



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

**Evaluación de la colonización de hongos micorrízicos arbusculares de
*Gynoxys verrucosa***

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Acaro Jaramillo, Karla Jadhira

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

Ing.

Hernán Patricio Lucero Mosquera

DOCENTE DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación, “Evaluación de la colonización de hongos micorrízicos arbusculares de *Gynoxys verrucosa*” realizado por Acaro Jaramillo Karla Jadhira; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Marzo del 2017

.....

Ing. Lucero Mosquera Hernán Patricio

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Karla Jadhira Acaro Jaramillo declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Evaluación de la colonización de hongos micorrízicos arbusculares de *Gynoxys verrucosa*, de la Titulación de Biología, siendo el Ing. Hernán Patricio Lucero Mosquera director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja 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 que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

.....

Acaro Jaramillo Karla Jadhira

1105906547

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación quiero dedicarle a Dios primero ya que Él ha sido el que me dado las fuerzas y la sabiduría para cada día poder desarrollar este trabajo de la mejor manera, puesto que así lo menciona en Proverbios 3, 5:6 “Confía en el Señor con todo tu corazón, no dependas de tu propio entendimiento. Busca su voluntad en todo lo que hagas y él te mostrará cual camino tomar”.

También quisiera que esta meta alcanzada pueda ser un regalo especial para mi Madre hermosa Jacqueline Jaramillo quien fue una mujer luchadora del cáncer que batallo hasta el final, sin embargo de forma temprana partió al descanso eterno con el Padre celestial. Pero que sin duda nada de este sueño hubiera podido culminarse sin sus consejos, amor y paciencia ya que me enseñó a ser una mujer con valores, principios y sobretodo perseverancia y servicio a los demás.

A mi padre Salas Acaro, hermana gemela Paola Acaro y hermanito Camilo también les brindo este triunfo ya que con su apoyo me impulsaron a no desmayar en los momentos difíciles para continuar con mis estudios.

Karla Jadhira Acaro Jaramillo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Técnica Particular de Loja por facilitarme el acceso a las instalaciones de la misma, para llevar a cabo el trabajo de investigación.

Toda mi gratitud a mi estimado director de tesis Ing. Hernán Lucero, quien me facilitó y puso a mi disposición todos los materiales requeridos para desarrollar este trabajo y además me brindó su apoyo moral y profesional.

También mi reconocimiento a la Titulación de Biología por brindarme los conocimientos necesarios para formarme como profesional.

Mi gratitud a la Dra. Augusta Cueva y al Ing. Paul Loján quienes me impartieron sus conocimientos para tener un mejor desempeño en el desarrollo del trabajo.

Por último agradezco a mis padres Jacqueline Jaramillo y Salas Acaro, hermanos Paola y Camilo Acaro, abuelitos Emiliana y Jorge Jaramillo, Ulfrida y Polibio Acaro, tíos, primos y amigos que estuvieron apoyándome tanto moral como económicamente para poder terminar con mis estudios

Karla Jadhira Acaro Jaramillo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	I
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	2
CAPITULO I.....	5
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)	6
1.1.1 Historia.	6
1.1.2 Mecanismo de colonización de HMA.	6
1.1.3 Morfología de HMA.	6
1.1.4 Taxonomía HMA.....	8
1.1.5 Importancia HMA.....	9
1.2 Generalidades del género <i>Gynoxys</i>	9
1.2.1 Descripción del género.....	9
1.2.2 Descripción de <i>Gynoxys verrucosa</i>	9
1.3 Estudios.....	10
1.3.1 Colonización de HMA en el género Asteracea.	10
1.4 Objetivos	11
1.4.1 Objetivo General.....	11
1.4.2 Objetivos Específicos.....	11
CAPÍTULO II	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1 Área de estudio	13
2.1.1 Villonaco.	13
2.1.2 Celica.....	13

2.1.3 Yangana.....	14
2.1.4 Las Juntas.	14
2.2 Muestreo y tratamiento de muestras	14
2.2 Determinación de Porcentaje de Colonización	15
2.3 Estado fenológico	16
2.4 Tipos de suelo	17
2.5 Análisis estadístico	18
CAPÍTULO III	19
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
3.1 Porcentaje de colonización	20
3.1.1 Porcentaje de colonización – poblaciones.	21
3.1.2 Porcentaje de colonización - estado fenológico.	22
3.1.3 Porcentaje de colonización - Tipos de suelo.....	23
CONCLUSIONES.....	24
RECOMENDACIONES.....	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ANEXOS.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de los Hongos Micorrízicos arbusculares	8
Figura 2. <i>Gynoxys verrucosa</i> \	10
Figura 3. Villonaco	13
Figura 4. Celica.....	13
Figura 5. Yangana	14
Figura 6. Pasos previos a la tinción.....	15
Figura 7. Categorías según el porcentaje de colonización de micorrizas	16
Figura 8. Estados fenológicos de la especie <i>G. verrucosa</i> : a) Vegetación b) Floración c) Postfloración	17
Figura 9. Estructuras características de micorrizas arbusculares que colonizan las raíces de <i>Gynoxys verrucosa</i> : a) Vesículas; b) hifas fúngica	20
Figura 10. Análisis del porcentaje de colonización que existe en cada población de estudio	21
Figura 11. Relación del porcentaje de colonización con respecto al estado de colonización de la especie <i>Gynoxys verrucosa</i>	23
Figura 12. Relación entre el porcentaje de colonización y el tipo suelo de las poblaciones de estudio	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de HMA.....	8
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Gynoxys verrucosa</i>	10
Tabla 3. Estados fenológicos de la especie <i>G. verrucosa</i> de cada localidad	17
Tabla 4. Tipos de suelo que se definieron previamente en cada localidad	17

RESUMEN

La asociación simbiótica entre las raíces de la mayoría de las plantas terrestres y hongos del Phylum Glomeromycota se conoce como hongos micorrízicos arbusculares (HMA), estos incrementan la captación de nutrientes en las plantas y les brindan protección contra patógenos del suelo. Debido a su importancia es necesario determinar la presencia de estos hongos en las raíces de *G. verrucosa*, que ha sido estudiada por contener metabolitos secundarios de potencial interés biomédico

Se determinó la presencia de HMA en las raíces de *G. verrucosa* en cuatro localidades del Sur del Ecuador. Los porcentajes de colonización se relacionaron con cada población, estado fenológico de las plantas y tipo de suelo. Las raíces fueron teñidas y observadas al microscopio para constatar la presencia de las estructuras características de los HMA. Para el porcentaje de colonización se utilizó el método propuesto por Trouvelot. El análisis de los resultados de colonización mostró diferencias significativas ($P=0.05$) entre las poblaciones. También se hallaron diferencias en cuanto al estado fenológico ($P=0.05$) y al tipo de suelo ($P=0.05$), sugiriendo que en condiciones naturales las plantas están colonizadas por HMA.

Palabras Claves: Hongos micorrizicos arbusculares (HAM), *Gynoxys verrucosa*, Porcentaje de colonización

ABSTRACT

The symbiotic association between the roots of most terrestrial plants and fungi of Phylum Glomeromycota are known as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which increase the uptake of nutrients in plants and protect them against the attack of soil pathogens. Due to its importance it is necessary to determine the presence of these fungi in the roots of *G. verrucosa*, which has been studied for containing secondary metabolites with potential interest in biomedics.

The presence of AMF in the roots of *G. verrucosa* was determined in four localities the South of Ecuador. The percentages of colonization were related to each population, phenological state of the plants and soil type. The roots were stained and observed under a microscope to verify the presence of the characteristic structures of AMF. For the percentage of colonization the method was used Trouvelot. The analysis of colonization results showed significant differences ($P = 0.05$) among populations. Differences were found in phenological status ($P = 0.05$) and soil type ($P = 0.05$), suggesting that under natural conditions the plants are colonized by AMF.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), *Gynoxys verrucosa*, Percentage of colonization

INTRODUCCIÓN

La presente investigación “Evaluación de la colonización de hongos micorrízicos arbusculares de *Gynoxys verrucosa*” consistió en evaluar la colonización de Hongos micorrízicos arbusculares en las raíces de la especie *G. verrucosa*, planta de gran interés biomédico debido a que contiene metabolitos (leucodina y la dehidroleucodina) que presentan actividad antimicrobiana (Ordoñez et al., 2011). Las micorrizas arbusculares (MA), resultan de la asociación beneficiosa entre las raíces de plantas terrestres y hongos del phylum Glomeromycota, estos hongos mejoran la nutrición de la planta hospedadora y además le brindan protección contra patógenos, stress abiótico como sequía y salinidad entre otros.

Este trabajo se divide en tres capítulos. El primer capítulo contiene el marco teórico en el que se encuentra las bases teóricas de esta investigación que se dividen en tres apartados Hongos micorrizicos arbusculares: historia, mecanismo de colonización, morfología, taxonomía e importancia. Género *Gynoxys*: Generalidades. *Gynoxys verrucosa*: Descripción, taxonomía, estudios y así mismo en este capítulo se describen el objetivo general y los objetivos específicos. En el segundo capítulo se encuentran los materiales y métodos en el que se utilizaron raíces que fueron colectadas de cuatro localidades, las mismas que fueron teñidas para observar en el microscopio las estructuras características de los hongos micorrízicos arbusculares y se utilizó el método (Trouvelot et al., 1986) que asigna categorías de 0 a 5 a cada raíz para determinar el porcentaje de colonización. En el tercer capítulo se describe los resultados y discusión que nos permitieron responder a los objetivos planteados e interpretar los resultados con el marco conceptual de otras investigaciones.

Debido a la falta de estudios que indiquen el porcentaje de colonización de los hongos micorrízicos en las raíces de la especie *G. verrucosa*, se planteó este estudio en el que se encontró que las raíces si estaban colonizadas por hongos micorrizicos arbusculares de cuatro poblaciones de *G. verrucosa*, siendo las poblaciones de Villonaco y Cética las que presentaron la mayor colonización de micorrizas en esta especie. Esta investigación es relevante debido a que aporta con información sobre la colonización de HMA en las raíces de *G. verrucosa* que podrá ser relacionada con otros estudios que se están desarrollando con esta especie que pertenecen al proyecto macro desarrollado por el departamento de Química y el departamento de Ciencias Naturales de la Universidad.

Todos los objetivos planteados se cumplieron a cabalidad ya que pudimos determinar el porcentaje de colonización de HMA en la raíces de *G. verrucosa* de las cuatro poblaciones de estudio y asimismo se estableció en que población hay mayor colonización. Además se logró determinar la relación entre los porcentajes de colonización y el estado fenológico de la planta y con el tipo de suelo.

A través de esta investigación se pudo adquirir mayor experiencia en cuanto al trabajo en laboratorio y también participar en congresos de divulgación científica ya que se pudo exponer este trabajo en el congreso "XL JORNADAS NACIONALES DE BIOLOGÍA" desarrollado en la Universidad de Guayaquil ESPOL en un evento en el que se exponen investigaciones que se llevan a cabo a nivel nacional. No se presentaron inconvenientes durante el desarrollo del presente trabajo.

Se colectaron previamente 120 muestras de raíces de *G. verrucosa* en cuatro diferentes localidades de la provincia de Loja: Villonaco, Celica, Yangana y Las Juntas. Se tiñeron raicillas mediante el protocolo modificado de tinción de raíces Philips y Hayman (1970). Se determinó el porcentaje de colonización, utilizando el método (Trouvelot et al., 1986) que asigna categorías de 0 a 5 a cada raíz y finalmente se utilizó el software estadístico Prism versión 5, en el que se un análisis de Kruskal Wallis no paramétrico, todos estos métodos nos permitieron responder a los objetivos planteados.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

Son hongos del suelo que para completar su ciclo vital forman una asociación mutualista obligada con las raíces de la mayoría de las plantas Harley & Smith, (1983), mejorando la absorción de agua y nutrientes de la raíz (Pereira et al., 1999; Prieto-Benavides et al., 2012). La asociación simbiótica entre los HMA y las raíces de las plantas se denomina micorriza.

1.1.1 Historia.

Las micorrizas tienen la misma antigüedad que las plantas, aproximadamente 400 millones de años desde su aparición Remy et al., (1994). Se especula que la asociación micorrízica jugó un papel fundamental en el paso de las plantas de ecosistemas acuáticos a ecosistemas terrestres lo que explica que hoy en día estos hongos se encuentren asociados a cerca del 95% de las plantas terrestres (Miransaria et al., 2009).

En un inicio, se consideraba que todos los hongos asociados a las raíces de las plantas no eran favorables sino más bien se los consideraba como parásitos, más tarde se descubrió el rol benéfico de estos organismos en la raíz de la planta. Etimológicamente el término micorriza se deriva de dos voces griegas: myko=hongo y rhiza=raíz (Andrade-torres, 2010). Actualmente se conoce que estos organismos son asociaciones en las que las hifas fúngicas penetran las células corticales de la raíz o pueden encontrarse intercelularmente en las raíces de la planta (Camargo-Ricalde et al., 2012).

1.1.2 Mecanismo de colonización de HMA.

El mecanismo de colonización en las micorrizas arbusculares (HMA) se produce a partir de hifas que proceden de los propágulos que se encuentran en el suelo (ej. esporas y raíces colonizadas), luego la hifa entra en contacto con la superficie de la células epidérmicas de la raíz, formando un apresorio. Esta hifa atravesará el espacio intercelular para formar distintas estructuras como vesículas y esporas (León, 2006). Los arbusculos son las estructuras características de esta asociación y se forman al atravesar la pared celular y posterior invaginación de la membrana plasmática.

1.1.3 Morfología de HMA.

Las estructuras características de las micorrizas arbusculares se describen a continuación (Figura 1).

1.1.3.1 Hifas.

Son filamentos constitutivos del micelio de un hongo y pueden presentarse en el interior o entre las células de la raíz, facilitando la adquisición de elementos esenciales, principalmente los de baja movilidad como Fósforo, Potasio, Cobre y Zinc (Borie et al., 2000).

1.1.3.2 Esporas.

Se forman a partir de la inflamación de las hifas en el suelo o en las raíces, generalmente se constituyen por paredes resistentes que le permiten sobrevivir en el suelo por varios años (Pérez & Peroza, 2013)

1.1.3.3 Arbúsculos.

Se forman a través de numerosas ramificaciones dicotómicas repetidas de una hifa. Estos desempeñan un papel clave en la asociación simbiótica ya que a través de ello se produce el intercambio de nutrientes entre las células de la planta y el hongo (Filho et al., 1994).

1.1.3.4 Vesículas.

Son expansiones de una hifa de forma ovalada y tienen la función de reservar lípidos. En condiciones de estrés los lípidos son usados y las vesículas se degradan (Filho et al., 1994).

1.1.3.4 Células Auxiliares.

Se producen únicamente en ciertos géneros de HMA (*Scutellospora* and *Gigaspora*) y se forman a partir de hifas extraradicales gruesas, alrededor de las raíces, son abundantes cuando la colonización es temprana y disminuyen cuando aumenta la esporulación (INVAM, 2006)

1.1.3.5 Apresorio

Se originan cuando un propágulo germinado de HMA (espora, fragmento de raíz colonizada) hace contacto con células epidérmicas de la raíz de una planta hospedera. Se produce un hinchamiento de la hifa (apresorio) el cual ejerce presión sobre las células corticales de la raíz ayudando al hongo a penetrarla (García-Garrido & Ocampo, 2002).

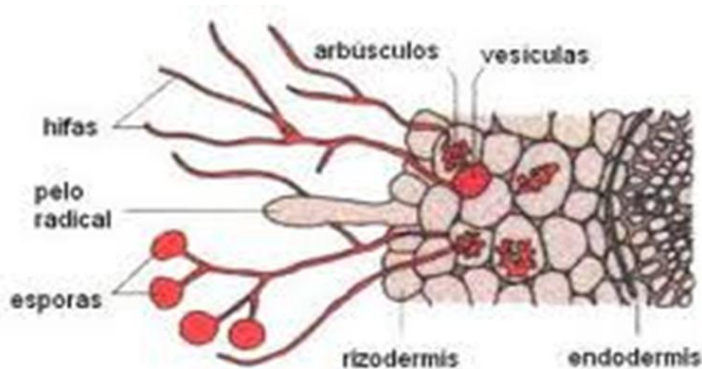


Figura 1. Morfología de los Hongos Micorrízicos arbusculares
Fuente: <http://www.cogollosdeloeste.com.ar/cws/codeloweb/article/13>
Elaboración: Guerra, 2013

1.1.4 Taxonomía HMA.

Según Redecker et al., (2013) los HMA pertenecen al Filo Glomeromycota, la clase Glomeromycetes y se clasifican en 4 órdenes, 11 familias y 25 géneros (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de HMA

DOMINIO	Eukarya	
REINO	Fungi	
FILO	Glomeromycota	
CLASE	Glomeromycetes	
ORDEN	FAMILIA	Género
<i>Diversisporales</i>	<i>Diversisporaceae</i>	<i>Tricispora</i> <i>Otospora</i> <i>Diversispora</i> <i>Corymbiglomus</i> <i>Redeckera</i>
	<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>
	<i>Sacculosporaceae</i>	<i>Sacculospora</i>
	<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i>
	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Scutellospora</i> <i>Gigaspora</i> <i>Intraornatospora</i> <i>Paradentiscutata</i> <i>Dentiscutata</i> <i>Cetraspora</i> <i>Racocetra</i>
<i>Glomerales</i>	<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglomus</i>
	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i> <i>Funneliformis</i> <i>Septoglomus</i> <i>Rhizophagus</i> <i>Sclerocystis</i>
<i>Archeosporales</i>	<i>Ambisporaceae</i>	<i>Ambispora</i>
	<i>Geosiphonaceae</i>	<i>Geosiphon</i>
	<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeospora</i>
<i>Paraglomerales</i>	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>

Fuente: (Redecker et al., 2013)
Elaboración: Adaptación propia

1.1.5 Importancia HMA.

Su importancia es tanto ecológica como económica debido a que ayudan al desarrollo de las plantas, producción de frutos Schüßler et al., (2001), mejoran la absorción nitrógeno, producción de semillas, resistencia a patógenos, estabilidad edáfica y crecimiento vegetal (Garzón, 2015). Finalmente se ha encontrado que las micorrizas mejoran la absorción del fosforo, debido a que las plantas requieren este nutriente en grandes cantidades y en la solución del suelo se encuentra en bajas concentraciones (Yong-Guan et al., 2003). Se conoce que los hongos micorrizicos mejoran la estructura del suelo, incrementando en las plantas la resistencia a la sequía (Jiménez, 2009). Además ayudan en el incremento de agregados entre las partículas del suelo (Smith & Read, 2008).

1.2 Generalidades del género *Gynoxys*

1.2.1 Descripción del género.

El género *Gynoxys* pertenece a la familia de las Asteráceas y está constituido por 60 especies que se encuentran distribuidas desde América central hasta Perú, se caracterizan por ser árboles o arbustos que habitan en bosques nublados en las partes altas de los Andes o páramos (Universidad de los Andes, 2001). Se han encontrado en el Ecuador poblaciones de este género en la ceja Andina hasta los 4400 msnm. en una gran variedad de suelos (Ordóñez et al., 2001). Son utilizadas para obtener leña y carbón de buena calidad y las ramas gruesas se usan para la elaboración de chozas, mientras que las ramas delgadas para hacer cercos (Ordóñez et al., 2001).

1.2.2 Descripción de *Gynoxys verrucosa*.

Gynoxys verrucosa es un arbusto perteneciente a la tribu Senecionea de la familia Asteraceae. Es conocido comúnmente como guangalo y las partes aéreas de esta planta, son usadas en medicina tradicional en el sur de Ecuador para el tratamiento de infecciones de la piel y cicatrización de heridas, está siendo estudiada por su interés biomédico debido a que contiene metabolitos como la leucodina y la dehidroleucodina que presentan actividad antimicrobiana (Ordóñez et al., 2011).

Esta especie tiene reproducción sexual y asexual por semillas y estacas respectivamente (Benenaula, 2007), el tiempo de florecimiento y maduración de los frutos es de aproximadamente dos meses, aunque se puede encontrar floreciendo y fructificando todo el año (Brandbyge, 1991).

1.2.2.1 Taxonomía de *Gynoxys verrucosa*.

La taxonomía de esta especie se observa en el siguiente cuadro (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Gynoxys verrucosa*

Clase	<i>Equisetopsida</i>
Subclase	<i>Magnoliidae</i>
Superorden	<i>Asteranae</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Género	<i>Gynoxys</i>
Especie	<i>Gynoxys verrucosa</i>

Fuente: Trópicos.org

Elaborado: Weddell & Hugh, 1856



Figura 2. *Gynoxys verrucosa*

Fuente: Lucero, 2016

1.3 Estudios

1.3.1 Colonización de HMA en el género Asteracea.

Se reporta la colonización micorrízica arbuscular en cinco especies de Asteracea de las Sabanas en Cuba, todas las especies analizadas presentan una alta tasa de colonización 60% (Rodríguez et al., 2013).

Sin embargo actualmente no hay estudios que indiquen el porcentaje de colonización de los hongos micorrízicos en las raíces de la especie *Gynoxys verrucosa*, ni tampoco el papel que están desempeñando.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General.

Estudiar la colonización de hongos micorrízicos arbusculares en la especie *Gynoxys verrucosa*

1.4.2 Objetivos Específicos.

Establecer el porcentaje de colonización de hongos micorrízicos arbusculares en cuatro poblaciones de *G. verrucosa* del sur del Ecuador.

Determinar en qué población existe mayor porcentaje de colonización de hongos micorrízicos arbusculares.

Relacionar los porcentajes de colonización de con el estado fenológico de *G. verrucosa* y el tipo de suelo.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

Previamente se colectó las raíces de *G. verrucosa* en cuatro localidades que se describen a continuación:

2.1.1 Villonaco.

El muestreo en esta localidad se realizó a una altitud de 2212 a 2276 msnm. entre las coordenadas 03°59'57.7" S 079°17'53.5" O - 04°00'14.6" S 079°17'47.0" O, este sitio posee una gama de variaciones en el suelo, yendo desde el arenoso, franco arenoso y franco arenoso con capa orgánica.



Figura 3. Villonaco
Fuente: Lucero, 2016

2.1.2 Celica.

Se encuentra ubicado al suroccidente de la provincia de Loja, presenta una gran diversidad de microclimas y posee una temperatura que se encuentra entre los 15 a 25 °C (Cueva, 2016). La recolección de individuos se realizó en un rango altitudinal entre 1919 a 2073 msnm. entre las coordenadas 04°05'43.5" S 080°00'01.5"O- 04°05'49.9" S 079°59'41.4" O, además este lugar presenta un tipo de suelo Franco Arcilloso.



Figura 4. Celica
Fuente: Trip-suggest

2.1.3 Yangana.

Se encuentra a 61.64 km de la ciudad de Loja, posee una temperatura promedio de 18,9 °C, con pocas variaciones en invierno o verano (SNI, 2015). La recolección de individuos se realizó en un rango altitudinal entre 1866 a 2203 msnm. entre las coordenadas 04°10'26.6" S 079°10'26.6" O - 04°23'25.0" S 079°09'58.0" O con un tipo de suelo Franco arenoso.

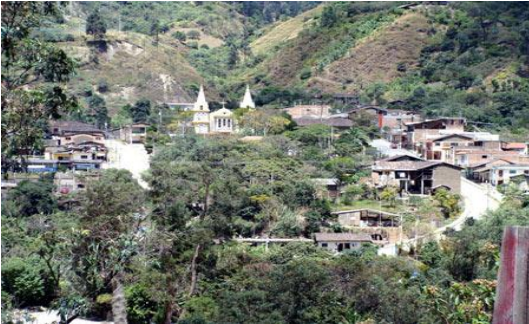


Figura 5. Yangana
Fuente: Municipio de Loja

2.1.4 Las Juntas.

La recolección de muestras en esta localidad se la realizó en un rango altitudinal entre 1974 a 2019 msnm. entre las coordenadas 03°49'05.4''S 70°14'33.0''O - 03°49'51.9''S 70°14'09.4''O, presenta una gran heterogeneidad en cuanto a los tipos de suelo, como arenoso, franco arcilloso, franco arenoso, franco limoso, franco rocoso y rocoso que fueron determinados por el equipo de campo de esta investigación.

2.2 Muestreo y tratamiento de muestras

El muestreo fue realizado previamente por el equipo de campo en el que se colectó una vez a la semana (cuatro semanas) 30 raíces por cada localidad, obteniendo un total de 120 individuos muestreados durante los meses de Noviembre y Diciembre que se indican a continuación:

- 16/11/2015 -> Villonaco
- 23/11/2015 -> Celica
- 30/11/2015 -> Yangana
- 07/12/2015 -> Las Juntas

Luego las raíces fueron almacenadas durante 1 mes en tubos de plástico con alcohol al 70%.

2.2 Determinación de Porcentaje de Colonización

De cada muestra (120 en total) se tomaron 30 raicillas de 2cm de largo aproximadamente que fueron almacenadas en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con alcohol al 70% hasta su uso (Figura 6), estas raicillas fueron teñidas siguiendo una modificación del protocolo de tinción de raíces propuesto por (Phillips & Hayman, 1970). (Anexo 1).

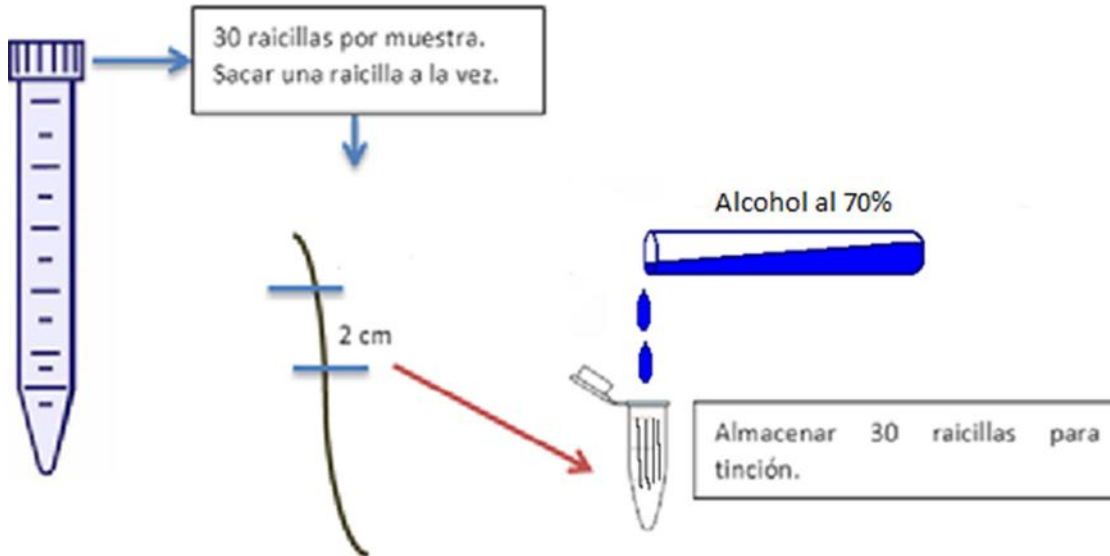


Figura 6. Pasos previos a la tinción
Elaboración: Propia

Posteriormente las raicillas teñidas fueron montadas permanentemente sobre un portaobjetos con Polivinil-Lacto-glicerol (Anexo 2), permitiéndonos tener una mejor visualización en el microscopio óptico con una magnificación de 400x de las estructuras que caracterizan a las micorrizas y luego en base a Trouvelot et al., (1986), determinamos el porcentaje de colonización de hongos micorrízicos arbusculares para el que se asignó a cada raicilla (10 raicillas por placa, 3 placas por individuo) una categoría según el porcentaje de colonización que presenten basándonos en la (Figura 7).

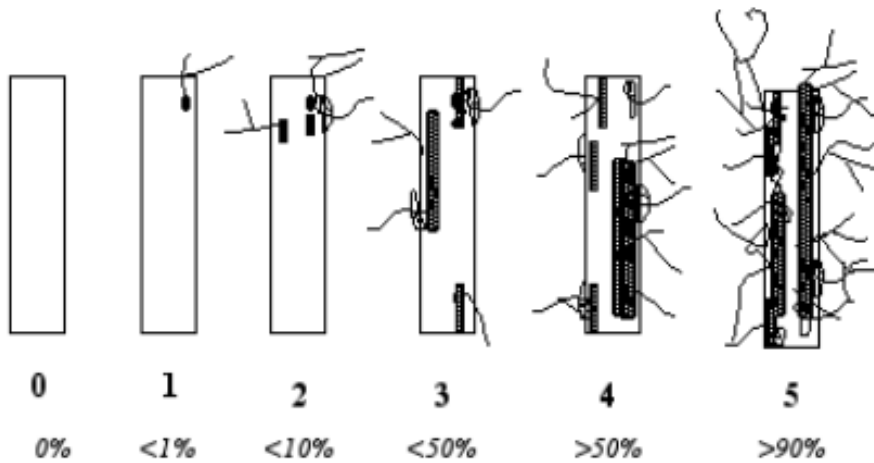


Figura 7. Categorías según el porcentaje de colonización de micorrizas

Fuente: Trouvelot et al., 1986

Una vez asignada la categoría de colonización, se procederá a realizar el cálculo del porcentaje de colonización, basándose en la siguiente fórmula:

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

En donde:

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

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

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

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

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

N = Número total de fragmentos.

2.3 Estado fenológico

Los estados fenológicos de la especie *Gynoxys verrucosa* que se encontraron en cada localidad (Figura 8), fueron determinados previamente al estudio, por observación directa del equipo de campo del programa (Tabla 3).

Tabla 3. Estados fenológicos de la especie *G. verrucosa* de cada localidad

LOCALIDAD	ESTADO FENOLÓGICO DE LA ESPECIE <i>Gynoxys verrucosa</i>	INDIVIDUOS
VILLONACO	Flores	22
	Vegetativo	8
CELICA	Post-Floración	30
YANGANA	Post-Floración	30
LAS JUNTAS	Post-Floración	29
	Vegetativo	1

Fuente: Lucero, 2016

Elaboración: propia



Figura 8. Estados fenológicos de la especie *G. verrucosa*: a) Vegetación b) Floración c) Postfloración

Fuente: Lucero, 2016

2.4 Tipos de suelo

El equipo de campo antes de realizar esta investigación, distinguió los tipos de suelo de cada localidad de estudio mediante observación directa (Tabla 4).

Tabla 4. Tipos de suelo que se definieron previamente en cada localidad

LOCALIDAD	TIPO DE SUELO
VILLONACO	Arenoso
	Franco Arenoso
	Franco Arenoso con capa orgánica
CELICA	Franco Arcilloso
YANGANA	Franco Arenoso

LAS JUNTAS	Arenoso Franco Arcilloso Franco arenoso Franco limoso Franco rocoso Rocoso
------------	---

Fuente: Lucero, 2016

Elaboración: Propia

2.5 Análisis estadístico

Se usaron los programas PRISM versión 5, el cual es un programa estadístico en el que se utilizó la prueba de Kruskal Wallis que realiza un análisis no paramétrico, sabiendo que nuestra investigación es “no experimental”, permitiéndonos ver si existen diferencias significativas del porcentaje de colonización de micorrizas arbusculares en las cuatro localidades de estudio, aplicando pruebas de “comparaciones múltiples Dunnett” para comprobar si existen diferencias por cada par de poblaciones.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Porcentaje de colonización

Se observaron las estructuras características de las micorrizas arbusculares que estaban colonizando a las raicillas de la especie *Gynoxys verrucosa* encontrando en la mayoría de las muestras, colonización por vesículas e hifas y constatándonos de la ausencia de arbusculos, esto pudo darse debido a que estos mueren a los cuatro o cinco días y son reemplazados por arbusculos más jóvenes, pero esta sustitución solo sucede si existe el intercambio de nutrientes Guerrero, (1996) por lo que se puede inferir que después del muestreo, los arbusculos pudieron haberse degradado y no se volvieron a generar debido a que ya no existía este intercambio de nutrientes, lo cual hizo que no observáramos esta estructura en nuestras muestras (Figura 9).

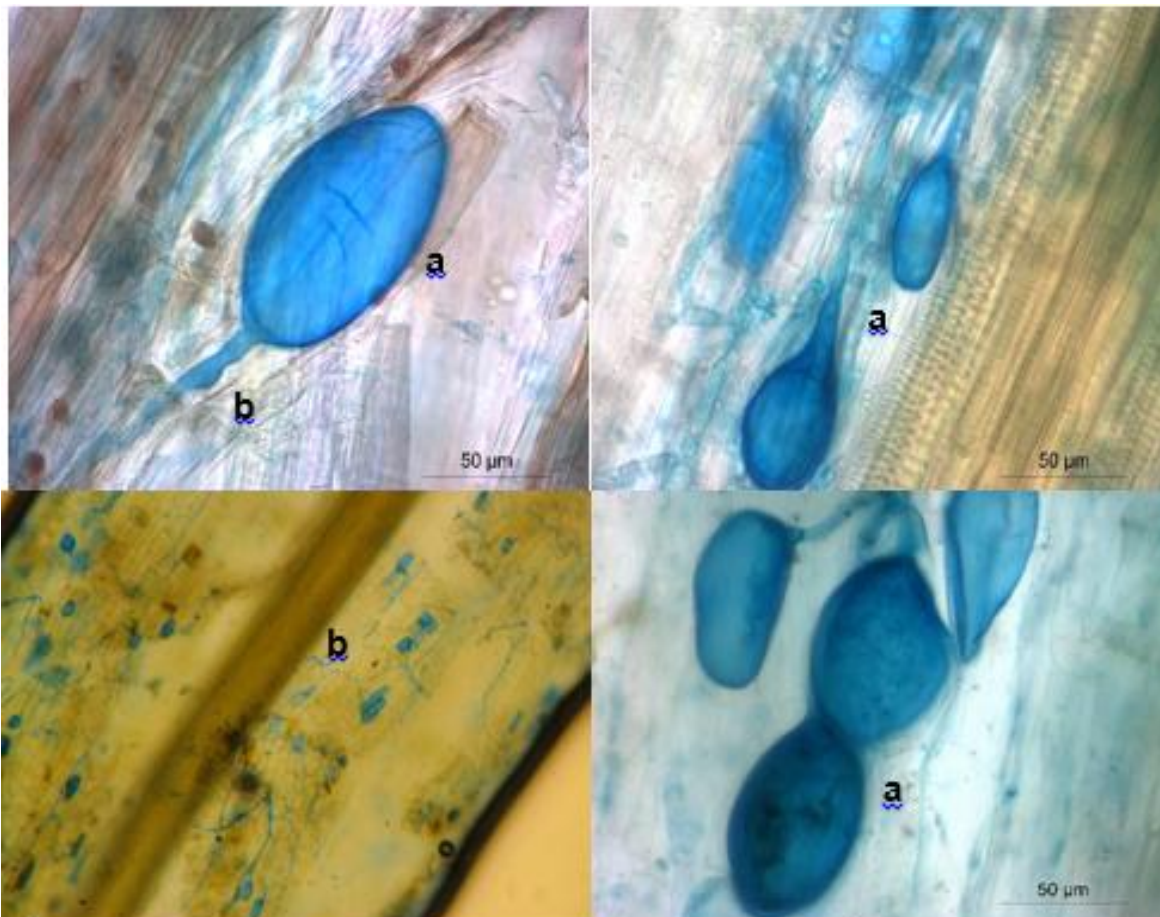


Figura 9. Estructuras características de micorrizas arbusculares que colonizan las raíces de *Gynoxys verrucosa*: a) Vesículas; b) hifas fúngica

Elaboración: Propia

3.1.1 Porcentaje de colonización – poblaciones.

El análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal Wallis presentó un p-valor de 0.0062 (menor a 0.05), indicando que existen diferencias significativas en el porcentaje de colonización de las micorrizas entre las poblaciones. La prueba post – hoc indicó específicamente que las poblaciones de Villonaco – Celica, y Celica – Las Juntas presentan diferencias significativas en el porcentaje de colonización (Figura 10).

Estas diferencias en la colonización de las poblaciones antes mencionadas podrían haberse dado a la diferencia de la altitud de los sitios, puesto que Villonaco y la Juntas están ubicadas a mayor altitud respecto a Celica, esto podría explicarse con lo expuesto por Perez et al., (2011), que menciona que las comunidades de HMA pueden cambiar por aspectos climáticos asociados a la altitud y son dinámicas en el tiempo, sin embargo el muestreo de raíces de cada población se la realizó semanalmente, por lo que este factor no pudo haber influenciado en las diferencias del porcentaje de colonización en las poblaciones ya que el tiempo de muestreo fue el mismo para todos los sitios.

Se le puede atribuir también a que la población en Villonaco no estaba intervenida en comparación con la de Celica que se ubican más cerca de la carretera y se practica la agricultura y ganadería. El manejo agrícola afecta negativamente a la asociación micorrízica causando la pérdida de cobertura vegetal que lleva a la erosión del suelo y, como consecuencia reducen el número de propágulos, la biodiversidad y la funcionalidad de las micorrizas arbusculares (Sangabriel-Conde et al., 2010).

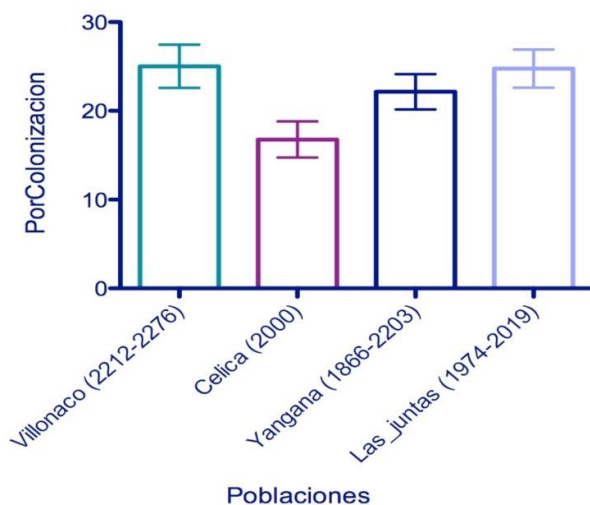


Figura 10. Análisis del porcentaje de colonización que existe en cada población de estudio
Elaboración: Propia

3.1.2 Porcentaje de colonización - estado fenológico.

También el porcentaje de colonización se lo relacionó con el estado fenológico en el que se encontraba las plantaciones de *Gynoxys verrucosa*, esto se lo analizó mediante la prueba de Kruskal Wallis generándose un p-valor de 0.034 (menor a 0.05), lo que quiere decir que si existen diferencias en el porcentaje de colonización de cada estado fenológico. La prueba post hoc indicó que entre el estado fenológico vegetativo y flores si existen diferencias significativas, sin embargo, al comparar los estados Vegetativo-Postfloración y Postfloración-Flores no existen diferencias significativas con respecto al porcentaje de colonización de micorrizas arbusculares (Figura 11).

Se puede concluir que cuando las plantaciones de *Gynoxys verrucosa* se encontraban en estado vegetativo, existió una mayor colonización de micorrizas arbusculares en comparación con el estado de floración sin embargo si existió colonización micorrízica en floración lo que concuerda con lo expuesto por Medina & Figueroa (2008), en el que menciona que en estado vegetativo la planta permite la colonización radicular al transportar grandes cantidades de fotosintatos hacia el sistema radical que son utilizados por la microbiota, obteniendo así la planta el beneficio de acceder al agua y nutrimentos que están lejos de su zona de influencia, en cambio al iniciar la etapa de floración o reproductiva, la planta redirige los fotosintatos hacia el fruto en formación y las células corticales de la raíz ya no son colonizadas por hongos micorrízicos y, los ya establecidos, perciben esta disminución de nutrimentos carbonados respondiendo con la formación de estructuras de resistencia (esporas) y con el incremento en el número de vesículas y arbusculos.

Este comportamiento pudiera ser explicado en función de las necesidades nutricionales de las plantas ya que en la etapa de crecimiento vegetal y floración se requiere de los fotosintatos, de grandes cantidades de agua y nutrimentos minerales (Medina & Figueroa, 2008).

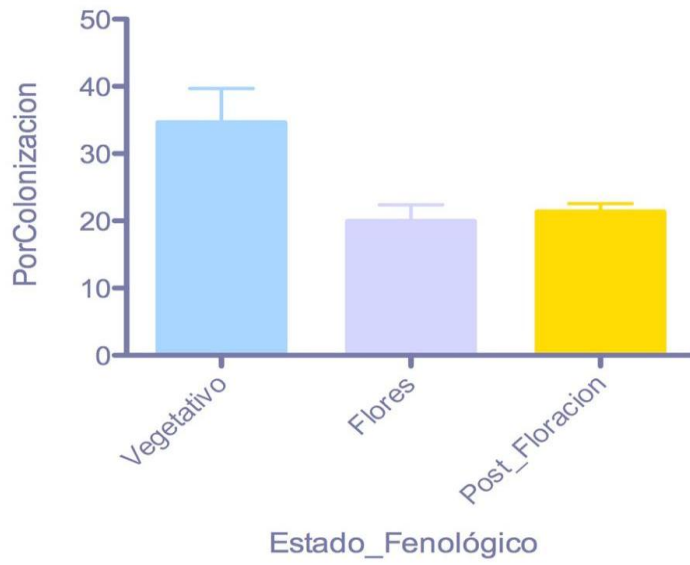


Figura 11. Relación del porcentaje de colonización con respecto al estado de colonización de la especie *Gynoxys verrucosa*
 Elaboración: Propia

3.1.3 Porcentaje de colonización - Tipos de suelo.

Se relacionó el porcentaje de colonización de micorrizas en *G. verrucosa* y el tipo de suelo de cada población, indicándonos el análisis de Kruskal Wallis, un p-value de 0.0098. (Menor a 0.05), por lo que se podría inferir que en estos suelos si hay diferencias en el porcentaje de colonización de micorrizas. En cambio al realizar la prueba post hoc que nos permite ver las diferencias de forma más específica mostró que al comparar por pares los distintos tipos de suelo no existen diferencias significativas en el porcentaje de colonización entre ellos (Figura 12).

Sin embargo aunque el primer análisis nos permite ver de manera amplia que si hay diferencias en el porcentaje de colonización de micorrizas en los suelos, es suficiente para este estudio puesto que nos permite constatar las condiciones en las que se encuentra los suelos de las cuatro localidades de estudio, ya que en suelos que muestran la presencia de micorrizas, son pobres en nutrientes o han sido sometidos a estrés, siendo en estos ambientes en donde las plantas necesitan ser colonizadas por el hongo para ser competitivas, en cambio en suelos que están manejados con fertilizantes la simbiosis es inhibida, debido a que las plantas tienen muchos minerales en el suelo (Asociación Vida Sana, 2012). Además las micorrizas han evolucionado con las plantas para trabajar sobre la materia orgánica, ya que las raíces micorrizadas dominan la absorción de nutrientes en

la interfase suelo-planta y como consecuencia los HMA aceleran la descomposición de la materia orgánica, aumentando así la disponibilidad y absorción de Nitrógeno y fósforo (Ferrol & Pérez-Tienda, 2009).

Se ha visto que las micorrizas se encuentran en suelos que presentan condiciones de materia orgánica, pH y humedad altas (Ferrol & Pérez-Tienda, 2009). Sin embargo la presencia de micorrizas arbusculares en los suelos puede verse afectada por factores externos como inundaciones prolongadas de agua, fuego, herbicidas, fungicidas e insecticidas (Asociación Vida Sana, 2012). Por lo que el mantenimiento de los suelos es importante para la funcionalidad del ecosistema. Siendo así “las micorrizas arbusculares un importante factor biológico dentro de la estructura y funcionamiento de los suelos que inciden sobre el comportamiento ecológico, productividad y composición de comunidades vegetales naturales” (Pérez & Fuentes, 2009).

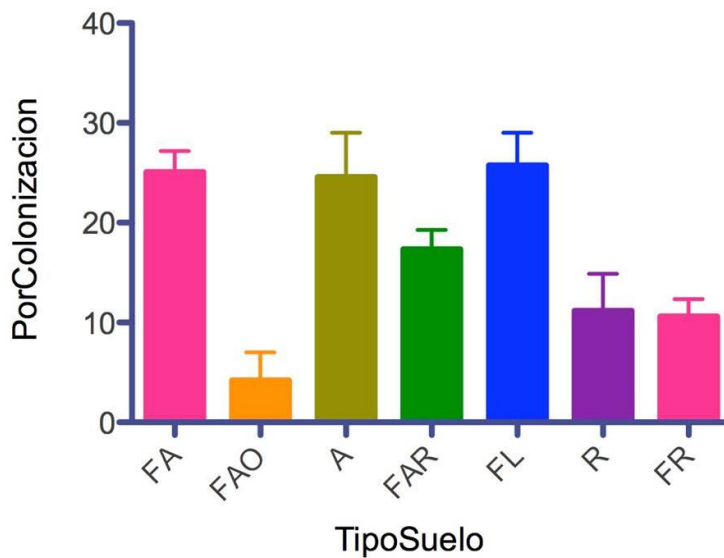


Figura 12. Relación entre el porcentaje de colonización y el tipo suelo de las poblaciones de estudio

Elaboración: Propia

CONCLUSIONES

Se puede concluir en este trabajo que se ha comprobado la presencia de micorrizas arbusculares en la raíces de la especie *Gynoxys verrucosa*, tal cual como están en su hábitat natural sin realizar ningún tipo de experimento. Esta especie vegetal no ha sido estudiada en este ámbito, permitiéndonos contribuir con información importante al macro proyecto en el que se está estudiando esta especie en otros ámbitos por el Departamento de Química y Ciencias Naturales.

También se puede inferir que el uso del protocolo Phillips & Hayman (1970), en donde se modificaron los tiempos de los reactivos y los de temperatura en el plato calentador fueron factibles para conseguir la tinción de las raicillas, puesto que éstas eran gruesas (muy lignificadas) por lo que en tiempos cortos no se podía conseguir la raíces claras para poder ser teñidas y ver las estructuras principales de las micorrizas arbusculares.

El método propuesto por Trouvelot et al., (1986) aunque nos permitió determinar el porcentaje de colonización asignando categorías a cada raíz, quizá podría ser una técnica subjetiva debido a que de acuerdo a la perspectiva del observador se asignan las categorías que indican el porcentaje de colonización.

Finalmente se puede concluir que esta investigación es un aporte de información sobre otra especie vascular (*Gynoxys verrucosa*) que está asociada con HMA comprobando que el 90% de las plantas vasculares se encuentran colonizadas por hongos micorrízicos.

RECOMENDACIONES

Este trabajo representa el primer estudio en el que se verifica la presencia de micorrizas arbusculares en la especie *Gynoxys verrucosa* de cuatro localidades del Sur del Ecuador y por ende puede ser utilizado para próximos estudios que se realicen con esta especie. Entre otros temas se podría: estudiar la diversidad genética de micorrizas asociadas a esta especie; profundizar sobre la influencia de las micorrizas en la asimilación de nutrientes; relacionar las micorrizas con el estado fitosanitario de las plantas; entre otros.

Además se puede hacer recomendaciones de manejo de suelos con miras a aplicarlos en sistemas productivos; lo que llevaría a una producción de alimentos más “limpia” o amigable con el entorno ya que según Aghababaei & Raiesi (2015), se han generado políticas públicas encaminadas a la protección de los productos de exportación, puesto que la Unión Europea desde el 2020 no aceptará productos agrícolas ecuatorianos con niveles altos de Cadmio, siendo una alternativa clave las micorrizas que ayudan a disminuir los metales pesados en los suelos y por ende en los frutos de exportación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aghababaei, F.; Raiesi, F.(2015). Mycorrhizal fungi and earthworms reduce antioxidant enzyme activities in maize and sunflower plants grown in Cd-polluted soils. *Soil Biology and Biochemistry* 86: 87–97.
- Andrade-Torres, A. (2010). Antigua interacción entre plantas y hongos. *Ciencia* 84–86.
- Asociación Vida Sana.(2012). Microorganismos del suelo y biofertilización. *Vida Sana*1/43.
- Benenaula, M. (2007). Propagación vegetativa inducida con 3 bioreguladores de crecimiento de *Buddleja* sp. y *Gynoxys cuicochensis*. Dspace. Uazuay. Edu. Ec. Universidad del Azuay
- Borie, F.; Rubio, R.; Morales, A.; Castillo, C. (2000). Relación entre densidad de hifas de hongos micorrizógenos arbusculares y producción de glomalina con las características físicas y químicas de suelos bajo cero labranza. *Revista Chilena de Historia Natural* 73: 749–756.
- Brandbyge, J. (1991). Reforestación de los andes ecuatorianos con especies nativas. CESA- Intercooperation Suiza, 1-79.
- Camargo-Ricalde, S.; Montaña, N.; De la Rosa, C.; Montaña, S. (2012). Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria* 13: 19.
- Cueva, Z. (2016). Monografía del Cantón Céllica de la provincia de Loja. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Filho, C.; Balota, E.; Hungria, M.; Araújo, R. 1994. Micorrizas arbusculares. *Ciencia Ergo Sum* 14: 300–306.
- Ferrol, N.; Pérez-Tienda, J. (2009). Coordinated Nutrient Exchange in Arbuscular Mycorrhiza. In D. C. Azcón-Aguilar, S. M. and Symbiotic, & S. Department (Eds.), *Mycorrhizas - Functional Processes and Ecological Impact* (pp. 84–95). Granada, Spain: Springer.
- García-Garrido, J.; Ocampo, J. (2002). Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of experimental botany* 53: 1377–1386.
- Guerrero, E. (1996). *Micorrizas: Recurso Biológico del Suelo*. Fondo FEN Colombia.
- Harley, J.; Smith, S. 1983. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, Inc., London.

- INVAM. (2006). Micorriza Information Exchange Web Site clearinghouse for information on research, teaching, business of mycorrhizal symbiosis. West Virginia University.
- León, D. (2006). Evaluación y caracterización de micorrizas arbusculares asociadas a yuca. 21–30.
- Medina, I.; Figueroa, M.(2008). Dinámica de hongos micorrízicos arbusculares en el mango variedad Ataúlfo. 1: 25–31.
- Miransaria, M.; Bahramib, H.; Rejalic, F.; Malakoutib, M.(2009). Effects of soil compaction and arbuscular mycorrhiza on corn (*Zea mays* L.) nutrient uptake. Elsevier 103: 282–290.
- Ordóñez, L.; Aguirre, N.; Hofstede, R.(2001). Sitios de recolección de semillas forestales andinas del Ecuador. Quito.
- Ordóñez, P.; Quave, C.; Reynolds, W.; Varughese, K.; Berry, B.; Breen, P.; Compadre, C.(2011). Sesquiterpene lactones from *Gynoxys verrucosa* and their anti-MRSA activity. *ethnopharmacology* 137: 1055–1059.
- Pereira, G.; Roldan, I.; Herrera, M. (1999). Micorrizas en especies leñosas. Consejería de Agricultura y Pesca Dirección General de Investigación y Formación Agraria.
- Perez, A.; Fuentes, J.(2009). Regresión Logística en la evaluación de la esporulación de micorrizas en pasto *Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus. *Rev. Colombiana cienc.* 1: 1–18.
- Pérez, C.; Peroza. (2013). Micorrizas arbusculares asociadas al pasto angleton (*Dichanthium aristatum* Benth) en fincas ganaderas del municipio de tolú, Sucre-Colombia. *Revista MVZ Cordoba* 18: 3362–3369.
- Perez, C.; Rojas, S.; Montes, V. (2011). Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el Caribe colombiano. *Rev Colombiana Cienc. Anim* 3: 366–385.
- Phillips, 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.
- Prieto-Benavides, O.; Belazaca-Pinargote, C.; Mora-Silva, W.; Garcés-Fiallos, F.;

- Sabando-Ávila, F.; Cedeño, P. (2012). Identificación de hongos micorrízicos arbusculares en sistemas agroforestales con cacao en el trópico húmedo Ecuatoriano. *Agronomía Mesoamericana* 23: 233–239.
- Redecker, D.; Schüßler, A.; Stockinger, H.; Stürmer, S.; Morton, J.; Walker, C. (2013). An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23: 515–531.
- Remy, W.; Taylor, T.; Hass, H.; Kerp, H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 11841–11843.
- Rodríguez, R.; Herrera, P.; Furrázola, E. (2013). Arbuscular mycorrhizal colonization in Asteraceae from white sand savannas, in Pinar del Rio, Cuba. *Biota Neotropica* 13: 136–140.
- Sangabriel-Conde, W.; Trejo-Aguilar, D.; Soto-Estrada, A.; Ferrera-Cerrato, R.; Lara-Capistrán, L. (2010). Potencial de colonización de hongos micorrízico-arbusculares en suelos cultivados con papayo bajo diferentes manejos de producción. *Revista mexicana de micología* 31: 45–52.
- SNI. (2015). GAD Parroquial de Yangana. Loja.
- Smith, S.; Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. 3er Ed. Academic Press.
- Trouvelot, A.; Kough, J.; Gianinazzi, V. (1986). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae* 217–221.
- Universidad de los Andes. (2001). *Gynoxys Cass.*
- Yong-Guan, Z.; Smith, A.; Smith, S. (2003). Phosphorus efficiencies and responses of barley (*Hordeum vulgare* L.) to Arbuscular Mycorrhizal Fungi Grown in Highly Calcareous Soil". *PubMed* 13: 93–100.

ANEXOS

Anexo 1. Modificación del Protocolo de tinción (Philips y Hayman, 1970)

- Desechar el alcohol y lavar bien las raíces con agua de grifo.
- Cubrir las raíces con una solución de KOH al 10%, tapar los tubos y poner en baño maría o en bloque de calentamiento a 70°C durante 30 minutos.
- Enjuagar las raíces tres veces con agua del grifo.
- Cubrir las raíces (dentro del mismo tubo) con una solución de HCl al 10%, durante 1-2 min a temperatura ambiente y descartar el HCl.
- Añadir una solución de azul de metileno al 0.05% (éste debe estar diluido en ácido láctico) lo suficiente hasta cubrir las raíces y poner los tubos en baño maría por 30 minutos a 70°C.
- Extraer una muestra de raíces y verificar la tinción. Si las raíces están muy azules colocar una solución de ácido láctico durante 24h a los tubos (pero primero extraer al azul de metileno de todos los tubos). Si las raíces están muy pálidas puede ser necesario prolongar el tiempo de exposición al azul de metileno unos cuantos minutos.
- Colocar 10 segmentos de raíz en cada portaobjetos correctamente etiquetado y añadir PVLG para fijar la muestra, cubrir con el cubreobjetos.
- Se deben preparar 3 portaobjetos con 10 segmentos cada uno por cada muestra analizada.

Anexo 2. Protocolo para preparar Polivinil-Lacto-Glicerol (PVLG)

1. En una botella oscura se coloca 100 ml de agua destilada
2. Se agrega 16,6 gr de Alcohol de polivinilo (PVA) y se lo disuelve lentamente en la plancha calentadora
3. Una vez disuelto el PVA a este se le agrega 100ml de ácido láctico y 10 ml de Glicerol
4. Tapamos con papel aluminio y dejamos reposar por al menos 24 horas antes de usarlo.