on viability and growth of bacteria immobilized in sol-gel-derived silica matrices*. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Azcon, R. (2000). *Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola; in: Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular, edited by Alarcon, A. and Ferrera Cerrato*. México: Postgrado Ciencias Agrícolas Montecillo.
- Azcon-Aguilar, C., & Barea, J. (1980). *Micorrizas". Investigación y Ciencia*.
- Azcon-Aguilar, C., & Barea, J. (1996). *Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involve*.
- Bago, B., Sachar, H., & Pfeffer, P. (2000). *El micelio externo de la micorriza Arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno, En: Alarcon A., Ferrera R., Ecología, Fisiología y Biotecnología de la micorriza Arbuscular*. México: Mundi Prens.
- Bashan, Y., Holguin, G., & Bashan, L. (2003). *Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances*.
- Beare, M., Parmelee, R., Hendrix, P., Cheng, W., Coleman, D., & Crossley, D. (1992). *Microbial and faunal interactions and effects on litter nitrogen and decomposition in agroecosystems*. *Ecol. Microorg.*
- Bellgard, S. (1993). *The topsoil as the major store of propagules of vesicular-arbuscular fungi in southeast Australian sandstone soil, Mycorrhiza*.

- Berg, G. (2009). *Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Mini Review Appl Microbiol Biotechnol.*
- Bethlenfalvai, G., & Linderman, R. (1992). *Mycorrhizae in sustainable agriculture. ASA Special Publication: Wisconsin.*
- Bhatia, R., Brinker, C., Gupta, A., & Singh, A. (2000). *Aqueous sol-gel process for protein encapsulation. Chemical Material.*
- Black, R., & Tinker, P. B. (1977). Interaction between the effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza and fertilizer phosphorus on yields of potatoes in the fields. *Nature (London)* 267, 510-510.
- Błaszowski, J. (2003). *Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) species deposited in the Department of Plant Pathology, University of Agriculture in Szczecin, Poland.*
- Boucher, D., James, S., & Keeler, K. (1982). *The ecology of mutualism. Annual Review of Ecology and Systematics.*
- Brachman, A., & Parniske, M. (2006). *The Most Widespread Symbiosis on Earth. PLoS Biology.*
- Brányik, T., & Kuncová, G. (2000). *Changes in phenol oxidation rate of a mixed microbial culture caused by sol-gel immobilization. Biotechnology Letters .*
- Brundrett, M. (1991). *Mycorrhizas in natural ecosystems. Advances in Ecological Research.*
- Brundrett, M. (2002). *Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytologist.*
- Brundrett, M. (2002). *Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytologist .*
- Brundrett, M. (2004). *Diversity and classification of mycorrhizal associations. Biological Revisions. Cambridge Philosophical Society.*
- Brundrett, M., Bougher, Dell, ..., Grove, T., & Malajczuk, N. (1996). *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research Monograph 32m, Canberra.*

- Cassidy, M., Lee, H., & Trevors, J. (1996). *Environmental applications of immobilized microbial cells, a review. Journal of Industrial Microbiology.*
- Cesaro, P., van Tuinen, D., Copetta, A., Chatagnier, O., Berta, G., Gianinazzi, S., & Lingua, G. (2008). Preferential Colonization of *Solanum tuberosum* L. Roots by the Fungus *Glomus intraradices* in Arabic Soil of a Potato Farming Area. *American society for microbiology*, 5776-5783.
- Chaurasia, B., & Khare, K. (2005). *Hordeum vulgare: A suitable host for mass production of Arbuscular mycorrhizal fungi from natural soil. Applied Ecology and Environmental Research.*
- Chilton, M., Tepfer, D., Petit, A., & Tempé, J. (1982). *Agrobacterium rhizogenes inserts T-DNA into the genome of host plant root cells.*
- Coradin, T., Nassif, N., & Livage, J. (2003). *Silica-alginate composites for microencapsulation. Applied Microbiology and Biotechnology.*
- Coyne, M. (2000). *Micorrizas. En: Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Madrid.*
- Davies, J. F. (2005). *Influence of Arbuscular Mycorrhizae Indigenous to Peru and a Flavonoid on Growth, yield and leaf elemental concentration of 'Yungay' potatoes. Hort Science.*
- De la Vega, J. (2006). *Suelos y Ecosistemas. Las Micorrizas de mayor importancia son: Endomicorrizas, Ectomicorrizas lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura.*
- De-Bashan, Hernández, T., Money, & Bashan. (2004). "Microalgae Growth Promoting Bacteria As "Helpers" for Microalgae: A Novel Approach for Removing Ammonium and Phosphorus From Municipal Wastewater. *Water Res.*38, 466-474.
- Declerck, S., Strullu, D., & Fortin, J. (2005). *In Vitro Culture of Mycorrhizas. Germany: Springer.*
- Duchicela, J., & Gonzales, M. (2003). La micorriza arbuscular en el contexto de la agricultura sustentable. *monografía CEINCI*, 19.

- Duran, F. (2003). *Manual de cultivos organicos, Alelopatia y trangenicos*. Grupo Latino Ltda.
- Enríquez, F. (2008). Evaluación de la efectividad de cuatro dosis de micorrizas arbusculares bajo cuatro niveles de fósforo en vivero de palmito en la zona de Santo Domingo. Santo Domingo – Ecuador. 163.
- Escobar, C., Zuluaga, J., Colorado, G., & Paez, D. (1998). *Micorriza Vesicula Arbúscular (MVA) Recurso microbiológico para desarrollar una agricultura sostenible*.
- Fitter, A., & Garbaye, J. (1994). Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms in "Management of mycorrhizas in agricultura, horticultura and forestry. *Klumer academia publisherds. Netherlands*, 123-132.
- Frank, B. (1885). *Über die auf Wurze lymbiose beruhende Ernährung ggewisser Bäume durchunterir dische Pilze. Berichteder Deutschen Botanischen Gessellschaft*.
- García-Garrido, J., & Ocampo, J. (2002). *Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. J. Exp. Bot.*
- Gianinazzi, P. (1996). *Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. The plant cell*.
- Gosling, P., Hodge, G., Goodlass, & Bending, G. (2006). *Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. Agriculture, Ecosystems and Environment*.
- Guiseley, K. (1989). *Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization. Enzyme and Microbial Technology* .
- Halling, R. (2001). *Ectomycorrhizae: co-evolution, significance and biogeography. Ann Missouri Bot. Gard.*
- Harley, J., & Smith, S. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. London: Academic Press.
- Honrubia, M., Torres, G., Díaz, A., & Cano. (1992). *Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid: ICONA*.
- Linderman, & Davis, E. (2004). *Varied response of marigold (Tagetes spp.) genotypes to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi*.

- Linderman, R. (1988). *Micorrhizal interaction with the rhizosphere microflora. The micorrhizosphere effect*. Phytopathology.
- Manohar, S., Kim, S., & Karegoudr, T. (2001). *Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of Pseudomonas sp. strain NGK1 in polyurethane foam*. Applied Microbiology Biotechnology.
- Morton, J., & al, e. (1996). *Morphological basis for glomalean taxonomy. EN: Classification and identification of arbuscular micorrhizal fungi*.
- Nassif, N., Roux, C., Coradin, T., Rage, M., Bouvet, O., & Livage, J. (2003). *A sol-gel matrix to preserve the viability of encapsulated bacteria*. Journal Material Chemistry .
- Nehls, U., Mikolajewski, S., Magel, E., & Hampp, R. (2001). *Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control*. New Phytologist.
- Niemira, B. A., Safir, G. R., Hammerschmidt, R., & Bird, G. W. (1995). Production of pre-nuclear minitubers of potatoes with Pead-Based Arbuscular Mycorrhizal Fungal Inoculum. *Agronomy Journal Vol.87, No 5, 992-996*.
- O'Reilly, K., & Crawford, R. (1989b). Degradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized Flavobacterium cells. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 2113-2118.
- Paracer, S., & Ahmadjian, V. (2000). *Symbiosis an Introduction to Biological Interactions*. Oxford: Oxford University Press.
- Peterson, R., & Farquhar, M. (1994). *Mycorrhizas integrated development between roots and fungi*. Mycologia.
- Pfeffer, P., Bago, B., & Shachar-Hill, Y. (2001). *Exploring mycorrhizal function with NMR spectroscopy*. New Phytologist.
- Pivato, B., Offre, P., Marchelli, S., Barbonaglia, B., Mougel, C., Lemanceau, P., & Berta, G. (2009). *Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant*. Mycorrhiza.

- Pozo, M. (1999). Inducción de enzimas hidrolíticas en raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*) como respuesta a la formación de MA y su implicación en el control biológico de *Phytophthora* parasítica. *Tesis de doctorado, Universidad de Granada, España.*
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65,, 635-648.
- Read, D. (1999). *Mycorrhiza: The state of the art*. Berlin: Varma & B. Hock Publisher.
- Romero, A., Correa, O., Moccia, S., & Rivas, J. (2003). *Effect of Azospirillum mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. Journal of Applied Microbiology .*
- Sanjay, K., Asish, M., Pradeep, K., Saptadip, S., Bikash, R., & Keshab, C. (2008). *Production of xylanase by immobilized Trichoderma reesi SAF3 in Ca-alginate beds. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology .*
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Gerig, H., & Walker, C. (2001). *Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. Mycological Research Vol. 105.*
- Sharanagouda, U., & Karegoudar, T. (2002). *Degradation of 2-methylnaphthalene by free and immobilized cells of Pseudomonas sp. strain NGK1. World Journal of Microbiology and Biotechnology.*
- Sieverding, E. (1991). *Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems*. Gran Bretaña: Academic Press.
- Sieverding, E., & al., e. (1998). *La investigación sobre Micorrizas en Colombia. Curso Nacional sobre Micorrizas*. Palmira: Universidad Nacional de Colombia.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R., & M., L. (1993). *Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidenc with vascular land plants. Nature.*
- Smidsrød, O., & Skjak-Brka, G. (1990). *Alginate as immobilization matrix for cells. Trends Biotechnology .*
- Smith, & Read. (2008). *Mycorrhizal simbiosis*. London: Elseiver.
- Smith, S., & Read, D. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. London: Academic Press publisher, 2da edición.

- Steinbauer, M. (2000). Specific leaf weight as an indicator of juvenile leaf toughness in Tasmanian bluegum (*Eucalyptus globules* spp. *globulus*): implications for insect defoliation. *Australian Forestry* 34, 32-37.
- Taylor, N., Remy, W., Hass, H., & Krep, H. (1995). *Fossil arbuscular Mycorrhizae from early Devonian. Mycologia.*
- Tilman, D., Cassman, K., Matson, P., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). *Agricultural sustainability and intensive production practices. Nature .*
- Tsavkelova, Klimova, Cherdyntseva, & Netrusov. (2006). Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42, 117-126.
- Usuga, C., Castañeda, D., & Franco, A. (2008). *Multiplicación de hongos micorriza Arbuscular (H.M.A) y efecto de la micorrización en plantas micropropagadas de banano.*
- Veen, V., J., Overbeek, L., & Elsas, J. (1997). *Fate and activity of microorganisms introduced into soil. Microbiology and Molecular Biology Reviews.*
- Wei-xing, C., & Tibbitts, W. (1997). Relationships of starch concentration with specific leaf weight and mineral concentration in potato leaves under varied CO₂ and temperature. *Acta Botanica Sinica* 39, 1118-1128 .