



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA

TITULO DE BIÓLOGO

**Determinación del porcentaje de colonización de hongos micorrízicos
arbusculares (HMA) en plantaciones de *Bixa orellana***

Trabajo de Titulación.

Autora: Palacios Darquea Diana Soledad

Director: Lucero Mosquera Hernán Patricio, Ing.

LOJA – ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ingeniero.

Hernán Patricio Lucero Mosquera

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación, “**Determinación del porcentaje de colonización de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plantaciones de *Bixa orellana***” realizado por **Diana Soledad Palacios Darquea**; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo de 2017

f.....

Lucero Mosquera Hernán Patricio

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Diana Soledad Palacios Darquea declaro ser la autora del presente trabajo de titulación: Determinación del porcentaje de colonización de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plantaciones de *Bixa orellana*, de la titulación de Biología siendo Hernán Patricio Lucero Mosquera director del presente trabajo. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y/o 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 que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Autor: Diana Soledad Palacios Darquea

Cédula: 1103572952

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Lino y Diana, por haber sido mi guía y modelo a seguir durante esta etapa de mi vida. Su esfuerzo, amor, apoyo y confianza se ven reflejados en la persona que soy.

A mi hermano y a mi familia por su cariño, su motivación y por todos los consejos durante este trayecto tan importante para mí.

Diana Soledad Palacios Darquea

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja, por la excelente formación académica que recibí durante estos años.

Especialmente agradezco a mi director, Ingeniero Hernán Lucero, por su dedicación, tiempo, confianza y conocimientos brindados para hacer posible el cumplimiento con éxito de este proyecto.

A los miembros de mi tribunal por sus sugerencias acertadas a lo largo del desarrollo de mi trabajo.

A mis docentes por su labor realizada y conocimientos impartidos que han permitido que logre esta meta importante de mi vida.

A mis compañeros y amigos que durante estos años estuvieron conmigo y me brindaron su apoyo siempre que los necesité.

Diana Soledad Palacios Darquea

INDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	I
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
INDICE DE CONTENIDOS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
RESUMEN EJECUTIVO.....	I
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Hongos	6
1.2 Hongos formadores de Micorrizas (HFM).....	6
1.3 Tipos de Micorrizas.....	6
1.4 Estructuras morfológicas de las micorrizas	7
1.4.1 Arbusculos.....	7
1.4.2. Vesículas.....	8
1.4.3 Hifas.....	8
1.4.4 Esporas.....	8
1.4.5 Células auxiliares.....	8
1.5 <i>Bixa orellana</i>	9
1.6 Objetivos	10
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
2.1. Área de estudio.....	12
2.2 Muestreo.....	13
2.2.1 Tinción de raíces:.....	13
2.2.2. Porcentaje de colonización.....	14
2.2.3 Estado Fenológico y Diversidad Genética	15
2.3. Análisis de datos.....	15
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
3.1 Colonización de raíces.....	18
3.2 Correlación del porcentaje de colonización con el estado fenológico y el tipo de suelo	19
3.3 Correlación del porcentaje de colonización con la diversidad genética	22

CONCLUSIONES.....	24
RECOMENDACIONES	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
ANEXOS.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escala de evaluación del porcentaje de colonización micorrízica	14
Figura 2. Presencia de HMA en raíces de <i>B. orellana</i> (Hifas y Vesículas)	18
Figura 3. Porcentaje de colonización por HMA, según las comunidades muestreadas de Bixa orellana.	19
Figura 4. Relación entre el porcentaje de colonización y el estado fenológico.....	20
Figura 5. Relación entre el porcentaje de colonización y el tipo de suelo.	21
Figura 6. Correlaciones del porcentaje de colonización y diversidad genética, realizadas en las 4 zonas muestreadas.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de Bixa orellana.....	9
Tabla 2. Condiciones en las que las poblaciones de Bixa orellana se desarrollaron.	12
Tabla 3. Porcentaje de Colonización.....	14
Tabla 4. Promedio del porcentaje de colonización de las 4 zonas muestreadas	31
Tabla 5. Datos de Diversidad genética de las hojas de Bixa orellana.....	35

RESUMEN EJECUTIVO

Los microorganismos cumplen un rol importante en el mantenimiento de los ecosistemas. Entre los grupos más importantes se encuentran los hongos micorrízicos arbusculares (AMF), que se asocian con importantes especies forestales y cultivos contribuyendo a la estabilidad de los ecosistemas. Pese a su importancia económica y ecológica, no hay suficiente información sobre la presencia de estos en especies de plantas nativas y el rol que desempeñan en las mismas, como es el caso de la especie *Bixa orellana*. El objetivo de esta investigación fue verificar y cuantificar la presencia de AMF en las raíces de *B. orellana* mediante el tinción y evaluación del porcentaje de colonización radicular, según Trouvelot et al. (1986). Además, se determinó el nivel de colonización radicular y su relación con el estado fenológico y diversidad genética de las plantas. Se realizaron muestreos en cuatro localidades de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe. El software PRISM se utilizó para realizar los análisis estadísticos. Los resultados mostraron diferencias significativas entre el porcentaje de colonización y las variables analizadas en relación con las áreas muestreadas.

PALABRAS CLAVES: Hongos micorrízicos arbusculares; *Bixa orellana*; porcentaje de colonización.

ABSTRACT

Microorganisms play an important role in the maintenance of ecosystems. Among the most important groups are arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which are associated with important forest species and crops contributing to the stability of ecosystems. Despite of their economic and ecological importance, there is not enough information on the presence of these in native plants species and the role they play in them, as is the case of the *Bixa orellana* species. The aim of this research was to verify and quantify the presence of AMF in the roots of *B. orellana* by coupling root staining, microscopy and evaluating the percentage of root colonization, according to Trouvelot et al. (1986). Additionally, the relation between the level of root colonization and the phenological state and genetic diversity of plants was assessed. Samplings were carried out in four localities of the provinces of Loja and Zamora Chinchipe. The PRISM software was used to perform the statistical analyzes. The results showed significant differences between the percentage of colonization and the variables analyzed in relation to the sampled areas.

KEY WORDS: Arbuscular Mycorrhizal Fungi; *Bixa orellana*; percentage of colonization.

INTRODUCCIÓN

El estudio denominado “Determinación del porcentaje de colonización de hongos micorrízicos arbusculares (de aquí en adelante HMA) en plantaciones de *Bixa orellana*”, es el de establecer su presencia en plantaciones de *B. orellana* en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, con el fin de establecer las bases para estudios posteriores que determinen su función en el desarrollo de las plantas.

La presente investigación está organizada en tres capítulos detallados a continuación. El primer capítulo, referente al marco teórico, abarca la descripción de los HMA, así como las asociaciones que estos forman con la mayor parte de las especies vegetales y su importancia en los ecosistemas. Adicionalmente, se presenta una breve descripción de *Bixa orellana* y los objetivos de esta investigación. En el segundo capítulo, se explican los materiales y métodos utilizados para alcanzar los objetivos planteados, en donde se incluye el área de estudio, la metodología para la tinción de raíces y la determinación del porcentaje de colonización y además el análisis de los datos. Por último el tercer capítulo, consta de la descripción de los resultados obtenidos en el estudio y una breve discusión.

Los microorganismos cumplen un rol importante en el mantenimiento de los ecosistemas principalmente en relación al ciclaje de nutrientes. Uno de los grupos más importantes son los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Los HMA forman asociaciones simbióticas con la mayor parte de las especies vegetales, incluyendo importantes especies forestales y cultivos agrícolas contribuyendo de esta forma a estabilidad y productividad de los ecosistemas (Smith & Read, 2008). Sin embargo, pese su importancia ecológica y económica, en nuestro país no existen suficientes investigaciones sobre su presencia y el rol que desempeñan en las especies vegetales nativas, especialmente de aquellas con gran interés local como es el caso de *Bixa orellana*. *B. orellana*, conocida comúnmente como achiote, es una planta nativa de América del sur, a la que se le atribuyen propiedades medicinales. Debido a su eficiencia como antioxidante es reconocida como un importante agente preventivo del cáncer. Por este motivo, lo que se propuso lograr en esta investigación principalmente fue la verificación de la presencia de HMA en plantaciones de *B. orellana* al sur del Ecuador, mediante la evaluación y posterior cuantificación del porcentaje de colonización radicular y su relación con el estado fenológico de la planta y la diversidad genética de poblaciones de *B. orellana* por el interés que esta tiene en biomedicina, para que posteriormente se puedan realizar estudios específicos de las variables analizadas, partiendo de la línea base que este trabajo proporcionó.

Los resultados obtenidos constituyen un aporte importante al proyecto “Distribución Geográfica, Biología Reproductiva, Diversidad Genética Y Química De Especies Vegetales De Interés Medicinal, En La Región Sur Del Ecuador” al que se encuentra vinculado, por esta razón algunos datos fueron compartidos en nuestro estudio, como lo son los de diversidad genética aportados por el Departamento de Ciencias Biológicas, que sirvieron para establecer la correlación con el porcentaje de colonización. Los resultados mostraron diferencias significativas en relación a las zonas muestreadas. Adicionalmente se observaron diferencias atribuidas a variables como la altura, orientación y tipo de suelo de los sitios muestreados. El porcentaje de colonización fue menor en las poblaciones con mayor actividad antropogénica, lo cual nos lleva a hipotetizar una fuerte influencia de ésta sobre las poblaciones de HMA.

El proyecto fue desarrollado en cuatro localidades de la provincia de Loja y Zamora Chinchipe. Se tomaron muestras de raíces de 30 individuos en las 4 localidades establecidas, las cuales fueron sometidas a un proceso de tinción mediante la aplicación del protocolo de Philips y Hayman (1970); donde se utilizaron reactivos como KOH al 10% por 60 min a 70°C, HCL al 10% por dos minutos y azul de metileno preparado con ácido láctico por 60 min a 70°C, al ser las raíces gruesas, los tiempos de cada reactivo tuvieron que ser modificados del protocolo original para lograr observar las estructuras teñidas. Culminado el proceso de tinción, se realizó el montaje de las raicillas utilizando alcohol polivinílico, ácido láctico y glicerol (PVLG), para posteriormente ser observadas en el microscopio y atribuirles el respectivo porcentaje de colonización utilizando el método propuesto por Trouvelot et al. (1986). Las comparaciones de los porcentajes de colonización entre localidades se realizaron utilizando el software PRISM, donde se realizaron pruebas no paramétricas como la correlación de Spearman, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis donde posteriormente se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn para determinar si existió una diferencia significativa entre los grupos comparados.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Hongos

Los hongos ocupan un lugar importante en el mundo, ya que además de desempeñar un papel significativo en las funciones vitales del ecosistema como ciclaje de nutrientes y descomposición de materia orgánica, también influyen sobre las actividades relacionadas con el ser humano como la producción de alimentos, agricultura, biorremediación, entre otras (Mueller, 2011). Son esenciales como agentes primarios para la descomposición en el ciclo del carbono y nitrógeno, en el transporte de nutrientes siendo una pieza clave en el desarrollo sostenible (Kavanagh, 2005). Se conocen aproximadamente más de 100.000 especies. Sin embargo con el desarrollo de nuevas tecnologías como la secuenciación de nueva generación se ha descubierto que la diversidad es mucho mayor. Se espera que en los próximos años se descubran varios miles de especies, ya que es uno de los reinos menos conocidos (Spiteller, 2015) y así se pueda lograr un mayor éxito de la comprensión de sus ciclos de vida y fisiología (Misra *et al*, 2014).

1.2 Hongos formadores de Micorrizas (HFM)

Desempeñan un importante rol, a través de la simbiosis establecida entre estos y las raíces de las plantas, conocidas como "micorrizas" (Mukerji *et al*, 2002), término que viene del Griego "mycos" que significa hongo y "rhiza", que significa raíz (Parniske, 2008); que son "órganos de absorción dobles, formados cuando los hongos simbioses habitan los tejidos sanos de la mayoría de las plantas terrestres, acuáticas o epífitas" (Trappe, 1994).

Los HFM se han convertido en los organismos benéficos más habitualmente asociados estudiados y explotados en la actualidad (Peterson *al*, 2004). Habitan en entornos heterogéneos con condiciones variables en el suelo y las raíces de las plantas, son muchas las especies existentes de estos hongos, cada cual cumpliendo diferentes funciones. Los HFM se han logrado aislar y reproducir para aprovechar al máximo sus funciones, es así que hoy en día son altamente empleados tanto para fines agrícolas, naturales y ecológicos (Abbott & Johnson, 2016).

1.3 Tipos de Micorrizas

De acuerdo a su estructura y la función que desempeñan se clasifican en: (1) Ectomicorrizas que forman una estructura a manera de manto y una red de hifas intercelulares denominada red de Harting para encerrar a la raicilla; y (2) las Endomicorrizas que colonizan intercelularmente a la raíz, las cuales a su vez se clasifican a su vez en Micorrizas

Arbusculares, Arbutoides, Monotropoides, Ericoides y Orquidoides (Peterson et al, 2004 y Smith & Read, 2008).

Entre los HFM, por mucho los mas abundantes son los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Estos forman asociaciones simbióticas con importantes especies forestales y cultivos (Peterson et al, 2004). Hace relativamente poco tiempo éstos fueron reclasificados dentro del Phylum monofilético Glomeromycota (Schüßler *et al*, 2001). Según Wang & Qiu (2006), el 80% de las especies vegetales y el 92% de familias de plantas terrestres, se encuentran asociadas a los HMA. Esta relación simbiótica, es el resultado de la co-evolución de estos organismos que de acuerdo a registros fósiles data de aproximadamente 460 y 350 millones de años remontándose al período Ordovícico (Smith & Read, 2008). Se especula que los HMA jugaron un papel preponderante en la adaptación de las plantas acuáticas al medio terrestre lo que demuestra la eficiencia del mutualismo y su relevancia en el reino vegetal. Entre los beneficios de la asociación para las plantas se encuentran el incremento de la absorción de nutrientes del suelo, además los HMA contribuyen al control biológico de organismos patógenos especialmente del suelo, e influyen positivamente en la diversidad de comunidades de plantas (Smith & Read, 2008 y Montañaño *et al*, 2007). A más de esto se ha logrado determinar que sirven de alimento para otros organismos y que facilitan la dispersión de bacterias (Heijden & Horton, 2009). Los HMA no producen un cambio notorio en el sistema radicular de sus hospederos y sus características peculiares únicamente pueden ser observadas con la ayuda del microscopio. Las raíces deben ser sometidas a un tratamiento especial para poder analizar sus estructuras internas, tal como la tinción utilizando distintos tipos de tintas (ej. azul de metileno, azul tripan, etc.) para ser posteriormente ser analizadas mediante microscopía de luz (Peterson et al, 2004).

1.4 Estructuras morfológicas de las micorrizas

Las estructuras morfológicas características que componen a los HMA son conocidas como arbusculos, vesículas, células auxiliares, hifas y esporas (Parniske, 2008), estas se encuentran tanto en el micelio intraradical como en el extraradical y crean una superficie de contacto entre las estructuras radiculares y los recursos del suelo (Hodge & Storer, 2014).

1.4.1 Arbúsculos.

Los arbusculos son ramificaciones dicotómicas repetidas de una hifa dando lugar a una estructura similar a un pequeño árbol, de ahí el nombre. Los arbusculos producen una invaginación de la membrana celular aumentando así la superficie de contacto entre el HMA y el hospedero (Peterson al, 2004). De estas estructuras características proviene el nombre de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) (Smith & Read, 2008). Su función es cumplir la

interacción con la planta huésped, así como también la regulación bioquímica, energética y del intercambio de nutrientes (Souza, 2015).

Existen dos tipos de colonización radicular, el tipo Arum, donde las hifas intercelulares penetran las paredes celulares en la corteza interna de la raíz y se ramifican formando finalmente una estructura arbórea altamente ramificada; y también existen el tipo Paris, donde las hifas crecen de célula a célula desarrollando estructuras intracelulares tipo rulos en la corteza de la raíz con numerosos arbusculos pequeños intercalados por célula (Smith & Smith, 1997).

1.4.2. Vesículas.

Las vesículas, se forman en el micelio intraradical y cumplen la función de estructuras de reserva del hongo (Cuenca *et al*, 2007), almacenando lípidos compuestos que proporcionan energía durante el desarrollo del HMA y también se encargan del mantenimiento y el crecimiento de los hongos después de la interrupción de la función metabólica de la raíz (Souza, 2015).

1.4.3 Hifas.

Las hifas son filamentos cilíndricos que en conjunto forman un micelio (Lurá *et al*; 1997). El micelio está compuesto de dos fases: (1) fase extraradical en donde, se producen esporas (y en algunos casos células auxiliares), se forman hifas que absorben nutrientes y se facilitan nuevos puntos de entrada a lo largo de la raíz de la planta huésped y (2) fase intraradical en donde se almacenan lípidos en forma de vesículas, y se produce el intercambio bidireccional de nutrientes (vía los arbusculos) (Souza, 2015).

1.4.4 Esporas.

Las esporas representan estructuras de supervivencia y proporcionan resistencia, principalmente se encargan de la dispersión y el establecimiento de los HMA. Hace algunas décadas representaron un alto valor dentro de la taxonomía para la identificación de diferentes especies de HMA (Souza, 2015).

1.4.5 Células auxiliares.

Se las considera como análogas a las vesículas intrarradicales (Guerrero & Azcón, 1996). Son estructuras formadas en el micelio extraradical en especies de las micorrizas arbusculares, en ocasiones, son formadas a densidades elevadas, de manera que la transferencia de C orgánico de las raíces al suelo es considerable, invirtiendo más energía

en absorción y translocación de nutrientes, así como en la respiración y el crecimiento del hongo (Smith & Read, 2008).

En conjunto, todas estas estructuras contribuyen al funcionamiento y la estabilidad de los ecosistemas, desempeñándose como un factor principal que contribuye al mantenimiento de la biodiversidad vegetal (Smith & Read, 2008). Según Van der Heijden *et al*, (1998), a una alta diversidad de HMA, la riqueza de especies vegetales aumenta significativamente, por lo que es necesario prestar interés en estos hongos considerando su protección y gestión para el futuro.

1.5 *Bixa orellana*

Conocida comúnmente como achiote, es una planta nativa de América del sur que es ampliamente cultivada en muchos países por su uso tanto ornamental como medicinal, atribuyéndole también la capacidad de ser un regenerador del suelo (Barbieri *et al*, 2011). Taxonómicamente se clasifica así:

Tabla 1. Taxonomía de *Bixa orellana*

Reino	Plantae
Phylum	Tracheophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliidae Novák ex Tajt.
Superorden	Rosanae Tajt
Orden	Malvales Juss.
Familia	Bixaceae Kunth
Género	<i>Bixa</i>

Especie	<i>B. orellana</i> L.
---------	-----------------------

Fuente: (Trópicos, 2016).

Es conocida por presentar el pigmento bixina que produce la coloración roja en sus semillas, este pigmento es usado desde la antigüedad y no es tóxico, por lo que ocupa un lugar importante en el mercado de colorantes alimenticios y la industria cosmética (Venugopalan et al, 2011). La bixina se aisló por primera vez de las semillas de *Bixa orellana* en 1875 y en 1961 se completó su estructura química, este pigmento pertenece a la pequeña clase de carotenoides naturales, y está formado por 25 átomos de carbono, teniendo como fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$ (Perecin et al, 2002). Hoy en día, más de dos docenas de sustancias han sido aisladas de las semillas de *Bixa orellana*, a más de la bixina y norbixina, se han obtenido otros compuestos como la isobixina, beta-caroteno, criptoxantina, entre otros (Vilar et al, 2014). Además, las semillas se encuentran compuestas por concentraciones altas en celulosa entre: 40 a 45%, 3,5 a 5,5% de azúcares, 0,3 a 0,9% de aceites esenciales, 4,5% de pigmentos, y 13 a 16% de proteínas y alfa y beta-caroteno (Oliveira, 2005)

Así el carotenoide conocido como bixina, a más de ser importante por sus propiedades antibacteriales, analgésicas y antiinflamatorias, ha demostrado ser un importante agente preventivo del cáncer debido a su eficiencia como antioxidante (Muthukumar et al 2014 y Saini et al, 2015).

1.6 Objetivos

Objetivo General:

Determinar el porcentaje de colonización radicular de *Bixa orellana* por hongos micorrizas arbusculares colectadas en diferentes localidades de la provincia de Loja y Zamora Chinchipe.

Objetivos específicos:

- Comprobar la presencia de hongos micorrízicos arbusculares en *Bixa orellana*, mediante la evaluación del porcentaje de colonización radicular.
- Correlacionar el porcentaje de colonización de HMA con el estado fenológico de las plantas.
- Correlacionar el porcentaje de colonización con la diversidad genética de los individuos de las poblaciones de *Bixa orellana* muestreados.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

En el presente estudio, se muestrearon poblaciones de *B. orellana* de cuatro localidades, dos de ellas ubicadas en la provincia de Zamora Chinchipe y dos en la provincia de Loja. Las parcelas de *B. orellana* seleccionadas para el muestreo de raíces presentaron diferentes condiciones para el desarrollo de la especie, al pertenecer a diferentes condiciones climáticas así como también al tipo de suelo en el que se desarrollaron.

Tabla 2. Condiciones en las que las poblaciones de *Bixa orellana* se desarrollaron.

Sitio	Rango	Tipo de suelo	Orientación	Estado Fenológico
La Pituca - Romerillo	984 a 1368 m.s.n.m.	Franco-Arcilloso	NorEste	floración y fructificación
Los Encuentros-Paquisha	820 a 867 m.s.n.m.	Arcillo-Arenoso	NorOeste	floración y fructificación
Lauro Guerrero et al.	1364 a 1862 m.s.n.m.	Franco -Arcilloso	SurEste	floración y fructificación
Macará - La Mandalá.	390 a 777 m.s.n.m.	Org-Franco-Arenoso	Este	fructificación

Fuente: (Autor).

La provincia de Zamora Chinchipe, se encuentra ubicada 79°30'07" Oeste y 78°15'07" Sur de la región Sur de la Amazonía Ecuatoriana, limita al Norte con la provincia de Azuay y Morona Santiago, al Sur y al Este con la República del Perú y al Oeste con la provincias de Azuay y Loja (ECORAE, 2001), contando con una superficie de 10.572,03 Km² que equivale al 4,4% del territorio ecuatoriano, cuenta con una precipitación de 2000 mm por año y una temperatura entre 17° y 22°C (GADP Zamora Chinchipe, 2011). Es considerada una zona de transición de la vegetación, entre bosques andinos y tropicales húmedos, ya que rango altitudinal varía desde los 815 hasta 2800 m s.n.m. (Lozano, 2002).

Dentro de esta provincia, las dos localidades escogidas para el estudio fueron La Pituca-Romerillo ubicada en el cantón Zamora, 4°6'22" Sur y 78°56'40" Oeste, con una altitud que va de 984 a 1368 m s.n.m., en donde el tipo de suelo predominante es el franco-arcilloso (FA), la segunda localidad se encontró localizada en la vía Los Encuentros-Paquisha, 3°51'25" Sur y 78°41'04" Oeste, comprendiendo una altitud desde 820 a 867 m. s.n.m., con un tipo de suelo arcilloso-arenoso (AA).

La provincia de Loja, se encuentra ubicada 03° 39'55" y 04°30'38" Sur y, 79°05'58" y 79° 05' 58" Oeste en el extremo sur de la Sierra Ecuatoriana, limita al Norte con la provincia del Azuay, al Sur con la República del Perú, al Este con la provincia de Zamora Chinchipe y al Oeste con la provincia de El Oro (GPL, 2012). Posee una superficie de 11.065,42 km², presentando un relieve muy irregular con un rango altitudinal que va desde los 700 hasta sobrepasando los 3700 m.s.n.m., es por esto que el gradiente térmico también es irregular presentando temperaturas entre los 9°C hasta más de 24°C (INEC, 2011).

Las localidades elegidas para el estudio en esta provincia fueron Lauro Guerrero ubicado en el cantón Paltas, 3° 50' Sur y 79° 45' Oeste, con una altitud que va aproximadamente de 1364 a 1862 m s.n.m., cuyo tipo de suelo es franco-arcilloso (FA); otra localidad estudiada fue La Mandalá ubicado en el cantón de Macará, 4°24'0" Sur y 79°57'0" Oeste, comprende una altitud que va desde 390 a 777 m s.n.m., presentando un suelo tipo Org-Franco – Arenoso (OFA).

2.2 Muestreo

Se muestrearon al azar 30 individuos por cada localidad. En total fueron 120 muestras de raíces de *Bixa orellana* (ej. 30 individuos x 4 localidades). Las raíces fueron conservadas en etanol al 70% en tubos eppendorf de 2 ml hasta el momento de su análisis. Posteriormente, de cada muestra se tomaron 30 raicillas de aproximadamente 2 cm de longitud, las cuales fueron enjuagadas en agua corriente y luego sometidas a un proceso de tinción con azul de metileno para su posterior evaluación en el microscopio y cuantificación del porcentaje de colonización

2.2.1 Tinción de raíces:

El proceso de tinción se desarrolló siguiendo la metodología propuesta por Philips y Hayman (1970). Previo a la tinción, se realizaron cortes de segmentos de raíces con una longitud de 2 cm. Las raíces fueron lavadas con agua en un tamiz para eliminar el suelo adherido; seguidamente en cada tubo se agregó KOH al 10% de tal manera que quedaron cubiertas totalmente y fueron llevadas al plato calentador a 70°C por 60 min, culminado este tiempo fueron enjuagadas con agua corriente para luego añadir HCL al 10% por 2 min a temperatura ambiente, se retiró el ácido sin lavar las raíces y se agregó azul de metileno preparado con ácido láctico cubriéndolas totalmente y fueron llevadas nuevamente al plato calentador a 70°C por 60 min.

Culminado el proceso de tinción, se realizó el montaje de las raicillas en placas portaobjetos, colocando 10 de ellas por cada placa utilizando polivinil-lactoglicerol (PVLG), obteniendo así 3 placas por cada muestra (individuo).

2.2.2. Porcentaje de colonización

Se analizaron en el microscopio las muestras preparadas con el lente de 40X, asignándoles a cada segmento analizado una categoría según el porcentaje de colonización que se detectó, teniendo como referencia la tabla siguiente:

Tabla 3. Porcentaje de Colonización

Categoría	% de Colonización
0	0%
1	< 1%
2	2 – 10%
3	11 – 50%
4	51 –90%
5	>90%

Fuente: (Trouvelot et al, 1986)

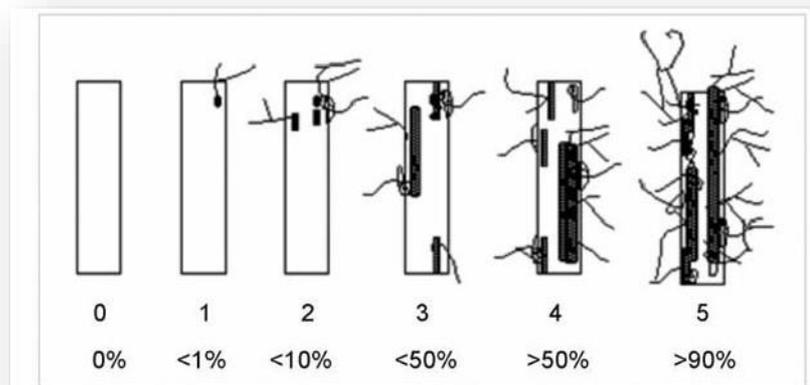


Figura 1. Escala de evaluación del porcentaje de colonización micorrízica

Fuente: (Trouvelot et al, 1986)

Con los datos de las categorías obtenidas, se realizó el cálculo de la intensidad de colonización, a partir de la siguiente fórmula:

$$\%M = \frac{95n^5 + 70n^4 + 30n^3 + 5n^2 + n^1}{N}$$

En donde:

n^5 = Al número de fragmentos de raíces por placa categorizadas como 5

n^4 = Al número de fragmentos de raíces por placa categorizadas como 4

n^3 = Al número de fragmentos de raíces por placa categorizadas como 3

n^2 = Al número de fragmentos de raíces por placa categorizadas como 2

n^1 = Al número de fragmentos de raíces por placa categorizadas como 1

N = Número total de fragmentos.

2.2.3 Estado Fenológico y Diversidad Genética

El estado fenológico de las plantas, al igual que el tipo de suelo de las localidades, fue establecido mediante observación directa paralelamente al muestreo, en donde se concluyó que a pesar que las poblaciones se encontraron en diferentes orientaciones y altitudes, para *B. orellana*, el estado fenológico fue indeterminado.

Los datos de diversidad genética de *B. orellana*, fueron compartidos por el departamento de Ciencias Biológicas, quienes se especializan en estudios de diversidad genética en plantas para poder determinar la posible correlación entre porcentaje de colonización y la diversidad genética. Los datos han sido compartidos en el Anexo 2.

2.3. Análisis de datos

El programa utilizado fue el software PRISM 7, en donde la correlación entre el porcentaje de colonización HMA con el estado fenológico, se estableció mediante la prueba U de Mann-Whitney que es una prueba no paramétrica, ya que en este caso se contó únicamente con dos tipos de estados fenológicos que fueron el de floración-fructificación y el de fructificación. Se realizaron también correlaciones entre el porcentaje de colonización con otras variables como la orientación, altura y el tipo de suelo, a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y posteriormente se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn para determinar si existió una diferencia significativa entre los grupos comparados.

Para establecer la correlación entre la diversidad genética de los individuos de las poblaciones de *B. orellana* y el porcentaje de colonización de HMA, se determinó la correlación de Spearman.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Colonización de raíces

Se logró comprobar la presencia de HMA en las plantaciones de *Bixa orellana* (Figura 2). En el microscopio con el lente de 40X, se observó que en casi la totalidad de los fragmentos de las raíces existía colonización de HMA (ANEXO 1).

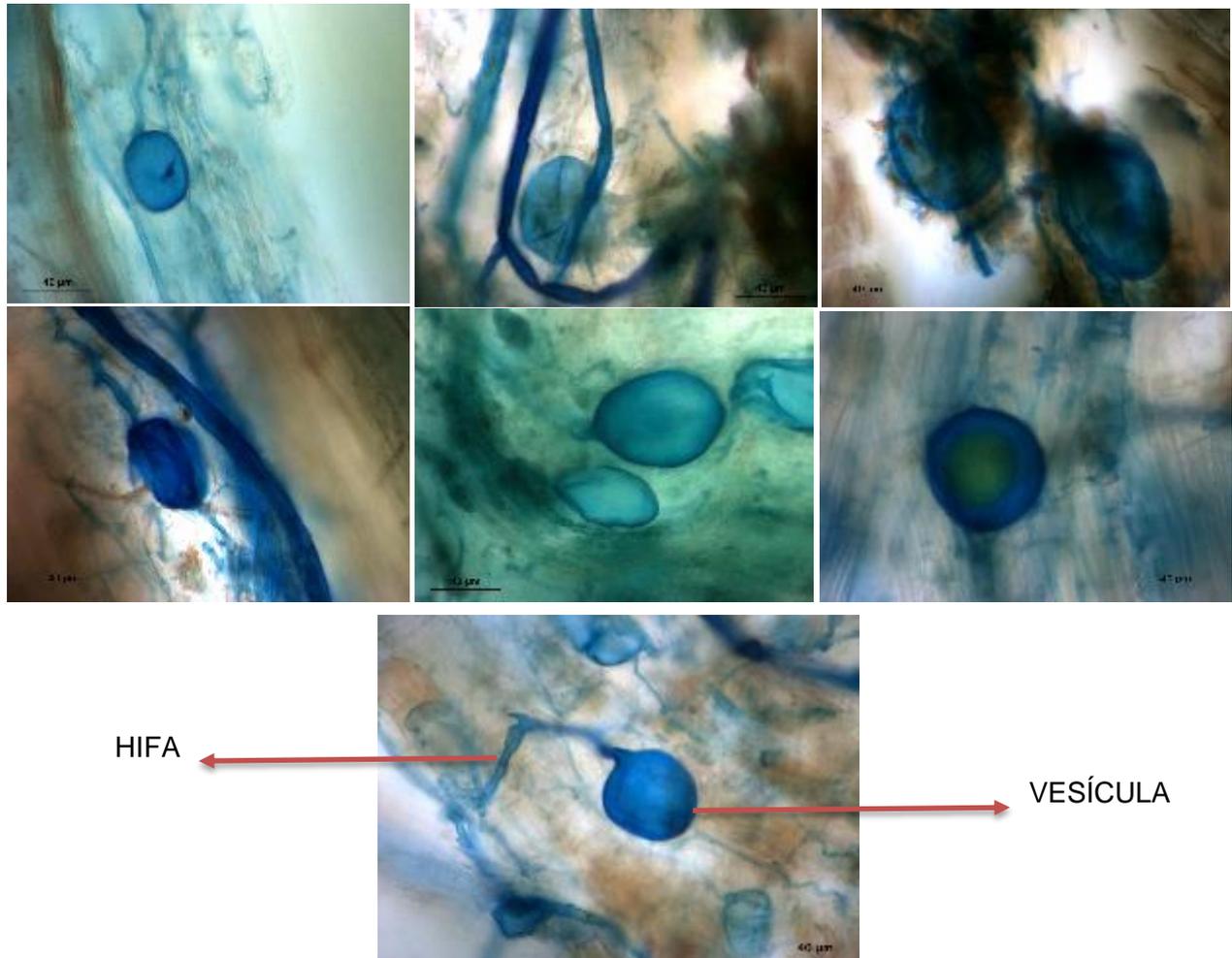


Figura 2. Presencia de HMA en raíces de *B. orellana* (Hifas y Vesículas)

Se constató la presencia de un gran número de hifas y vesículas, mientras que la presencia de arbusculos en este caso fue nula, una razón de ello podría ser a que el proceso de tinción no permitió la visualización de dichas estructuras, debido a que las raicillas estudiadas eran gruesas, necesitando en algunos casos mayor tiempo de tinción, y si ésta luego de la modificación del protocolo continuó siendo débil, pudo impedir la observación de los arbusculos en las muestras estudiadas. Otra respuesta a la ausencia de estas

estructuras según Cano-Santana (2008), es que la vida de un arbusculo es muy corta, durando entre 8 y 14 días, luego de este tiempo el arbusculo se degrada o entra en un periodo de senescencia, donde al final desaparecen.

Según Parniske, 2008, la vida de los arbusculos está influenciada por la capacidad de administrar fosfato y otros nutrientes, por lo que la planta desarrolla un mecanismo para mantener los más eficientes y eliminar el resto mediante una degradación temprana, ya que son los responsables de la transferencia bidireccional de nutrientes durante la simbiosis planta-hongo (Javot et al., 2007).

A través de los datos expuestos en la figura 3, se puede afirmar que en la localidad de los Encuentros-Paquisha se encontró mayor presencia de colonización, seguidamente de Macará-La Mandalá, La Pituca-Romerillo y finalmente con menor intensidad la localidad de Lauro Guerrero.

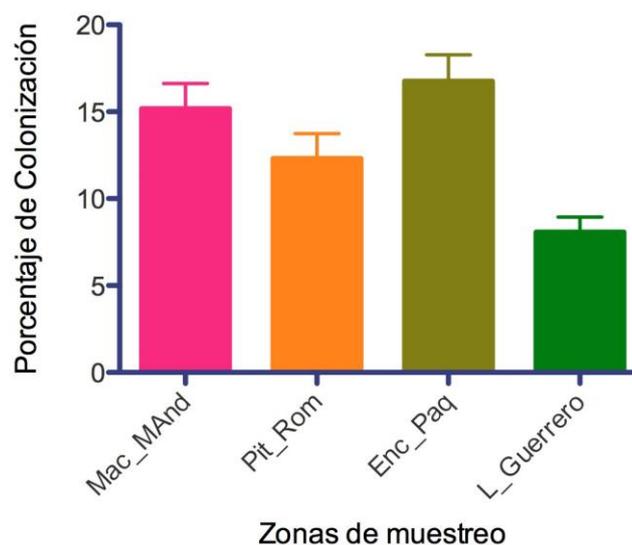


Figura 3. Porcentaje de colonización por HMA, según las comunidades muestreadas de *Bixa orellana*.

3.2 Correlación del porcentaje de colonización con el estado fenológico y el tipo de suelo

En las 4 localidades, según los 30 individuos muestreados por cada una, existieron dos tipos de estados que fueron floración-fructificación para los sitios de La Pituca - Romerillo, Los Encuentros - Paquisha, Lauro Guerrero, mientras que solamente para Macará - La Mandalá se determinó el estado de fructificación. Con la información obtenida, se pudo realizar el

respectivo cálculo del porcentaje de colonización propuesto por Trouvelot, *et al* (1986) (Figura 3), donde resultaron los siguientes datos de las 4 localidades estudiadas (Figura 3), los promedios de colonización se encuentran descritos también en el anexo 2.

Existió un fuerte efecto del sitio de muestreo en la determinación del porcentaje de colonización, las variables como la altitud y orientación, son significantes en este trabajo debido a que a medida que varían, la temperatura y las condiciones del medio lo hacen también, tomando en cuenta que son dos regiones diferentes, a más de que pueden existir otros factores que se encuentren influyendo indirectamente en los resultados obtenidos, pero sobre los que se enfocó este trabajo fue en la influencia del estado fenológico y el tipo de suelo.

En cuanto a la relación del porcentaje de colonización de HMA con el estado fenológico de las plantas, los análisis realizados arrojaron datos significativos para esta variable ($P=0.0482$), siendo el estado de fructificación, quien demostró tener mayor presencia de colonización.

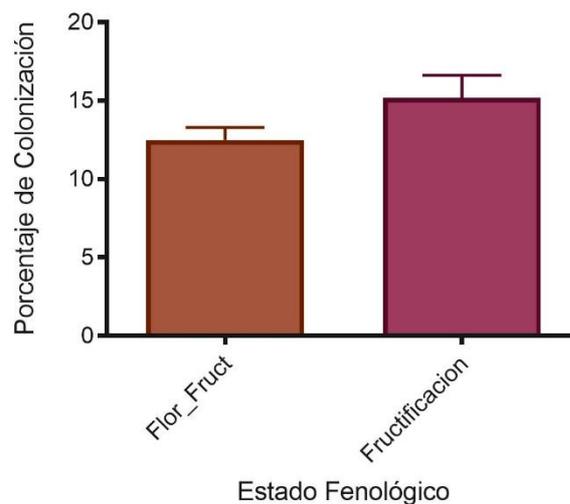


Figura 4. Relación entre el porcentaje de colonización y el estado fenológico

Estos resultados difieren con varios estudios analizados como los de Herrera-Corrales y colaboradores (2014), en donde el porcentaje de colonización más elevado era en el estado de floración, una razón para este hecho es que la colonización está relacionada a las diferentes rutas metabólicas que tienen las plantas (C3 o C4) (Montaño et al., 2001).

Sin embargo, lo obtenido coincide con lo realizado por Cortés-Sarabia y colaboradores (2009), en el cual, la mayor presencia de colonización en *Annona diversifolia* (llama) la cual muestra una estacionalidad marcada, ubicada a una altitud de 360 m.s.n.m, fue durante los periodos de fructificación, donde las plantas necesitan más nutrientes para poder desarrollarse, en comparación con las que se encontraban en estado vegetativo.

Lo mismo ocurre con el estudio realizado por Adriano y colaboradores (2008), quienes comprobaron que el nivel de colonización por HMA, en este caso de *Mangifera indica* (mango Ataúlfo), que en este caso habitó en un clima cálido-húmedo, con una temperatura promedio de 28°C, tuvo su máximo nivel durante la fase de fructificación, atribuyendo esto a la necesidad de incorporar más nutrientes durante esta etapa para compensar a la planta y se logre el crecimiento normal de los frutos.

Se realizó también un análisis para evaluar la relación del estado de colonización frente a el tipo de suelo, en donde el análisis realizado indicó que existe diferencia significativa entre los grupos analizados ($P=0.0002$), que se demostró luego de realizar la prueba de comparaciones múltiples de Dunn, la cual efectivamente indicó que existe una diferencia entre el grupo de suelos franco arcillosos y los suelos arcillo-arenosos y órgano-franco arcillosos, que se ve reflejado en la figura 5, en donde la mayor presencia de colonización se mostró en los suelos arcillo-arenosos, seguido por los suelos órgano-franco arcillosos y por último los suelos franco-arcillosos

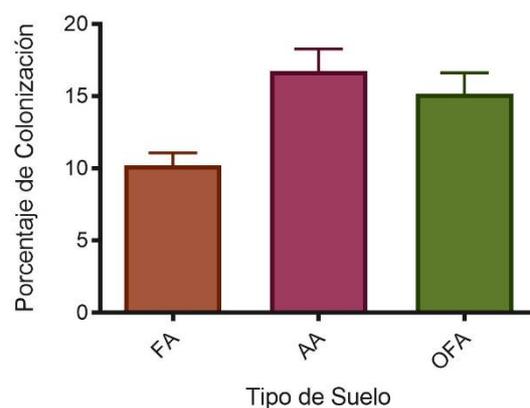


Figura 5. Relación entre el porcentaje de colonización y el tipo de suelo.

Los suelos franco-arcillosos, correspondientes a la Pituca-Romerillo y Lauro Guerrero, coinciden con ser en los que más actividad antrópica se realizó, esto se confirma con los resultados de Vera y colaboradores (2015), donde se inhibe la colonización al existir

residuos de contaminantes como pesticidas y fertilizantes minerales. Mientras más intensa sea la agricultura, la colonización de HMA se altera, disminuyendo notablemente y volviéndolos vulnerables (Azcón-Aguilar *et al*, 1995). Estudios demuestran que la agricultura modifica las propiedades biológicas y químicas de suelo, por lo que las comunidades de HMA cambian, en comparación con un ecosistema natural, aunque este proceso puede también estar influenciado por las plantas hospedadoras y las prácticas de rotación de cultivos (Fernandes *et al*; 2016).

Los resultados concuerdan con los reportados por Öpik y colaboradores (2006), observaron que las comunidades de HMA difieren entre ecosistemas y que la diversidad de taxones disminuye del bosque tropical al pastizal, al bosque templado y a los ecosistemas degradados. Según Khanam y colaboradores (2006), influyen en la colonización de HMA, factores como el pH, la humedad del suelo, la disponibilidad de nutrientes, pero a más de esto un punto importante es la adaptabilidad que estos HMA tengan en el medio en el que se desarrollan.

3.3 Correlación del porcentaje de colonización con la diversidad genética

Las pruebas de Spearman realizadas al 95% de confianza, demostraron que no existió una correlación entre el porcentaje de colonización y la diversidad genética de las hojas de *B. orellana*, en ninguna de las localidades muestreadas: Pituca-Romerillo (P= 0,1993), Los Encuentros-Paquisha (P=0,1918), Lauro Guerrero (P=0,4885), Macará- La Mandalá (P=0,3129), las gráficas obtenidas se muestran en el Anexo 3. La razón de no fueron suficientes como para realizar la prueba.

Sin embargo, son muchos los estudios realizados para el análisis del efecto que tienen los HMA en diferentes comunidades vegetales, según Van der Heijden y colaboradores (1998), el papel de los HMA es fundamental en el mantenimiento, la estructura y diversidad de las plantas, su influencia sobre las comunidades vegetales puede afectar al crecimiento de las mismas, interviniendo así en su capacidad de coexistir con otras especies. Se ha determinado que los HMA no demuestran una especificidad al momento de elegir sus hospederos (Smith & Read, 2008), es por esto que a pesar de poder formar una simbiosis con cualquier planta, pueden beneficiar a los hospederos de manera diferente, dependiendo del efecto que estos estén provocando en cada individuo, demostrando en algunos casos mayores beneficios en algunos hospederos que en otros (Lee *et al*; 2013). Sin embargo se ha prestado poca atención a la investigación de la diversidad de individuos dentro de una especie, es decir su diversidad genotípica, y como esta se encuentra influenciado a los

diversos procesos naturales que se dan en los ecosistemas, lo cual es importante para entender como los genes interactúan con el entorno químico, físico y biológico (Johnson *et al*; 2012).

Según Hoeksema (2010), la intensidad de colonización micorrízica y la respuesta de la planta a esta colonización, exhiben una variación genética hereditaria sustancial dentro de las especies de plantas y hongos y por lo tanto tienen el potencial para responder a la selección coevolucionaria, que se encuentra desarrollando un papel importante en el impulso de la diversificación dentro y entre las poblaciones de plantas y los HMA. Se sabe que los individuos dentro de una especie varían claramente en aspectos funcionales y reproductivos, que son llevados a cabo por los factores ambientales y genéticos presentes, es así que la interacción entre las especies de plantas y los HMA, se encuentran influyendo de manera importante en el mantenimiento de la biodiversidad y la regulación de los recursos que se encuentran presentes en el medio. (Yang *et al*; 2012).

La genómica de las poblaciones de HMA y de las poblaciones de plantas, es fundamental para entender hasta qué punto la variación individual en los atributos funcionales clave se basa genéticamente (Johnson *et al*; 2012). Al influir la diversidad de especies de HMA presentes en el medio en la productividad y la diversidad de las plantas que habitan en el lugar, en estudios posteriores, se debería tomar en cuenta también el analizar la diversidad genética de HMA existente en un ecosistema determinado para llegar a comprender mediante análisis más precisos, los efectos y beneficios que brindan en el medio las diferentes especies de HMA que se encuentran colonizando un individuo.

CONCLUSIONES

Se comprobó que en las 4 poblaciones de *Bixa orellana* casi la totalidad de muestras de raíces mostraron presencia de estructuras de HMA. En estudios posteriores se podrían dilucidar las funciones se encuentran cumpliendo exactamente las comunidades de HMA en esta simbiosis.

Se logró determinar que en los sitios más intervenidos hubo una menor presencia de colonización, una razón para esto fue la agricultura practicada en estos sectores, que permitió que la comunidad de HMA sufriera cambios y no sea igual que en otros sitios, a más de que ha quedado establecido que siempre serán diferentes dependiendo del ecosistema que se encuentren colonizando.

Los HMA tienen distintos patrones de distribución dependiendo de los ecosistemas en los que habitan, los factores climáticos y biogeográficos influyen en su desarrollo, por lo que en algunos casos mostrarán más beneficios en unas plantas colonizadas que en otras. Por ende es necesario el estudiar la influencia de otras variables importantes de las que puede depender el mantenimiento de las comunidades de HMA en diferentes poblaciones a estudiarse.

RECOMENDACIONES

Para realizar una tinción y observación exitosa de las estructuras de los HMA, hay que tener en cuenta el tipo de raíz con el que se va a trabajar, ya que en este caso pese a las modificaciones realizadas en el protocolo de tinción, en muchas muestras ésta se tornó muy débil debido al grosor de la raíz, dificultando el proceso de observación de algunas estructuras.

También todo este proceso, debe realizarse lo más pronto posible luego de la colecta del material, para así asegurar que las estructuras no se deterioren o en el caso de los arbuscúlos desaparezcan.

Todas las variables analizadas en este estudio se encuentran influyendo en el proceso de colonización de HMA, para una investigación más detallada, se deberían complementar análisis que involucren la temperatura y la humedad existente en las poblaciones, ya que son factores importantes para el desarrollo y supervivencia de los HMA.

Dentro de los análisis genéticos es importante mencionar que se deben hacer estudios más específicos sobre la diversidad genética de los HMA que se encuentran colonizando las raíces, ya que cada especie cumple una función diferente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, L.; Johnson, N. (2016). *Perspectives on Mycorrhizas and Soil Fertility*. 1st ed. N. Johnson, C. Gehring, and E. Jansa [eds.]. Elsevier.
- Adriano, M.; García, M.; Ovando, I.; De Gyves, M.; Figueroa, M. (2008). Dinámica de hongos micorrízicos arbusculares en el mango variedad Ataúlfo. *Quehacer Científico* 1: 25–31.
- Azcón-Aguilar, C.; Bago, B.; Barea, J. (1995). Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. En: Varma A, Hock B (eds) *Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer, Heidelberg, pp 391- 408.
- Cano-Santana, Z.; Castillo-Argüero, S.; Martínez-Orea, Y.; Juárez-Orozco, S. (2008). Análisis de la riqueza vegetal y el valor de conservación de tres áreas incorporadas a La Reserva Ecológica Del Pedregal De San Ángel, Distrito Federal (MÉXICO). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 82: 1–14.
- Cortes-Sarabia, J.; Pérez-Moreno, J.; Delgadillo, R.; Ferrera-Cerrato, Ballesteros-Patrón, G. (2008). ESTACIONALIDAD Y MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE *ILAMA* (*Annona Diversifolia* Saff.) EN HUERTOS NATURALES DEL TRÓPICO SECO. *Terra Latinoamericana*, 27: 27–34.
- Cuenca, G.; Cáceres, A.; Oirdobro, G.; Hasmy, Z.; Urdaneta, C. (2007). Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia* 32: 23–29.
- ECORAE. (2001). *Zonificación Ecológica y Económica de la provincia de Zamora Chichipe*.
- Fernandes, R.; Ferreira, D.; Saggin-Junior, O.; Stürmer, S.; Barbosa, H.; Siqueira, J.; Carbone, M. (2016). Occurrence and species richness of mycorrhizal fungi in soil under different land use. *Canadian Journal of Soil Science* 96: 271–280.
- Giovannetti, M.; Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489–500.
- Gobierno Autónomo Descentralizado Provincial de Zamora Chichipe. (2011). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Provincia de Zamora Chichipe*.
- Gobierno Provincial de Loja. (2011). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Provincia de Loja*.
- Guerrero, E.; Azcon, C. (1996). *Micorrizas: Recurso Biológico Del Suelo*. F. Columbia [ed.]. Cornell University.
- Herrera-corrales, L.; Ospina-alzate, D.; Ocampo-jiménez, O. (2014). Efecto de gremios de hongos micorrízicos arbusculares aislados de un ambiente desértico sobre el crecimiento de frijol *Phaseolus vulgaris* bajo una condición de déficit hídrico. 63–72.

- Hodge, A.; Storer, K. (2014). Arbuscular mycorrhiza and nitrogen: Implications for individual plants through to ecosystems. *Plant and Soil*, 386.
- Hoeksema, J. (2010). Ongoing coevolution in mycorrhizal interactions. *New Phytologist* 187: 286–300.
- Javot, H.; Penmetsa, R.; Terzaghi, N.; Cook, D.; Harrison, M. (2007). A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 1720.
- Johnson, D.; Cairney, J.; Anderson, I. (2012). Tansley review the importance of individuals: intraspecific diversity of mycorrhizal plants and fungi in ecosystems. 614–628.
- Kavanagh, K. (2005). *Fungi: Biology and Applications*. J. W. & Sons [ed.].
- Khanam, D.; Mridha, M.; Solaiman, A.; Hossain, T. (2006). Effect of edaphic factors on root colonization and spore population of arbuscular mycorrhizal fungi. 97–104.
- Lee, E.; Eo, J.; Ka, K.; Eom, A. (2013). Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Their Roles in Ecosystems. *Mycobiology* 41: 121–125.
- Lozano, P. (2010). Los tipos de bosque en el sur del Ecuador. *Ciencia hoy: Asociación Ciencia Hoy*, 29–49.
- Lurá, M.; González, A.; Basílico, J.; Sarsotti, P.; Gómez, R.; Freyre, L. (1997). *Introducción al estudio de la micología*. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.
- Misra, J.; Tewari, J.; Deshmukh, S.; Vágvölgyi, C. (Eds.). (2014). *Fungi from Different Substrates*. CRC Press. 3.
- Montaño, N.; Quiroz, V.; Cruz-Flores, G. (2001). COLONIZACION MICORRIZICA ARBUSCULAR Y FERTILIZACION MINERAL DE GENOTIPOS DE MAIZ Y TRIGO. *Arbuscular Mycorrhizal Colonization and Mineral Fertilization of Corn and Wheat Genotypes*. *Chapingo Terra* 19: 337–344.
- Montaño, N.; Camargo-Ricalde, S.; García-Sánchez, R. (2007). Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos. 63.
- Mueller, G. (2011). *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier. Foster, A. M. S. and Bills G. F. (eds.). Amsterdam.
- Muthukumar, T.; Sankari, D.; Tamil, A.; Sastry, T. (2014). Preparation, characterization, and in vitro bioactivity of *Bixa orellana* extract-impregnated collagen microspheres. *Journal of Materials Science*, 49: 5730–5737.
- Oliveira, J. (2005). Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.). 189.
- Öpik, M., Moora, M.; Liira, J.; Zobel, M. (2006). Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778–790.

- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza : the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6: 763–775.
- Perecin, M.; Bovi, O.; Maia, N. (2002). Pesquisa com plantas aromáticas, medicinais corantes: o papel do Instituto Agrônômico. *O Agrônômico* 54: 21–24.
- Peterson, R.; Massicotte, H.; Melville, L. (2004). *Mycorrhizas : Anatomy and Cell Biology*. Cavers, P. (ed.). Ontario, Canadá.
- Philips, J.; Hayman, D. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society* 55: 158–161.
- Saini, R.; Nile, S.; Park, S. (2015). Carotenoids from fruits and vegetables : Chemistry, analysis , occurrence , bioavailability and biological activities. *FRIN*, 76: 735–750.
- Schüßler, A.; Schwarzott D.; Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413–1421.
- Smith, F.; Smith, S. (1997). Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 137: 373–388.
- Smith, S.; Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Third Edit. ELSERVIER, London, UK.
- Souza, T. (2015). *Handbook of Arbuscular Mycorrhizal Fungi*. Springer.
- Spiteller, P. (2015). Chemical ecology of fungi. *Nat. Prod. Rep.* 32: 971–993.
- Trappe, J. (1994). What is a mycorrhiza? *Proceedings of the fourth European Symposium on mycorrhizae*. Granada, España. En: Johnson N.C., Graham J.H. y Smith F.A. (1997). Functioning of mycorrhizal association along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist*, 135: 575-585.
- Tropicos. (2017). *Bixa orellana* L. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/3800005>.
- Trouvelot, A.; Kough, J.; Gianinazzi-Pearson, V. (1986) *Mesure du taux de mycorhization VA d'un systeme radicaire. Recherche de methodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris.
- Van Der Heijden, M.; Horton, T. (2009). Socialism in soil the importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* 97: 1139–1150.
- Van der Heijden, M.; Klironomos, J.; Ursic, M.; Moutoglis, P.; Streitwolf-Engel, R.; Boller, T.; Wiemken, A. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396(6706), 69–72.
- Vera, A.; Vernal, G.; Carrera, G.; Salcedo, G. (2015). Evaluación de dinámica y eficiencia de las endomicorrizas nativas en el cultivo de tomate *Solanum lycopersicum*. X Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo.

Vilar, D.; Vilar, M.; Moura, T.; Raffin, F.; De Oliveira, M.; Franco, C.; De Athayde-Filho, P.; Barbosa, J. (2014). Traditional Uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa Orellana* L.: A review. *Scientific World Journal* 2014.

Wang, B.; Qiu, L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299–363.

Yang, H.; Zang, Y.; Yuan, Y.; Tang, J.; Chen, X. (2012). Selectivity by host plants affects the distribution of arbuscular mycorrhizal fungi: evidence from ITS rDNA sequence metadata. *BMC Evolutionary Biology* 12.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 4. Promedio del porcentaje de colonización de las 4 zonas muestreadas

Población	Individuo	Promedio de Colonización
Pit_Rom	B0_121	13,17
Pit_Rom	B0_122	21,85
Pit_Rom	B0_123	7,30
Pit_Rom	B0_124	25,70
Pit_Rom	B0_125	19,30
Pit_Rom	B0_126	31,65
Pit_Rom	B0_127	16,70
Pit_Rom	B0_128	5,80
Pit_Rom	B0_129	10,17
Pit_Rom	B0_130	17,35
Pit_Rom	B0_131	12,00
Pit_Rom	B0_132	1,35
Pit_Rom	B0_133	1,73
Pit_Rom	B0_134	19,43
Pit_Rom	B0_135	1,13
Pit_Rom	B0_136	11,43
Pit_Rom	B0_137	1,37
Pit_Rom	B0_138	5,80
Pit_Rom	B0_139	9,03
Pit_Rom	B0_140	18,50
Pit_Rom	B0_141	3,93
Pit_Rom	B0_142	5,60
Pit_Rom	B0_143	1,47
Pit_Rom	B0_144	2,77
Pit_Rom	B0_145	12,23
Pit_Rom	B0_146	13,17
Pit_Rom	B0_147	1,07
Pit_Rom	B0_148	16,40
Pit_Rom	B0_149	48,03
Pit_Rom	B0_150	21,50
Enc_Paq	B0_151	14,50
Enc_Paq	B0_152	6,90
Enc_Paq	B0_153	18,30
Enc_Paq	B0_154	22,83
Enc_Paq	B0_155	4,10
Enc_Paq	B0_156	15,37

Enc_Paq	B0_157	27,03
Enc_Paq	B0_158	8,20
Enc_Paq	B0_159	29,33
Enc_Paq	B0_160	18,47
Enc_Paq	B0_161	25,97
Enc_Paq	B0_162	5,93
Enc_Paq	B0_163	18,47
Enc_Paq	B0_164	37,90
Enc_Paq	B0_165	7,73
Enc_Paq	B0_166	20,13
Enc_Paq	B0_167	39,43
Enc_Paq	B0_168	44,20
Enc_Paq	B0_169	1,70
Enc_Paq	B0_170	33,37
Enc_Paq	B0_171	21,20
Enc_Paq	B0_172	3,13
Enc_Paq	B0_173	0,30
Enc_Paq	B0_174	19,90
Enc_Paq	B0_175	1,40
Enc_Paq	B0_176	19,97
Enc_Paq	B0_177	21,80
Enc_Paq	B0_178	0,35
Enc_Paq	B0_179	2,07
Enc_Paq	B0_180	7,23
L_Guerrero	B0_181	3,40
L_Guerrero	B0_182	5,57
L_Guerrero	B0_183	1,63
L_Guerrero	B0_184	10,10
L_Guerrero	B0_185	16,77
L_Guerrero	B0_186	14,40
L_Guerrero	B0_187	8,23
L_Guerrero	B0_188	5,50
L_Guerrero	B0_189	4,63
L_Guerrero	B0_190	2,57
L_Guerrero	B0_191	17,93
L_Guerrero	B0_192	2,23
L_Guerrero	B0_193	0,23
L_Guerrero	B0_194	1,05
L_Guerrero	B0_195	1,73
L_Guerrero	B0_196	3,65
L_Guerrero	B0_197	3,15

L_Guerrero	B0_198	4,57
L_Guerrero	B0_199	10,75
L_Guerrero	B0_200	0,73
L_Guerrero	B0_201	7,57
L_Guerrero	B0_202	6,80
L_Guerrero	B0_203	10,57
L_Guerrero	B0_204	17,67
L_Guerrero	B0_205	4,77
L_Guerrero	B0_206	39,00
L_Guerrero	B0_207	20,25
L_Guerrero	B0_208	14,60
L_Guerrero	B0_209	10,57
L_Guerrero	B0_210	11,20
Mac_Mand	B0_221	32,07
Mac_Mand	B0_222	6,80
Mac_Mand	B0_223	24,67
Mac_Mand	B0_224	7,17
Mac_Mand	B0_225	8,20
Mac_Mand	B0_226	48,03
Mac_Mand	B0_227	6,17
Mac_Mand	B0_228	38,67
Mac_Mand	B0_229	12,50
Mac_Mand	B0_230	13,50
Mac_Mand	B0_231	12,17
Mac_Mand	B0_232	28,83
Mac_Mand	B0_233	15,50
Mac_Mand	B0_234	6,83
Mac_Mand	B0_235	12,00
Mac_Mand	B0_236	12,00
Mac_Mand	B0_237	0,25
Mac_Mand	B0_238	0,60
Mac_Mand	B0_239	5,87
Mac_Mand	B0_240	4,17
Mac_Mand	B0_241	4,00
Mac_Mand	B0_242	6,50
Mac_Mand	B0_243	13,50
Mac_Mand	B0_244	17,83
Mac_Mand	B0_245	9,67
Mac_Mand	B0_246	20,50
Mac_Mand	B0_247	31,50
Mac_Mand	B0_248	6,20

Mac_Mand	B0_249	36,83
Mac_Mand	B0_250	7,83

Fuente: Autor

ANEXO 2

Tabla 5. Datos de Diversidad genética de las hojas de *Bixa orellana*

Código de la muestra	Población	Genotipo	Nro de individuos en cada genotipo	Código del genotipo
BO-121	Pit-Rom	231231156156184184210210164164222222193193253256176176g	0	H
BO-122	Pit-Rom	231231156156184184210210164164222222193193253256176176g	0	H
BO-123	Pit-Rom	231231184184184184210210164164214214193193253256174174g	1	76
BO-124	Pit-Rom	231231156156184184210210164164214214193193253256174174g	1	53
BO-125	Pit-Rom	231231156156184184188188164164222222178193253253176176g	1	47
BO-126	Pit-Rom	231231156156184184188210164164222222178193253256176176g	1	50
BO-127	Pit-Rom	231231156156184184210210164164208222178178256256176176g	1	51
BO-128	Pit-Rom	231231156156184184188188164164222222178178256256176176g	1	46
BO-129	Pit-Rom	231231156156184184210210164164222222193193256256176176g	0	I
BO-130	Pit-Rom	231231156156184184210210164164222222193193253256176176g	0	H
BO-131	Pit-Rom	231231156156184184210210164164222222193193253256176176g	0	H
BO-132	Pit-Rom	231231156156184184210210164164208214193193256256176176g	0	F
BO-133	Pit-Rom	231231156156176184210210180180214222178178256256176176g	1	40
BO-134	Pit-Rom	231231156156176176210210164180214222178193253256176176g	1	31
BO-135	Pit-Rom	231231156156184184210210164164214222193193256256176176g	1	55
BO-136	Pit-Rom	231231156156176188210218164180208222178193256256174174g	1	42
BO-137	Pit-Rom	231231156156176176210210164180208214178193256256176176g	1	29
BO-138	Pit-Rom	231231156156176184188210164164214214193193256256174174g	1	33
BO-139	Pit-Rom	231231156156176176210210180180214222178193253256176176g	1	32
BO-140	Pit-Rom	231231156156176184210210180180222222178193253256174174g	1	41

BO-141	Pit-Rom	231231156156184184210210164164222222193193253256176176g	0	H	
BO-142	Pit-Rom	231231156156184184210210164164222222193193253256176176g	0	H	
BO-143	Pit-Rom	231231156156184184210210164164222222193193253256176176g	0	H	
BO-144	Pit-Rom	231231156156184184210210164164222222193193253256176176g	0	H	
BO-145	Pit-Rom	231231156156184184210210164164222222193193253256176176g	0	H	
BO-146	Pit-Rom	231231156156184184210210164180222222178193253256176176g	1		57
BO-147	Pit-Rom	231231156156184188210210164180222222193193253256176176g	1		61
BO-148	Pit-Rom	231231156156176184210210164180208222178193256256176176g	1		38
BO-149	Pit-Rom	231231156156176184210210164180214222178193256256174174g	1		39
BO-150	Pit-Rom	231231156156176176210210164180214222178193253253174174g	1		30
BO-151	Enc_Paq	231231156156184184210210164164222222193193253253176176g	1		56
BO-152	Enc_Paq	231231156156184184210210164164222222193193253256176176g	10	H	
BO-153	Enc_Paq	231231156156176176210210164164208222193193256256176176g	1		25
BO-154	Enc_Paq	227231156184176188210210164164222222193193253256174174g	1		19
BO-155	Enc_Paq	231231156194176176210210164164222222193193256256176176g	1		69
BO-156	Enc_Paq	231231156194176184210210164164222222193193256256176176g	1		70
BO-157	Enc_Paq	231231156184184184210210164180222222178193253256174174g	1		67
BO-158	Enc_Paq	231231156156184184210210164164214222193193256256172172g	1		54
BO-159	Enc_Paq	231231156156176184210210164164214222193193256256172172g	1		37
BO-160	Enc_Paq	231231156156184184210210164164208222193193253256176176g	1		52
BO-161	Enc_Paq	231231156156184184210210164164208222193193256256176176g	0	G	
BO-162	Enc_Paq	231231156156184184210210164164208222193193256256176176g	2	G	
BO-163	Enc_Paq	231231156156184184210210164164208214193193256256176176g	2	F	
BO-164	Enc_Paq	227227156156184184210210164164222222193193253256176176g	0	A	
BO-165	Enc_Paq	231231156156176184210210164164208214193193256256176176g	1		35
BO-166	Enc_Paq	227231156166176182210210164164222222193193256256174176g	1		16

BO-167	Enc_Paq	231231156156176176210210164164214222193193256256176176g	1	26
BO-168	Enc_Paq	231231156156176184210210164164208222193193253256176176g	1	36
BO-169	Enc_Paq	231231166166176176210210164164222222193193256256174174g	1	73
BO-170	Enc_Paq	231231156156176176210210164164222222193193253256176176g	1	28
BO-171	Enc_Paq	231231156156176184188210164164214222193193256256176176g	1	34
BO-172	Enc_Paq	231231156156184184188210164164214214193193253256176176g	1	49
BO-173	Enc_Paq	231231156184184188210210164180222222178193256256176176g	1	68
BO-174	Enc_Paq	231231156156188188210210164164208222178178253256176176g	1	62
BO-175	Enc_Paq	231231156156188188210210164180208222178193253256176176g	1	63
BO-176	Enc_Paq	231231156156184188210210164180222222178178256256176176g	1	60
BO-177	Enc_Paq	231231156156176176210210164164222222193193253256174174g	1	27
BO-178	Enc_Paq	231231156156184184210210164164222222193193256256176176g	2	I
BO-179	Enc_Paq	231231156156176176210210164164208214193193253253176176g	1	24
BO-180	Enc_Paq	231231156194184190188218164164222222193193253256176176g	1	71
BO-181	Lauro Guerrero	227231156156184184190190164164222222193193256256176176g	1	13
BO-182	Lauro Guerrero	227231156166184184210218164164214222193193253256174176g	1	18
BO-183	Lauro Guerrero	227231156156172184210210164164214222193193253256176176g	1	12
BO-184	Lauro Guerrero	227227156156184184210210164164222222193193253256176176g	0	A
BO-185	Lauro Guerrero	227227154154184184188210164164214222193193253256176176g	1	1
BO-186	Lauro Guerrero	227227154154184184210210164164222222193193256256176176g	1	2
BO-187	Lauro Guerrero	227227156156184184210210164164222222193193253256176176g	0	A
BO-188	Lauro Guerrero	227227166166184184218218164164214214193193253256174174g	1	8
BO-189	Lauro Guerrero	227231156166184184188218164164214214193193253256174174g	1	17
BO-190	Lauro Guerrero	227231154156184184188218164164214222193193253253176176g	1	9
BO-191	Lauro Guerrero	231231156166184184188210166166214222193193253256176176g	1	66
BO-192	Lauro Guerrero	227231156156172184188210164164214222193193253253176176g	1	11

BO-193	Lauro Guerrero	227227156156184184188210164164208214193193253256176176g	1	3
BO-194	Lauro Guerrero	227231156156172184188210164164214214193193253256176176g	1	10
BO-195	Lauro Guerrero	231231156166172184188210164164214222193193256256176176g	1	65
BO-196	Lauro Guerrero	231231156156172184188188166166214214193193253256176176g	1	23
BO-197	Lauro Guerrero	231231156166172172188188166166214214193193253256176176g	1	64
BO-198	Lauro Guerrero	231231156156172172188210166166214222193193253256176176g	0	E
BO-199	Lauro Guerrero	231231156156172172188210166166214222193193253256176176g	2	E
BO-200	Lauro Guerrero	231231156156184184188188166166214214193193256256174174g	1	48
BO-201	Lauro Guerrero	231231154156172184188210164164214222193193253256174174g	1	20
BO-202	Lauro Guerrero	231231156156172172188188166166214214193193253256176176g	0	D
BO-203	Lauro Guerrero	231231156156172172188188166166214214193193253253176176g	1	22
BO-204	Lauro Guerrero	231231156156172172188188166166214214193193253256176176g	2	D
BO-205	Lauro Guerrero	231231166166172184188210164164222222193193253256176176g	1	72
BO-206	Lauro Guerrero	227231156156184184210218164164214214193193253256176176g	1	15
BO-207	Lauro Guerrero	231231156156184184218218166166214214193193253256176176g	1	59
BO-208	Lauro Guerrero	227231156156184184210210164164222222193193253256176176g	1	14
BO-209	Lauro Guerrero	231231154156184184218218164164222222193193253256176176g	1	21
BO-210	Lauro Guerrero	231231156156184184218218164164222222193193253256176176g	1	58
BO-221	Macará	231231166166184184218218164164214222193193253256176176g	1	74
BO-222	Macará	231231166196184184218218164164214214193193253256174174g	1	75
BO-223	Macará	231231186186184184188188166166214214193193253256176176g	0	K
BO-224	Macará	231231186186184184188188166166214214193193253256176176g	2	K
BO-225	Macará	231231186186184184218218166166214222193193253253176176g	1	79
BO-226	Macará	231231186186184184218218166166222222193193256256176176g	1	80
BO-227	Macará	231231184186184184188188166166214214193193253256176176g	0	J
BO-228	Macará	231231184186184184188188166166214214193193253256176176g	2	J

BO-229	Macará	231231186186184184188188166166214214193193156156176176g	1	78
BO-230	Macará	231231184186184184188188164164214214193193253256176176g	1	77
BO-231	Macará	231231196198182182188188166166214214193193256256176176g	0	L
BO-232	Macará	231231196198182182188188166166214214193193253256176176g	1	82
BO-233	Macará	231231196198182182188188166166214214193193256256176176g	2	L
BO-234	Macará	231231156156182182188188166166214214193193253256176176g	1	43
BO-235	Macará	231231196198182182188188166166214214193193253253176176g	1	81
BO-236	Macará	231231156156182182188188166166214214193193256256176176g	1	44
BO-237	Macará	227227156156184184210218164164222222193193253256176176g	0	C
BO-238	Macará	227227156156184184210210164164222222193193253256176176g	0	A
BO-239	Macará	227227156156184184210210164164222222193193253253176176g	1	5
BO-240	Macará	227227156156184184210210164164222222193193256256176176g	0	B
BO-241	Macará	227227156156184184210210164164222222193193253256176176g	5	A
BO-242	Macará	227227156156184184210218164164222222193193253256176176g	0	C
BO-243	Macará	227227156156184184218218164164222222193193253256176176g	1	7
BO-244	Macará	227227156156184184210218164164222222193193253256176176g	3	C
BO-245	Macará	227227156156184184210210164164222222193193256256176176g	2	B
BO-246	Macará	227227156156184184210210164164214222193193253256176176g	1	4
BO-247	Macará	227227156156184184210218164164214222193193253256176176g	1	6
BO-248	Macará	231231156156182184188218164164214214193193253256176176g	1	45
BO-249	Macará	231231196198184184188188164166214214193193253256176176g	0	M
BO-250	Macará	231231196198184184188188164166214214193193253256176176g	2	M

Fuente: Cueva & Arias (Departamento de Ciencias Naturales).

ANEXO 3

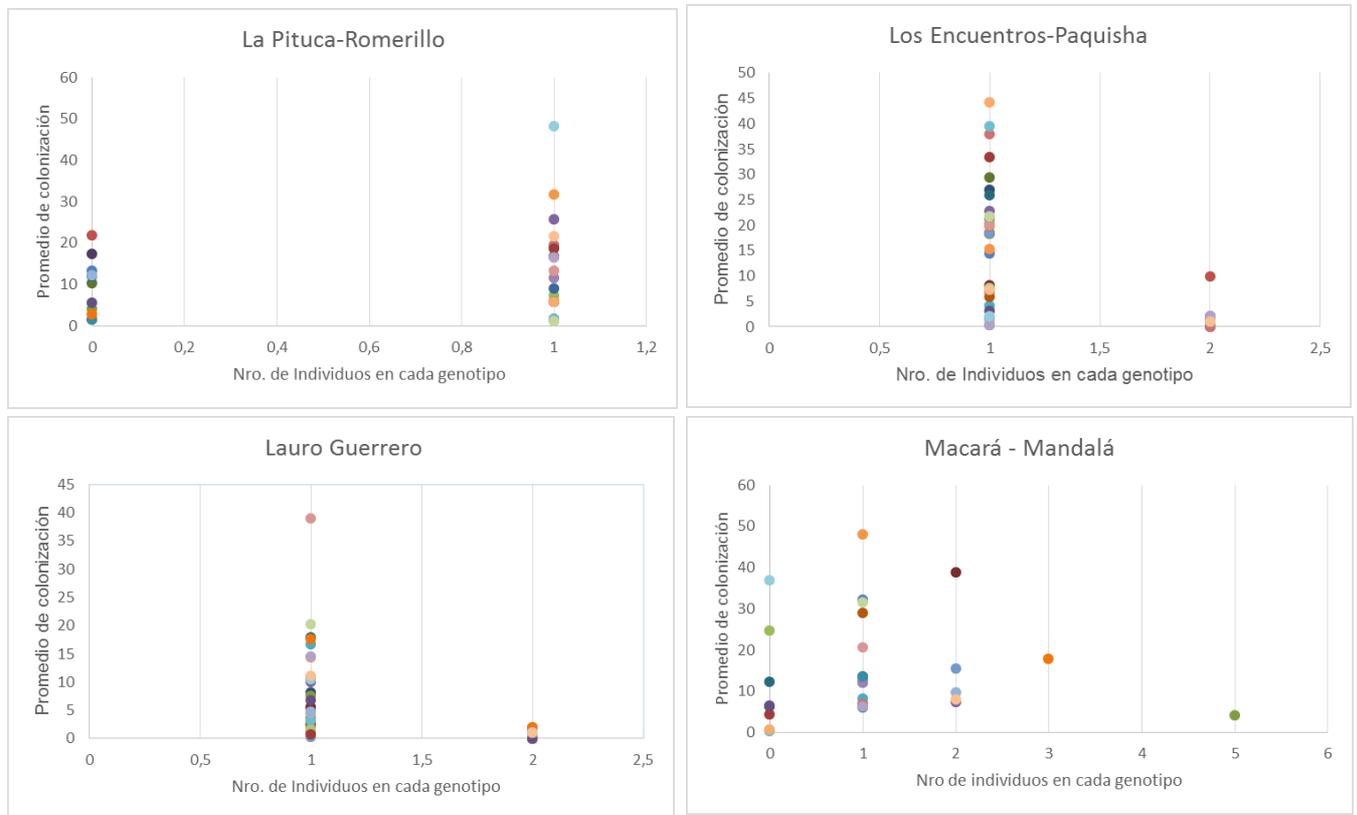


Figura 6. Correlaciones del porcentaje de colonización y diversidad genética, realizadas en las 4 zonas muestreadas.