



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TEMA:

**“DIAGNOSTICO DE LA ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA
MICORRIZICA ARBUSCULAR EN EL CULTIVO DE PAPA
(*Solanum tuberosum*) EN LA ZONA SUR DEL ECUADOR”**

Previo a la obtención del título de
Bioquímico Farmacéutico

Presentado por:

Vanessa Alexandra Rodríguez Ojeda.

Ana Belén Serrano Galindo.

Dirigida por:

Ing. Paúl Diego Loján Armijos

LOJA-ECUADOR

2011

CERTIFICACIÓN

Ing. Paúl Diego Loján Armijos

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que el presente trabajo investigativo “**Diagnóstico de la asociación simbiótica micorrízico arbuscular en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en la zona Sur del Ecuador**” de autoría de las Señoritas Vanessa Alexandra Rodríguez Ojeda y Ana Belén Serrano Galindo, se realizó bajo mi dirección y control personal, cuyo contenido ha sido prolijamente revisado y corregido, por lo que autorizo su publicación y defensa

Loja, Octubre del 2010

Ing. Paúl Diego Loján Armijos

DIRECTOR

AUTORÍA

Las ideas, opiniones, criterios y recomendaciones plasmadas en el presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de las autoras.

Vanessa A. Rodríguez O.

Ana Belén Serrano Galindo

DEDICATORIA

A Miguel y María Ester, mis abuelitos, ejemplo de trabajo, sacrificio y entrega. A Guillermo y Patricia, mis padres, por sus esfuerzos para que salgamos adelante y por el inmenso amor que me profesan y me ayudan a salir adelante ya que son el pilar fundamental de mi vida. A mi mami Lulú, por toda la paciencia y cariño entregado a mi persona. A mis hermanos Patricia Salome, Daniel Enrique y María Luisa. A mis sobrinos parte fundamental de mi vida. En especial a Danielita que la dulce espera de su llegada motiva mis días. A Julio por la paciencia, amor y cariño. A mis tíos y tías por todos los buenos deseos. A mis amigos y mis compañeros, en especial a Vanessa por compartir conmigo buenos y malos momentos.

Ana Belén

A mi abuelita Lucía que aunque este en el cielo, siempre he sentido su mano sobre de la mía. A mis padres Wilman y Yolanda, por su fe, confianza y apoyo incondicional. A mis hermanos Israel, Oscar y Emily por sus sonrisas y el tiempo adeudado, a mis tíos y tías especialmente a Agusta y Vicente y a mi prima Gaby por ser mi apoyo y mi familia, a mis amigos y amigas durante estos cinco años, que se convirtieron en mi familia también. Y a Ana Belén por toda la paciencia y compañía en cada catástrofe y alegría.

Vanessa

AGRADECIMIENTO

Expresamos nuestra inmensa gratitud a Dios por darnos el día a día, a la Universidad Técnica Particular de Loja por abrirnos las puertas de sus aulas para que nosotras podamos cumplir uno de nuestros sueños, a Centro de Biología Celular y Molecular y a los docentes investigadores por el apoyo brindado, especialmente a nuestro director Ing. Paul Diego Loján Armijos por sus conocimientos impartidos y el apoyo brindado a lo largo de nuestro trabajo. Al Bqf Oscar Vivanco e Ing Alexi Salas por su tutela y consejos.

A nuestros amigos y amigas especialmente a Fabricio, Denis y Liliana por su colaboración e incentivos hacia nosotros brindados.

Ana Belén y Vanessa

CESIÓN DE DERECHOS

Nosotras, Vanessa Alexandra Rodríguez Ojeda y Ana Belén Serrano Galindo declaramos conocer y aceptar la disposición del Art. 67 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”.

Vanessa A. Rodríguez O. Ana Belén Serrano Galindo

Ing. Paúl Diego Loján Armijos
DIRECTOR DE TESIS

INDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	I
AUTORIA	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	V
CESIÓN DE DERECHOS DE TESIS	VI
INDICE DE CONTENIDOS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. GENERALIDADES DE LAS MICORRIZAS	4
3.1. SIMBIOSIS MICORRIZICA	4
3.2. TIPOS DE MICORRIZAS	6
3.3. HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES: SU ORIGEN Y CLASIFICACIÓN	6
3.4. INÓCULO	7
3.4.1. PLANTA HOSPEDERA	8
3.5. MÉTODOS DE CULTIVO DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES(Walker, 1997)	8
3.5.1. Cultivos trampa con suelo de rizósfera.	8
3.5.2. Cultivos a partir de cultivos en maceta ya existentes.	8
3.5.3. Cultivos de plantas trampa del campo.	9
3.5.4. Cultivos de fragmentos de raíces.	9
3.5.5. Cultivos multiespóricos.	9
3.5.6. Cultivos monospóricos.	10
5. METODOLOGÍA	11
5.1. Sitios de muestreo.	11
5.2. Determinación de las condiciones edafoclimáticas de los sitios muestreados.	12
5.3. Toma de muestras.	12

5.4.	Determinación de porcentajes de colonización de raíces de raíces colectadas en el campo.	12
5.5.	Determinación de morfotipos de esporas de HMA de muestras de suelo de las zonas de estudio.	13
5.6.	Establecimiento de cultivos trampa y ensayos de aislamiento para verificar viabilidad del inóculo de HMA.	13
5.6.1.	Cultivos trampa	13
5.6.2.	Método de inoculación de fragmentos de raíces en planta trampa.	14
5.6.3.	Método de establecimiento de cultivos monospóricos.	14
5.6.4.	Verificación de la colonización de cultivos y ensayos de aislamiento.	15
6.	RESULTADOS	16
6.1.	Caracterización de los sitios de muestreo.	16
6.2.	Determinación de porcentaje de colonización en raíces colectadas en los cultivos.	19
6.3.	Determinación de morfotipos de esporas de HMA en muestras de suelo de las zonas de estudio.	19
6.4.	Establecimientos de cultivos y ensayos de aislamiento para verificar viabilidad del inóculo de HMA.	20
6.4.1.	Cultivos trampa.	21
6.5.	Ensayos de aislamiento de HMA.	21
6.5.1.	Método de inoculación de fragmentos de raíces en plantas trampa.	21
6.6.	Establecimiento de cultivos monospóricos.	22
7.	DISCUSIÓN	23
8.	CONCLUSIONES	27
9.	PERSPECTIVAS FUTURAS	28
10.	BIBLIOGRAFÍA	29
11.	ANEXOS	32

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la situación de la simbiosis micorrízico arbuscular del cultivo de papa (*S. tuberosum*), mediante la determinación de los porcentajes de colonización radicular y determinación de morfotipos de esporas para establecer géneros tentativos en cuatro zonas papicultoras en las provincias de Cañar, Azuay y Loja. Se establecieron 12 cultivos de hongos micorrízico arbusculares tres por cada zona usando suelo y raicillas provenientes de las 4 zonas muestreadas en *Plantago lanceolata* como planta hospedera y se intentó su asilamiento en cultivos puros usando dos métodos distintos. En el análisis microscópico de las raíces de las plantas de los sitios muestreados, los mejores resultados para porcentajes de colonización por HMA se obtuvieron en el sitio Loja (Saraguro-Carboncillo) 75%, mientras que el número de esporas fue bajo para los cuatro sitios. La determinación preliminar de morfotipos para establecer géneros tentativos, mostró la presencia de *Acaulospora* y *Glomus*. No se tuvieron resultados positivos en los intentos de aislamiento, la colonización y número de esporas de HMA en los cultivos de papa, en términos generales fue bajo, debido quizás a varios factores antropogénicos como: las prácticas inadecuadas del manejo del suelo y del cultivo, labranza intensiva del suelo, períodos prolongados de barbecho, falta de rotación de cultivos y uso indiscriminado de insumos agroquímicos como fungicidas y fertilizantes inorgánicos que tienen efectos negativos sobre las poblaciones de los hongos micorrízicos arbusculares.

Palabras clave: micorriza arbuscular, simbiosis, cultivos trampa.

ABSTRACT

In the present study we assessed the status of the arbuscular mycorrhizal symbiosis of the potato crop by determining root colonization percentages and morphotypes of spores to establish putative genera in the four sampling zones in the provinces of Cañar, Azuay and Loja. Twelve crops of arbuscular mycorrhizal fungi were established, three for each zone using soil and roots from the 4 areas sampled in *Plantago lanceolata* as host plant and we attempt its isolation in culture pure using two different methods. In the microscopic analysis of the plant roots from the sampled sites, significant results for percent AMF colonization was found in Loja (Saraguro-Carboncillo) 75%, while the number of spores was low for the four sites. The preliminary determination of morphotypes to establish tentative genera, showed the presence of *Acaulospora* and *Glomus*. No positive results were obtained on isolations attempts. Colonization and number of AMF spores in potato crops in general was low, perhaps due to various anthropogenic factors such as: inappropriate practices of soil management and crop intensive soil tillage, prolonged periods of fallow, lack of crop rotation and indiscriminate use of fungal agrochemical inputs and inorganic fertilizers have negative effects on populations of arbuscular mycorrhizal fungi.

Keywords: arbuscular mycorrhiza, symbiosis, trap culture.

1. INTRODUCCIÓN

Los Hongos Micorrízicos Arbusculares (de aquí en adelante HMA) son simbiotes obligados de plantas y constituyen quizá el grupo de hongos más importante debido a su amplia distribución y a los beneficios económicos y ecológicos que reportan (Schuessler, 2001). Las evidencias fósiles señalan que este tipo de asociación es muy antigua (ap. 400 millones de años atrás) (Smith & Read 1997). Los HMA se encuentran formando simbiosis con la gran mayoría de las plantas vasculares (Smith & Read 1997) y existe una evidencia creciente de que su diversidad tiene un impacto significativo en la diversidad vegetal, productividad y estabilidad de los ecosistemas (van der Heijden *et. al.* 1998). Su importancia radica en que para muchas de las plantas terrestres son las micorrizas (la unión del la raíz y el hongo) en lugar de las raíces solas, los órganos de mayor captación de fósforo y nutrientes poco móviles en la solución del suelo (Smith & Read, 1997). Los HMA exploran el suelo a través de su micelio que funciona como una extensión del sistema radicular de la planta y se prolonga varios centímetros de distancia desde la raíz hacia el suelo, de esta forma las plantas amplían el volumen de suelo que pueden explorar con sus raíces y por consiguiente mejoran la captación de nutrientes poco móviles como el fósforo de la solución del suelo.

Numerosos estudios a nivel filogenético y molecular, señalan que los orígenes de las interacciones simbióticas entre plantas y hongos se remontan hacia el periodo Devónico temprano ap. 400 millones de años atrás, (Honrubia, 2009). Esta simbiosis es la más antigua, de acuerdo a las evidencias fósiles en las que se puede distinguir la presencia de arbusculos, hifas y esporas fúngicas. (Honrubia, 2009).

La Cordillera Central Andina, es el centro de origen de la papa (*Solanum spp.*) y uno de los centros de diversidad con más de 3800 diferentes variedades nativas de papa cultivadas por los agricultores (CIP, 2007). En el Ecuador alrededor de 50.000 hectáreas están cultivadas con papa, las que producen alrededor de 450.000 toneladas de tubérculos, con un valor total de 120 millones de dólares, constituyendo el cultivo más importante de la región Andina. La productividad del cultivo para Ecuador se

calcula en 6-7 tn/ha (Andrade, 2002), encontrándose los promedios más bajos en las provincias de Cañar, Azuay y Loja (Aguirre 2009, datos no publicados).

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) es considerado ineficiente en la toma de nutrientes del suelo (Prashar 2009, datos no publicados); por lo tanto en grandes extensiones del cultivo, son necesarios altos niveles de insumos (pesticidas y fertilizantes inorgánicos) para mantener un cierto nivel de productividad del cultivo (Condorí *et. al.* 1997).

Debido a los efectos adversos del uso desmedido de pesticidas y fertilizantes inorgánicos en los cultivos, actualmente se vienen implementado tecnologías amigables con el medio ambiente con la finalidad de sustituirlos (Romero *et. al.* 2000). En este contexto, siendo los microorganismos del suelo los componentes clave de cualquier sistema agrícola, es necesario promover su uso en la agricultura. Los HMA son considerados el grupo de hongos que más beneficios reporta en la producción de los cultivos. Luego de una era caracterizada por el uso desmedido de fertilizantes para mejorar el rendimiento de los cultivos, el uso de HMA se presenta como una alternativa sana para minimizar el uso de estos y promover una agricultura sostenible a lo largo del tiempo.

El presente trabajo pretende hacer una evaluación de la situación micorrízico-arbuscular en las zonas papicultoras del Sur del Ecuador, para lo cual, se seleccionaron 4 sitios ubicados; en las provincias de Cañar, Azuay y Loja. Esta información es importante con el fin de implementar alternativas ecológicamente saludables que promuevan una agricultura sustentable y sostenible a lo largo del tiempo. Esta investigación se desarrolló en el marco del proyecto VALORAM (Valorizing Andean microbial diversity through sustainable intensification of potato based farming systems) llevado cabo por el Centro de Biología Celular y Molecular de la UTPL.

2. OBJETIVOS

2.1. General

- Efectuar un diagnóstico de la situación simbiótica micorrízico arbuscular en los sistemas de cultivo basados en papa de 4 zonas ubicadas al Sur del Ecuador.

2.2. Específicos

- Realizar la multiplicación de HMA en cultivos trampa utilizando *Plantago lanceolata* como planta hospedera.
- Determinar la frecuencia de esporas en el suelo de rizósfera de plantas de papa y sus morfotipos.
- Mediante los cultivos trampa intentar aislar especies puras de HMA.

3. GENERALIDADES DE LAS MICORRIZAS:

El término micorriza fue usado por primera vez en 1885 por el botánico alemán Frank, y se deriva del vocablo griego *mykos*=hongo y del latín *rhiza*= raíz, y detalla las asociaciones simbióticas entre diferentes especies fúngicas con especies vegetales (Smith & Read, 2008). Inicialmente dicha asociación se le atribuía a un número limitado de plantas, especialmente las plantas leñosas, sin embargo, ulteriores estudios demostraron la existencia de una gran diversidad de asociaciones de este tipo, que comprendían no solamente las plantas leñosas sino la mayoría de los vegetales (Aguilera *et. al.* 2007). De manera general el éxito de este tipo de interacciones se dimensiona a partir de las ventajas nutricionales por parte de cada integrante de la asociación. El establecimiento de la simbiosis depende de los tres componentes del sistema, planta, hongo, suelo, demostrados en un conjunto de procesos como: reconocimiento, compatibilidad y especificidad. Para lo cual se hace necesario la identificación y la taxonomía de estos hongos con el fin de conocer las especies, géneros y la variedad de estas estructuras (Ruiz-Lozano, 2002)

3.1. TIPOS DE MICORRIZAS

De acuerdo a Salas 2003, se destacan dos tipos principales de micorriza, que se encuentran clasificadas de acuerdo a su estructura, morfología y modo de infección en: ectomicorrizas y endomicorrizas, Las endomicorrizas se subdividen en ectendomicorriza, arbutoides, monotropoides, ericoides, orquidáceas y arbusculares.

Ectomicorrizas: Se distinguen por la formación de hifas alrededor de las raíces colonizadas, su micelio pasa entre las células sin penetrarlas y de esta manera atraen los nutrientes. Una característica predominante de este tipo de asociación micorrízica es que forman un singular tipo de raíz (secundaria y de crecimiento limitado) (Honrubia, 2009) (Rivera & Fernández, 2003).

Endomicorrizas: Su forma de colonización difiere de las ectomicorrizas debido a que sus hifas forman una capa menos densa y que es imperceptible a simple vista. El hongo penetra

las células corticales mas no llega al endodermo (Rivera & Fernández, 2003). Dentro de los subtipos de endomicorrizas antes citados, son las asociaciones de micorrizas arbusculares, que por sus funciones y ventajas son consideradas las más importantes, y sobre las cuales se enfocará la siguiente investigación.

3.2. SIMBIOSIS MICORRÍZICO ARBUSCULAR

Partiendo de las evidencias fósiles se puede demostrar que la asociación micorrízica es un mecanismo muy antiguo de simbiosis mutualista. Las hifas y arbuscúlos han sido reportados en fósiles de *Aglaophyton*, una planta procedente del periodo Devónico tardío (Harrier, 2001). El mecanismo por el cual el hongo se une a la planta inicia con la penetración de la hifa a través del córtex radical en donde el micelio externo se extiende por medio de una red de hifas atravesando la matriz intercelular, cabe recalcar que existen tipos de hongos quienes en ausencia de hospederos forman septos, y sobreviven un lapso de 20 a 30 días, a diferencia de los HMA cuya simbiosis obligada limita su crecimiento únicamente asociado a raíces (Rivera & Fernandez, 2003).

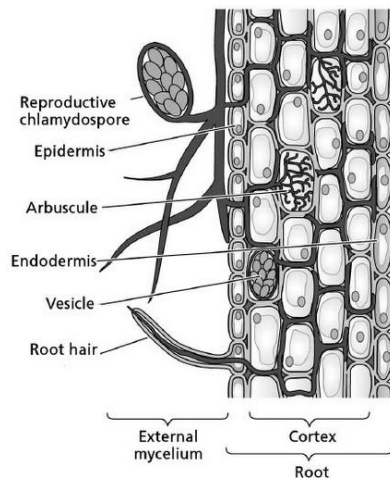


Fig.1 Esquema de la colonización de raíces por endomicorrizas

Fuente: <http://www.mmar.es/natural/archives/2704>.

El beneficio de la simbiosis micorrízica arbuscular es que maximiza la utilización de los elementos biológicos que están presentes en el suelo y por ende en la raíz. Los HMA absorben nutrimentos inorgánicos del suelo entre los que se destaca el fósforo que es trasladado del suelo a la raíz en forma de ión fosfato, simultáneamente el hongo recibe de la planta entre el 10 y 30% de sus productos de fotosíntesis como azúcares simples como glucosa y fructosa. (Alarcón & Ferrera, 2000). En cuanto a la traslocación de nutrientes podemos decir que los HMA aumentan el volumen de exploración de la raíz, esta propiedad es de fundamental importancia pues en suelos en donde el contenido de elementos nutricionales es escaso, la longitud que las hifas proporcionan a la raíz de la planta le permiten migrar a lugares distantes donde los recursos son óptimos.

Otra ventaja que aportan los hongos micorrízicos a las plantas es la resistencia a la infección por organismos fúngicos patógenos ya que compiten por la población de la superficie radical (Varma, 2008)

3.3. HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES: SU ORIGEN Y CLASIFICACIÓN

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares, son simbiosiontes obligados de plantas y son considerados un grupo monofilético, dentro del *filum Glomeromycota*, clase *Glomeromycetes* (Schüller *et. al.*, 2001) y colonizan las raíces de más del 80% de las especies vegetales, produciendo en su interior estructuras características: circunvoluciones, arbuscúlos y/o vesículas. Su reproducción no es sexual, sus esporas son estructuras de resistencia y permanencia, en consecuencia su fase de esporulación es más como una respuesta a condiciones ecológicas estresantes que sufren los hospederos, por ejemplo periodos prolongados de sequía, escasés de nutrientes y no respondiendo a una condición de su ciclo de vida. (Piñón, 2009)

Los hongos micorrízicos, en virtud de su extensa red de hifas, aumentan el área de exploración del suelo, permitiendo a la mayoría de las plantas acceder a las fuentes de nutrientes

inmóviles, principalmente fósforo, y aumentar la absorción de aquellos móviles (Clark & Zeto, 2000).

En la zona externa del córtex de la raíz forman unas estructuras intracelulares típicas que son los ovillos, en la zona media las hifas crecen longitudinalmente en los espacios intercelulares; mientras que en la zona interna las hifas penetran intracelularmente y forman arbusculos por ramificación dicotómica repetida, a este nivel se produce el intercambio de nutrientes. Las vesículas que se forman en el cortex cumplen la función de reservas lipídicas (León, 2006). Tras la colonización interna se produce la ramificación y desarrollo del micelio externo, en cuyas redes tridimensionales se forman estructuras de resistencia denominadas esporas que al madurar, cumplen con el ciclo del hongo. (León , 2006)

3.4. INÓCULO

Se entiende como inoculante al producto biológico que facilita la introducción de microorganismos con diversa actividad fisiológica, que favorece el crecimiento y desarrollo de las plantas. El aspecto físico del inoculante puede ser líquido o sólido. El objetivo de dicha herramienta biológica es establecer microorganismos en las hojas, tallos o raíces de plantas usadas en las labores agrícolas, hortícolas, frutícolas y forestales. (Ferrera- Cerrato, datos no publicados, 2000).

Refiriéndonos al inóculo usado en los cultivos de HMA, estos pueden ser esporas viables, hifas, fragmentos de raíces colonizadas y suelo de rizósfera con abundantes restos de hifas micorrízicas. (Alarcón & Ferrera – Cerrato, 1999).

3.4.1. PLANTA HOSPEDERA

Al momento de seleccionar la planta hospedera adecuada, su capacidad micotrófica debe ser establecida. Las plantas presentan distintos grados de dependencia a la micorrización.

Esto se logra analizando algunas características particulares, que se enfocan en aspectos como: 1) sistemas radicales con

limitación para absorber y aprovechar los nutrientes presentes en el suelo o sustrato correspondiente 2) la escasa presencia de pelos radicales y del tipo magnoloide encontrados en especies como la mayoría de los frutales, algunas leguminosas, especies forestales principalmente, hace que esta clase de hospederas tengan una dependencia elevada a la actividad de los hongos. Por otro lado las especies vegetales que no son dependientes a la micorrización poseen densos sistema radicales y abundantes pelos radicales de tipo graminoide, entre los cuales se encuentra el maíz, sorgo, trigo y otros, que restan la necesidad de simbiosis micorrízica (Ferrera-Cerrato, datos no publicados, 2000).

3.5. MÉTODOS DE CULTIVO DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (Walker, 1997)

3.5.1. Cultivos trampa con suelo de rizósfera

Es el método más simple de obtención de cultivos consiste en coleccionar suelo del área de interés y mezclarlo con un sustrato desinfectado el cual puede ser suelo, arena o arcilla expandida. Esta mezcla se coloca luego en un contenedor apropiado, que no debe estar contaminado por otros HMA. (Salas & Blanco, 2000). Se puede utilizar tanto semillas como plántulas (libres de micorrizas) sembradas en el sustrato. Las plantas se mantienen por un periodo de tiempo adecuado para el establecimiento de las micorrizas (usualmente de uno a seis meses). Este tipo de cultivos puede utilizarse para una purificación de especies futuras de HMA.

3.5.2. Cultivos a partir de cultivos en maceta ya existentes

El uso de sustrato de un cultivo ya existente es otro tipo de cultivo trampa aunque en este caso, los cultivos podrían o al menos deberían ser de un cultivo de una sola especie fúngica. En este tipo de cultivo una pequeña cantidad de sustrato de un cultivo ya existente es mezclado con el sustrato desinfectado, o añadido en un hoyo dentro del cual una planta libre de micorrizas es colocada. Los cultivos usualmente se establecen rápidamente y las esporas se producen normalmente dentro de uno o dos meses de cultivo.

3.5.3. Cultivos de plantas trampa del campo

Otro de los métodos para producir cultivos es extraer pequeñas plantas del área de interés cuidadosamente, lavar copiosamente las raíces y remover los restos de suelo y micelio externo. Luego se coloca la planta en un sustrato estéril apropiado. El resultado es usualmente un cultivo en coctel ya que las plantas pueden tener más de un simbionte asociado a ellas, pero a veces, aparentemente cultivos de una sola especie se pueden obtener de esta forma. Este método tiene cierta ventaja para estudios ecológicos, pues las especies de HMA así obtenidas tienen una alta probabilidad de haber estado en simbiosis con la planta en condiciones de campo, aunque es probable que un propágulo ocasional de otra simbiosis pueda haber permanecido adherido a las raíces luego del enjuague.

3.5.4. Cultivos de Fragmentos de raíces

En este método, pequeños fragmentos de raíces son tomados de las especies de interés y puestos en contacto con las raíces de plantas huésped libres de micorriza en un sustrato estéril. Este método comparte las mismas ventajas que el cultivo de plantas trampa, pero quizás es más probable obtener cultivos de una sola especie si los fragmentos de raíces son suficientemente pequeños.

3.5.5. Cultivos multispóricos

Las esporas son extraídas del suelo o de sustrato de cultivos trampa. Son ordenadas bajo un estereoscopio a especímenes que son superficialmente similares. Muchos (más de 100) especímenes son luego introducidos a plantas hospederas libres de micorriza. Existen varios métodos de introducción, por ejemplo, Gerdemann (1955) usó un embudo pequeño lineado con laminas de metal. El cuello del embudo se llena con sustrato y las esporas se colocan en la base del embudo en el suelo.

El embudo se llena y siembra con un hospedero adecuado. Después de un periodo de tiempo para que se establezca la simbiosis, las plantas son removidas del embudo, y si la micorrización es exitosa, son transferidas a una maceta que contenga sustrato desinfectado.

Otra manera es simplemente colocar una planta pre-germinada libre de micorriza en depresión, en una maceta de sustrato estéril. Luego pipetear las esporas en agua destilada sobre las raíces, finalmente cubrir con más sustrato y regar la maceta. Este método tiene una gran desventaja. Es imposible estar seguro sobre la identidad de la espora de HMA a nivel del estereoscopio. Consecuentemente nunca se puede estar seguro de que el cultivo derivado es de una especie. Aún si solo una especie está presente, esta puede ser de más de un gen así que puede estar mezclado genotípicamente.

Al igual que con las plantas y cultivos trampa, incluso si solo un tipo de espora es producido de tal cultivo, es posible que otra especie pueda estar presente en un estado no esporulativo (fragmentos de hifas pueden adherirse a esporas y actuar como propágulos; esporas muertas pueden parecer vivas bajo el estereoscopio y pueden contener esporas vivas de otras especies).

3.5.6. Cultivos monospóricos

Estos son preparados exactamente de la misma manera que los cultivos multispóricos, pero, como su nombre lo indica, son producidos por una sola espora. La proporción de éxito con los cultivos de una sola espora puede ser muy bajo dependiendo de la especie de hongo y las condiciones de las esporas. A menudo, solo uno o dos por ciento de los intentos serán exitosos, especialmente de las esporas colectadas del campo. La contaminación puede ser debida a (1) fragmentos de hifas, (2) que otras especies de HMA hayan esporulando dentro de las esporas muertas y, (3) producción de un cultivo de otra especie diferente de la que se pensaba que había sido usada para la inoculación. Con esporas de un cultivo saludable, el éxito es razonablemente alto.

5. METODOLOGÍA:

5.1. Sitios de muestreo

Se seleccionaron 4 zonas productoras de papa al Sur del Ecuador a lo largo de una gradiente altitudinal entre los 2 670-3560 m.s.n.m y se determinaron sus condiciones edáficas. La primera zona estuvo ubicada en la provincia de Cañar a 3560 m s.n.m (02°37'20.4" S; 078°56'04.7"E). La segunda zona ubicada en la provincia del Azuay a 3 000 m s.n.m (03°20'15.9"S; 079°09'25.4"E). La tercera zona en el cantón Saraguro en el sector denominado Gueledel a 2 760 m s.n.m (03°32'03.7" S; 079°13'17.2" E) y la cuarta zona también en el cantón Saraguro en el sector Carboncillo a 2 670 m s.n.m (03°32'21.8" S; 079°13'32.6" E).

El periodo de muestreo se lo realizó durante los meses de julio a noviembre del 2009.

5.2. Determinación de las condiciones edafoclimáticas de los sitios muestreados

Se determinaron las condiciones edafoclimáticas de las zonas muestreadas: temperatura, precipitación, y características del suelo. Además se realizó una breve descripción de los sitios en lo concerniente al manejo del cultivo.

5.3. Toma de muestras

De cada una de las 4 zonas seleccionadas, se escogió una parcela al azar de 20m x 20m aproximadamente y de ella se tomaron 5 plantas al azar. Este procedimiento se realizó durante tres estadios de desarrollo de las plantas: estado de prefloración, floración y senescencia. Se recolectaron raíces y suelo de rizósfera. De cada planta se seleccionaron 10 segmentos de raíces finas de aproximadamente 20cm de longitud (o varios segmentos que juntos constituyan 20cm) y se cortaron en 20 segmentos de 1cm de longitud. De esta forma se obtuvieron 200 segmentos de raíces de 1cm de longitud por planta muestreada, 100 de ellos se destinaron a análisis moleculares en la Universidad Ludwig Maximilian de Alemania (análisis aún en curso) y de los otros 100 restantes; 40 se tomaron para realizar tinciones y cuantificar la colonización de las raíces por HMA en el

campo, 40 se destinaron para establecer cultivos trampa, y los diez restantes se utilizaron para establecer ensayos de aislamiento de HMA a través del método de inoculación de un único fragmento de raíz.

5.4. Determinación de porcentajes de colonización de raíces colectadas en el campo.

Se tomaron 40 segmentos de raíces de 1cm de longitud tomadas al azar de cada planta muestreada, se tiñeron con azul de metileno siguiendo la metodología propuesta por Sieverding, 1984 y se determinó su porcentaje de colonización en cada una de las tres etapas de crecimiento de las plantas utilizando el método de los rangos propuestos por Trouvelot, 1986. Se tomaron 30 segmentos al azar y se montaron en grupos de 10 en placas porta y cubreobjetos. Los porcentajes de frecuencia de la colonización e intensidad de la colonización fueron calculados utilizando el programa Myco-calc, disponible en (<http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html>).

5.5. Determinación de morfotipos de esporas de HMA de muestras de suelo de las zonas de estudio.

Se tomaron 20g de suelo de rizósfera por cada una de las 5 plantas muestreadas durante la etapa de floración y se homogenizó para tener un total de 100gr de suelo por campo. La extracción de esporas se lo realizó siguiendo el método de tamizado en húmedo, decantación y centrifugación propuesto por Gerdeman & Nicholson, 1963 en combinación con el método de centrifugado en sacarosa (Jenkins, 1964). La captura de esporas se efectuó luego con una pipeta Pasteur bajo estereoscopio a 32x, las esporas extraídas se cuantificaron y agruparon por morfotipo, tomando en cuenta sus características morfológicas externas (color, tamaño, forma y ornamentación, presencia de hifa de suspensión), para establecer su género tentativo.

5.6. Establecimiento de cultivos trampa y ensayos de aislamiento para verificar viabilidad del inóculo de HMA.

5.6.1. Cultivos trampa.

De los cuatro sitios, se tomaron muestras de suelo (50 g) de rizósfera y raicillas de 5 plantas de papa en floración tomadas al azar, este material se homogenizó y se utilizó como inóculo de HMA para el establecimiento de tres cultivos trampa (por sitio de muestreo). El establecimiento de los cultivos trampa se hizo siguiendo el protocolo propuesto por Walker, 1997 que consiste en coleccionar suelo del área de interés y mezclarlo con un sustrato desinfectado y libre de HMA. Esta mezcla se colocó luego en macetas de 1Kg de capacidad. En la que se sembró una planta micotrófica: *Plantago lanceolata*, para lo cual se desinfectaron primero sus semillas con hipoclorito de sodio al 2% durante 15 min. Las plantas se dejaron crecer por un periodo de seis meses en sistemas cerrados para evitar la contaminación cruzada.

5.6.2. Método de inoculación de fragmentos de raíces en planta trampa.

Para el establecimiento de este ensayo se siguió el protocolo descrito por Walker, 1997. Se desinfectaron semillas de *P. lanceolata* y se dejaron germinar en sustrato autoclavado 3 veces a 120°C durante 1h, con la finalidad de eliminar micorrizas no deseadas en la investigación para luego dejar reposar el suelo durante 24h entre cada autoclavado. El sustrato consistió en una mezcla de arena de mina y tierra negra (5:1), las plántulas se dejaron crecer en esta mezcla hasta que alcanzaron tres semanas de edad.

Se tomaron 10 segmentos de raíces de 1cm de longitud al azar por cada una de las 5 plantas muestreadas por sitio (4 sitios) y por etapa de desarrollo fenológico (prefloración, floración y senescencia). Con cada uno de estos segmentos se estableció un intento de aislamiento al ponerlo sobre un *P. lanceolata* libre de micorrizas. Las plantas se sembraron nuevamente en macetas que contenían sustrato estéril, dentro de sistemas cerrados. En total se obtuvieron 600 ensayos.

10 replicas x 5 plantas = 50 cultivos x 3 etapas de desarrollo fenológico = 150 plantas x 4 sitios = 600 plantas.

5.6.3. Método de establecimiento de cultivos monospóricos.

Para este tipo de cultivos también se siguió el protocolo propuesto por Walker, 1997 usando sustrato esterilizado y *P. lanceolata* como planta hospedera. Del suelo de rizósfera colectado del campo, se extrajeron esporas con apariencia viable con el método de tamizado en húmedo, centrifugación y decantación (Gerdeman & Nicholson, 1963). Las esporas extraídas fueron colocadas de forma individual en la raíz de las plántulas de *P. lanceolata*. En total se extrajeron 60 esporas aparentemente viables (coloración brillante, sin manchas en las pared externa y turgentes) por sitio de muestreo y se inocularon en plántulas de *P. lanceolata*, obteniendo un número final de 240 ensayos para obtener aislamientos de HMA. Las plantas se dejaron crecer por un periodo de 3 meses antes de realizar la comprobación de la colonización en sus raíces.

5.7. Verificación de la colonización de cultivos y ensayos de aislamiento.

La tinción de las raíces de las plantas de *P. lanceolata*, se realizó a los seis meses en el caso de las plantas trampa y a los 4 meses en el caso de los ensayos de aislamiento, siguiendo la metodología de Philips y Hayman, 1970 (descrita anteriormente). Las raíces fueron montadas en placas porta y cubreobjetos y se evaluó su porcentaje de colonización con el método de Trouvelot 1986 y el programa Myco-calc para determinar los porcentajes de frecuencia e intensidad de colonización.

Existen algunos métodos utilizados para el aislamiento de estos microorganismos en cultivos puros. Dos de las técnicas más utilizadas para este fin son: la inoculación con fragmentos individuales de raíces colectadas al azar de las plantas de interés (Walker, comunicación personal), y el otro método de aislamiento muy utilizado es la inoculación de esporas individuales en una planta trampa micotrófica.

6. RESULTADOS:

6.1. Caracterización de los sitios

Los sitios de muestreo corresponden a lugares típicos de explotación del cultivo en la zona sur del Ecuador. Se seleccionaron sitios en los que existió una moderada aplicación de productos químicos para el control de lanchara (*Phytophthora infestans*) e insecticidas (de acuerdo a comentarios de los mismos agricultores). No fue posible muestrear una variedad de papa común para todos los sitios. En Cañar y en Azuay se tomaron muestras de cultivos de la variedad “superchola” que es una variedad producida por el INIAP. En Gueledel-Saraguro se muestreó un cultivo de la variedad “guata” y en Carboncillo de la variedad “Fripapa” también producida por el INIAP. Los sitios de muestreo también fueron muy heterogéneos en cuanto a sus características del suelo. La fertilización del suelo también fue heterogénea, en Cañar y Azuay, la fertilización se realizó con gallinaza colocada en los surcos, en Gueledel, se realizó una enmienda con fertilizante inorgánico 10-30-10, en Carboncillo no se realizó ninguna enmienda.

A continuación una vista panorámica de las parcelas muestreadas en cada una de las zonas.

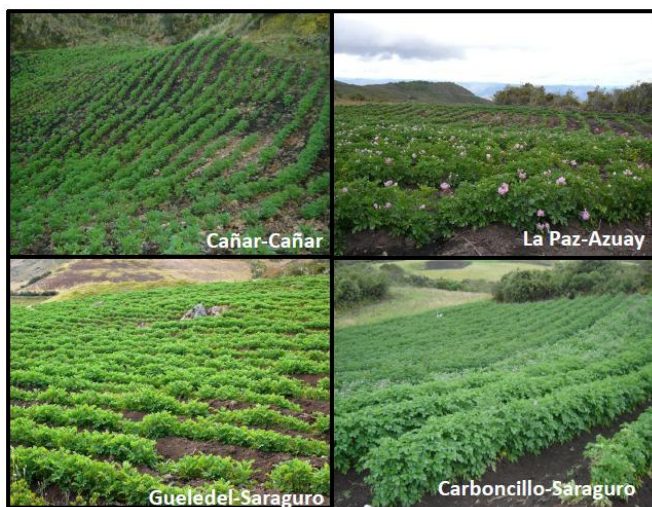


Fig 1. Vista de los sitios muestreados, se puede apreciar la heterogeneidad del paisaje y del cultivo entre sitios.

En las tablas 1, 2 y 3 se detallan las características climáticas y de suelo de los sitios muestreados, así como algunas características importantes con respecto al manejo del cultivo.

Tabla 1.- Determinación de las características climáticas de los sitios muestreados. Los valores presentados son los promedios obtenidos para seis años de acuerdo a los datos de las estaciones meteorológicas del INAMHI (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología del Ecuador).

Sitio	Temperatura Promedio (°)	Precipitación anual Promedio (mm)
Cañar-Buena Esperanza	12	330-560
Azuay-La Paz	No datos	578
Loja-Saraguro-Gueledel	15	695
Loja-Saraguro-Carboncillo	15	695

Tabla 2.- Características del suelo. Las muestras se analizaron en la Universidad Agraria La Molina. Lima-Perú

Sitio	pH (1:1)	C.E. (1:1) dS/m	M.O %	N %	P (ppm)	K (ppm)	Arena %	Limo %	Arcilla %
Cañar	4.07	0.25	31.72	0.88	7.0	95	Suelo orgánico		
La Paz	4.49	0.20	13.38	0.45	4.0	275	Suelo orgánico		
Gueledel	4.40	0.35	5.19	0.30	11.9	242	50	32	18
Carboncillo	4.45	0.47	9.01	0.35	7.2	275	56	26	18

Tabla 3.- Características de manejo del cultivo de papa.

Sitio	Variedad cultivada	Tipo de fertilización	Periodicidad de aplicación de fungicidas por ciclo de cultivo	Rotación de cultivos
Cañar-Buena Esperanza	Superchola	Organica-gallinaza	3	No
Azuay-La Paz	Superchola	Organica-gallinaza	1	Si
Loja-Saraguro-Gueledel	Papaguata	Inorganica-(10-30-10)	no	Si
Loja-Saraguro-Carboncillo	Fripapa	Sin fertilización	1	Si

6.2. Determinación de los porcentajes de colonización de muestras de raíces colectadas en los cultivos.

Los porcentajes de colonización de las muestras de raíces colectadas en el campo se muestran en las figuras 2.

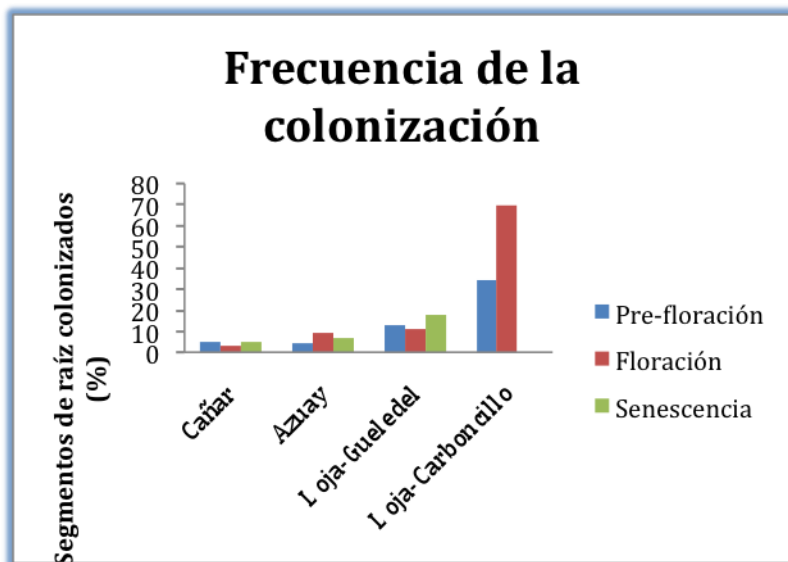


Fig 2. Frecuencia de colonización por HMA en las muestras de raíces colectadas en cuatro zonas de cultivo al sur del Ecuador. Las zonas fueron ordenadas en forma descendente con respecto a su altitud.

Tabla 4.- Representación numérica de los porcentajes de colonización de la **Fig. 2**.

Frecuencia de Colonización			
Zona	Prefloración	Floración	Senescencia
Cañar	5.2%	3.33%	5.46%

Azuay	4.81%	9.26%	6.86%
Loja-Gueledel	13.3%	11.15%	17.86%
Loja-Carboncillo	34.1%	69.91%	No datos

De acuerdo a la gráfica y tabla presentadas, se puede ver una clara diferencia en cuanto a los porcentajes de colonización de las raíces en los diferentes sitios, especialmente en la zona de Carboncillo, en donde los niveles fueron altos, sin embargo para la fase de senescencia de este cultivo no se tienen datos, debido a que el propietario del predio cosechó las plantas antes de realizar el último muestreo

6.3. Determinación de morfotipos de esporas de HMA de muestras de suelo de las zonas de las estudio.

A continuación se detallan la frecuencia total de esporas y los morfotipos de esporas de HMA encontrados en cada uno de los sitios muestreados.

Tabla 5. Frecuencia Total de esporas pertenecientes a los 4 sitios.

Frecuencia de esporas en 100g de suelo seco	
Lugar	Frecuencia
Cañar	25
Azuay	22
Saraguro (Gueledel)	157
Saraguro (Carboncillo)	126

Tabla 6. Morfotipos encontrados y asignación de los géneros putativos.

Tabla de morfotipos de esporas de HMA por sitio		
Sitio	Morfotipos	Géneros putativos
Cañar	3	Acaulospora (2), Archeospora (1)
Azuay	2	Archeospora (1), Glomus (1)
Saraguro (Gueledel)	9	Acaulospora (4), Glomus (3), Gigaspora (2)
Saraguro (Carboncillo)	6	Acaulospora (2), Glomus (3), Scutellospora (1)

6.4. Establecimiento de cultivos trampa y ensayos de aislamiento para verificar viabilidad del inóculo de HMA

6.4.1. Cultivos trampa

Se realizó la tinción de las raíces de las 12 plantas trampa obtenidas de los 4 sitios, verificándose la presencia de HMA. Desafortunadamente las condiciones de cultivo no fueron las adecuadas para que los cultivos produzcan esporas.

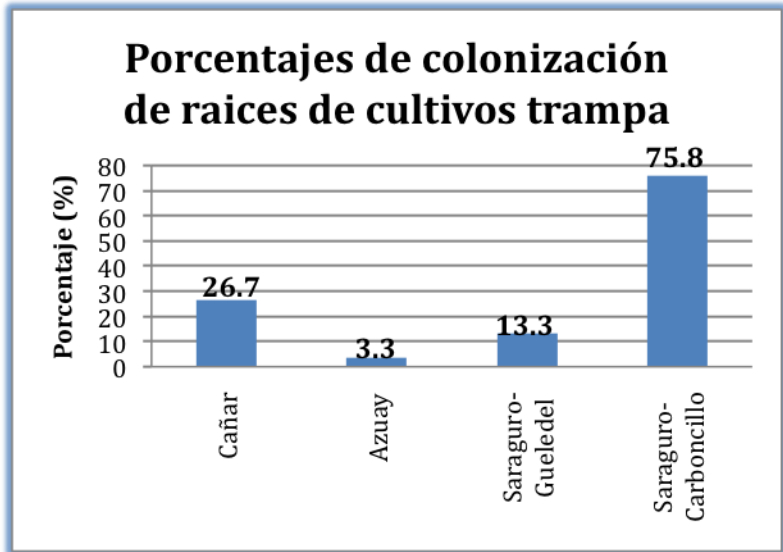


Fig. 3.- Gráfica de la frecuencia e intensidad de los 12 cultivos trampa obtenidos a partir de las cuatro zonas de muestreo.

6.5. Ensayos de aislamiento de hongos micorrízicos arbusculares

6.5.1. Método de inoculación de fragmentos de raíces en planta trampa.

De los 600 ensayos de aislamiento que se hicieron utilizando esta técnica, ninguno fue exitoso.

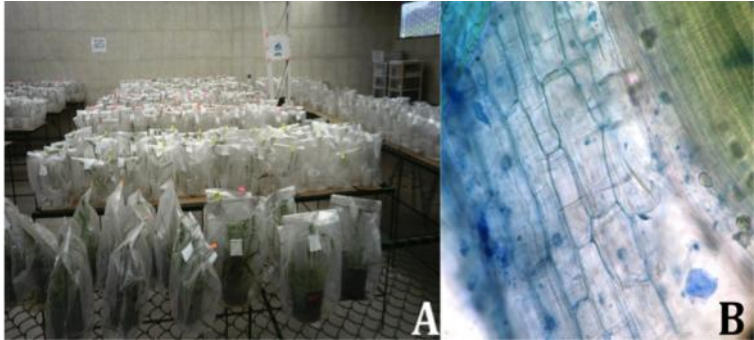


Fig 4. (A) Vista de los cultivos en el invernadero (B) Raíz no colonizada por HMA en la que se pueden apreciar las células corticales teñidas con azul de metileno.

6.6. Establecimiento de cultivos monospóricos

De los 240 ensayos de aislamiento, solamente se obtuvo un aislamiento exitoso con una espora de HMA del suelo proveniente de Carboncillo-Saraguro.

7. DISCUSIÓN:

En la Tabla 3, se detallan las características de cultivo de papa en cada zona. Debido a que la papa es un cultivo muy poco eficiente en la captación de nutrientes necesita de una alta cantidad de agua y fertilización del suelo (Prashar, datos no publicados). En los sitios de Cañar, Azuay y Saraguro-Gueledel los suelos fueron fertilizados con abonos orgánicos (mayormente gallinaza) y fertilizantes inorgánicos (10-30-10). En Cañar, los agricultores cultivan papa hasta 3 veces consecutivas en el mismo terreno, lo que no es una práctica muy adecuada en términos de depleción de los mismos nutrientes del suelo por parte del cultivo. Es una práctica muy común, antes y después del periodo de cultivo de papa dejar descansar en barbecho, lo cual no es adecuada debido a que los propágulos de HMA no encuentran un huésped con el cual asociarse, perdiéndose de esta forma una gran cantidad de propágulos infectivos de HMA.

Como se observa en la Fig. 2 los porcentajes de colonización por HMA en papa más bajos se encuentran en las zonas de Cañar (3.33%), Azuay (9.26%) y Loja-Gueledel (11.15%). Resultados muy parecidos fueron obtenidos en el 2008 por Cesaro et al, en dos áreas de cultivo de papa en Italia, encontrando niveles de colonización de 5,5 y 2,1%, El porcentaje más alto lo encontramos en el sector de Loja-Carboncillo (69.91%), aunque el porcentaje colonizado de la raíz no fue muy alto, si se encontró una gran cantidad de puntos de contacto entre las hifas del hongo y las raíces denotando una gran actividad de HMA en el sitio. Cabe recalcar que en el sector Loja-Carboncillo no se efectuó la aplicación de fertilizante lo que podría explicar la abundante presencia de HMA en dicho sector.

Varios experimentos han demostrado que las diferentes especies vegetales varían sustancialmente en su respuesta a los hongos micorrízicos (Van der Heijden *et al.* 1998). Incluso distintas variedades dentro de un mismo cultivar pueden presentar distintas respuestas en el establecimiento de la simbiosis micorrízico-arbuscular (Ryan & Graham, 2002). Los programas de cruzamiento para la obtención de nuevas variedades agrícolas han resultado en variedades o cultivares con un amplio rango de diferencias genéticas. Por ejemplo, se ha reportado, variación en la dependencia micorrízica de cítricos a los HMA. Muchos de estos

programas de cruzamiento han presentado respuestas pobres a los HMA por parte de los cultivares de gran importancia económica. Algunos ejemplos son el maíz (*Zea mays*), avena (*Avena sativa*), Cebada (*Hordeum vulgare*) y trigo (*Triticum aestivum*) (Hetrick *et al.* 1993; Kaeppler *et al.* 2000; Ryan & Graham, 2002). En consecuencia tal como se detalla en metodología, se muestrearon distintas variedades de papa, esto debido a que fue muy difícil encontrar una variedad común para todos los sitios muestreados. Para Cañar y Azuay la variedad muestreada fue “superchola” que es una variedad mejorada producida por el INIAP y que actualmente es una de las variedades más producidas en nuestro país (Cultivo de la papa en Ecuador, 2002). En los sitios: Saraguro-Gueledel y Saraguro-Carboncillo se muestrearon “papa guata” y “fripapa” respectivamente. Concomitante a lo antes expuesto y más halla de que no existen estudios para evaluar el grado de dependencia de distintas variedades de papa a los HMA creemos que el origen de las variedades estudiadas pudo ser otra causa de los bajos porcentajes de colonización

El cultivo de papa en la región Andina se ha desarrollado durante miles de años sin la adición de insumos externos (Cultivo de la papa en Ecuador, 2002). La aparición de *Phytophthora infestans* Mont de Bary, ha causado la propagación de epidemias de tizón tardío que demandan la aplicación de fungicidas. Como resultado, el cultivo de papa es considerado uno de los cultivos más controversiales en cuestiones fitosanitarias con problemas de dependencia y sobreutilización de agroquímicos y efectos colaterales negativos en la productividad del cultivo, el medio ambiente y la salud humana. (Cultivo de la papa en Ecuador pp 153, 2002). Una característica común para todos los sitios fue la aplicación de fungicidas como protectivos del cultivo, que en el caso de Cañar fue de hasta tres aplicaciones durante todo el ciclo, los fungicidas más aplicados fueron los Dithiocarbamatos como el Mancozeb y el Maneb que son los más recomendados en los almacenes agropecuarios para el control del tizón tardío. La acción de estos fungicidas ha probado ser detrimental en la asociación micorrízico arbuscular (Alarcón *et al.* 2004; Janza *et al.*, 2002; Oehl *et al.*, 2003). Oehl en el 2003, en un estudio sobre la diversidad de HMA en tres sistemas de manejo de suelo distintos (pradera, agricultura moderada y agricultura intensiva)

encontró que una intensificación en el manejo del suelo estuvo correlacionada con un decremento de la diversidad de especies de HMA. Uno de los errores más comunes es la utilización de fungicidas para erradicar *Phytophthora infestans* Mont de Bary, pues se considera erróneamente que esta entidad es un organismo fúngico, cuando en realidad se trata de un oomicete (Govers, 2001). Los efectos colaterales causados por el uso de estas sustancias son entre otros la resistencia de *Phytophthora infestans* Mont de Bary, y la disminución o desaparición de las comunidades de hongos beneficios (HMA) (Govers, 2001).

Como se puede observar en la Tabla 2, los géneros a nivel de esporas más frecuentes corresponden a *Glomus* y *Acaulospora*, estos géneros se encontraron en los 4 sitios muestreados. Los resultados concuerdan con los encontrados por Hijri *et al*, 2006 en un estudio de las comunidades de HMA en suelos cultivados. Se hizo un estudio a nivel molecular de las especies presentes en estos ecosistemas y se encontró que *Glomus* grupo A y *Acaulospora* fueron los géneros más frecuentes. También Read 1991 citado en Varela y Trejo 2001, menciona que existen micorrizas arbusculares que presentan una dominancia en determinadas comunidades vegetales especialmente en las de importancia agrícola y hortícola y que tal dominancia está correlacionada con el estado de los suelos y las latitudes bajas. Además se ha demostrado de que *Glomus* y *Acaulospora* son los géneros más resistentes a las perturbaciones producto del manejo constante de los suelos (Mathimaran *et. al.* 2005 citado en Guadarrama *et. al.* 2007).

Con respecto a los cultivos trampa establecidos, se observa que los porcentajes de colonización fueron muy similares a los encontrados a nivel de campo, siendo nuevamente los cultivos provenientes del sitio de Carboncillo los que presentaron los más altos porcentajes de colonización (75%). Los porcentajes de colonización de las raíces de *P. lanceolata*, posiblemente guarde relación con la viabilidad del inóculo en el campo. Bajos porcentajes de colonización de las plantas de papa en el campo, podría significar: que la cantidad de inóculo viable del material recolectado fue baja debido a las prácticas inadecuadas de manejo del suelo o que las condiciones de cultivo no fueron las adecuadas para la proliferación de los HMA. La producción de

esporas fue nula esto debido quizá a que las condiciones en las que se mantuvieron los cultivos no fueron las adecuadas para promover la esporulación de los hongos, encontrándose únicamente en estado vegetativo.

Concerniente al establecimiento de aislamientos con esporas y de fragmentos individuales de raíces provenientes de las plantas colectadas, la viabilidad de estos propágulos se ve cuestionada por lo mencionado en los párrafos anteriores en vista de que se consiguió solamente un aislamiento procedente del sitio Carboncillo (Loja). Muchos factores pueden haber influido sobre el fracaso en el establecimiento de los aislamientos, cuyo éxito se calcula entre el 1-2% (Walker, 1997) con el material proveniente del campo. Factores como la agricultura intensiva, aplicación continua de fungicidas y periodos largos de barbecho podrían influir sobre la viabilidad esporas de HMA (Morton, 1993; Walker, 1997; Cuenca *et. al.* 2003; Serralde y Ramirez, 2004). Debido a que no se hicieron ensayos de viabilidad en el presente estudio es difícil corroborar esta hipótesis. En un estudio realizado por Salas en el 2010 (datos no publicados) con las mismas condiciones de cultivo y con igual número de intentos de aislamiento de HMA provenientes de esporas encontradas en la zona de la rizósfera de una especie silvestre de papa, se obtuvieron 6 aislamientos exitosos de HMA. Lo que podría reflejar que la viabilidad de las esporas colectadas en las zonas agrícolas fue menor.

8. CONCLUSIONES

La producción de papa en el Ecuador tradicionalmente se desarrolla en la región sierra. (Andrade, 2002). De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible que la asociación mutualista HMA sobre las variedades de papas estudiadas se encuentre afectada por factores como las prácticas de cultivo intensivas entre ellas: labranza del suelo y el uso indiscriminado de insumos agroquímicos (Jeffries *et. al.*2003), que hace que estas poblaciones disminuyan al igual que su infectividad y permanencia provocando que el éxito de la simbiosis micorrizica sea escaso en los lugares de la región sur del Ecuador donde producen este tubérculo se vean afectados por este tipo de factores.

Desde el punto de vista del porcentaje de colonización existe una correlación entre los porcentajes encontrados en el campo con los encontrados en las raíces de los cultivos trampa. Algunas investigaciones sugieren que la mejor manera de asegurar la viabilidad de las esporas de HMA es a través de su multiplicación en cultivos trampa en invernadero (Harries *et al.* 2009), lo que incrementa las posibilidades de obtener aislamientos.

El intento de aislamiento de especies puras de HMA en cultivos trampas no se pudo efectuar debido a causa al bajo porcentaje de colonización obtenidos en los mismos.

A través de los resultados obtenidos en el presente trabajo y las investigaciones similares analizadas en el mismo nos permiten concluir que la simbiosis micorrizica arbuscular en los cultivos de papa (*S. tuberosum*) en el Sur del Ecuador se encuentra disminuida.

9. PERSPECTIVAS

Dada la importancia de los HMA por sus múltiples beneficios sobre las comunidades vegetales, el presente trabajo pretende aportar la información necesaria para usarla en futuras investigaciones dentro del proyecto VALORAM que se lleva a cabo en el CBCM de la UTPL.

Hasta ahora no existen estudios que se hayan hecho para evaluar el grado de dependencia de distintas variedades de papa a los HMA, por lo que creemos que se debería hacer un estudio más profundo al respecto.

Proporcionar a los agricultores la manera correcta de seleccionar el manejo agrícola apropiado para conservar tanto la biodiversidad de los hongos micorrízicos arbusculares como el mantenimiento de los suelos.

Realizar estudios con la finalidad de controlar la calidad y la mayor producción de este tubérculo evitando desequilibrar el ecosistema.

10. BIBLIOGRAFIA:

- Aguilera L., Portugal V., Arriaga M., Contreras R., 2007, Micorrizas Arbusculares; Redalyc, Vol. 14, pag.300-3006.
- Alarcón A., Ferrera Cerrato R., 1999, Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas, Terra Latinoamericana Vol. 17, 179-191.
- Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., 2004, Biotecnología de los hongos micorrizicos arbusculares, Campo Experimental Rio Bravo, INIFAP y Centro de Biotecnología Genómica, IPN, Rio Bravo Tam. México pp 1-9.
- Alarcón A., M.C. González-Chávez, R. Ferrera-Cerrato y A. Villegas-Monter. 2000. Efecto de hongos micorrizicos arbusculares en la dinámica de aparición de estolones y nutrición de plantas de fresa cv. Fern obtenidas por cultivo in vitro. Revista Terra 18(3) 211-218.
- Andrade H., Bastidas O., Sherwood S., 2002, La papa en Ecuador, en : Pumisacho M., Sherwood S.(Eds.), Cultivo de Papa en el Ecuador INIAP-CIP, Ecuador , pp 21-28.
- Atkinson D., 2009, Soil microbial resources and agricultural policies. Mycorrhizas functional processes and ecological impact. 1:1-15.
- Clark R., Zeto S., 2000, Mineral acquisition by Arbuscular Mycorrhizal plants, J. Plants Nutr. 23: 867-902.
- Condorí B., Devaux A., Mamani P., Vallejos J., Blajos J., 1997. Efecto residual de la fertilización del cultivo de Papa sobre el cultivo de Haba (*Vicia faba L*) en el sistema de rotación. Revista latinoamericana de la Papa, vol. 9 (10), pp. 171-187.
- Covacevich F., Echeverría H., Aguirrezabal I., 2001., Comparación de dos técnicas de cuantificación de infección micorrizica., Ciencia del Suelo 19 (2) pp. 155.
- Cuenca G., De Andrade Z., Lovera M., Fajardo L., Meneses E., Márquez M. y Machuca R., 2003, Pre-selección de plantas nativas y producción de inóculos de hongos micorrizicos arbusculares (HMA) de relevancia en la rehabilitación de áreas degradadas de la Gran Sabana, estado Bolívar, Venezuela, Ecotropicos Sociedad Venezolana de Ecología 16(1):27-40 2003

- Fernández Northcote E.N., 2001, Proceedings of the international workshop Complementing Resistance to Late Blight (*Phytophthora infestans*) in the Andes, February 13-16, Cochabamba, Bolivia.
- Gemma J., Koske R., Habte M., 2002., Mycorrhizal dependency of some endemic and endangered hawaiian plant species., American Journal of Botany 89(2): 337–345.
- Gendermann J., 1955, Relation of a large soil-borne spore to *phycomycetous* mycorrhizal infections, Mycological, 47: 619-632.
- Gerdemann J., Nicolson T., 1963, Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting, Trans. Brit. Mycol. Soc. 46: 235-244.
- Govers, 2001, Misclassification of pest as 'fungus' puts vital research on wrong track. Nature correspondence. Macmillan ed.
- Guadarrama P., Camargo S., Hernández L., Castillo S., 2007. Los Hongos Micorrízicos Arbusculares de la región de Nizanda, Oaxaca, Mexico. Boletín de la sociedad botánica de México número 081. Pp. 131-137.
- Harrier L.A., 2001, The arbuscular mycorrhizal symbiosis :a molecular review of the fungal dimension, Journal of experimental botany, Vol. 52, Roots special issue, pp 469-478.
- Hetrick B., Wilson G., Cox T., 1993, Mycorrhizal dependence of modern wheat cultivars and ancestors: a synthesis., Can. J. Bot. 71: 512-518.
- Hijri I., Ykorova Z., Oehl F., Ineichen K., Mader P., Wiemkem A., y Redecker D. 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in the diversity. Molecular Ecology. Jul; 15(8)pp: 2277-89.
- Honrubia M., 2009, Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años, Departamento de Biología Vegetal (Botánica), Facultad de Biología, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia, E-30100 Murcia, España
- <http://invam.caf.wvu.edu>, Septiembre 2010.
- <http://www.biología.edu.ar/fungi/micorrizas.htm>, Agosto 2010

- http://www.cipotato.org/pressroom/facts_figures/improve_ment_conservation.asp, Noviembre,2009
- <http://www.mmar.es/natural/archives/2704> ,Octubre 2010.
- Jansa J, Mozafar A., Anken T., Ruh R., Sanders I., Frossar E., 2002, Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil, *Mycorrhiza*,12:225–2.
- Jeffries P., Gianinazzi S., Perotto S., Turnau K., Barea J., 2003, The contribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility, *Biol. Fertil. Soils*, 37: 1-16.
- Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reported*. 48: 692.
- Johnson N., 1993, Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae, *Ecological Applications*, 3: 749-757.
- Kaeppler S., Parke J.,Mueller S., Senior L.,Struber C., Tracy W., 2000, Variation among maize in bread lines and detection of quantitative trait loci for growth at low phosphorous and responsiveness to arbuscular mycorrhizal fungi, *Crop Science* 40: 358-364.
- León D., 2006, Evaluación y Caracterización de Micorrizas Arbusculares asociadas a yuca (*Manihot esculenta* sp) en dos regiones de la Amazonía colombiana. Trabajo de grado como requisito parcial para la obtención del título de Microbiólogo Agrícola y Veterinaria, Universidad Pontificia Javeriana, Colombia.
- Morton J., Ventibenga S., Wheeler W., 1993, Germ plasm in International Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) procedure for culture development documentation and storage., *Mycotaxon* 48: 491- 528.
- Oehl F., Sieverding E., Ineichen K. Mader P., Boller T., 2003. Impact of Land use Intensity on the Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungy in Agroecosystems of Central Europe. Switzerland. *Molecular Ecology*,pp: 2277-2289.
- 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: 157-160.

- Piñon E., 2009, Potenciales de micorrización en suelos de bosque mesófilo de montaña con diferentes historias de uso, Tesis para la obtención de maestría en ciencia en conservación y aprovechamiento de recursos naturales (Biodiversidad del Neotrópico), Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, México.
- Rivera R., Fernández K., 2003, El manejo eficiente de la simbiosis micorrizica, una vía hasta la agricultura sostenible, Instituto Nacional de Higiene, Cuba, ISBN: 959-7023-24-5.
- Romero M., Trinidad A., García R., Ferrera R., 2000, Producción de papa y biomasa microbiana en suelos con abonos Orgánicos y minerales, Agrociencia vol. 34 (3), pp. 261/269.
- Ruiz-Lozano, J.M., Gómez, M., Núñez, R. y Azcón, R. 2002. Mycorrhizal colonization and drought stress affect ¹³C in ¹³CO₂-labeled lettuce plants. *Dinamarca. Physiologia Plantarum* 109: 268-273.
- Ryan M., Graham J., 2002, Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture?, *Plant and Soil*, 244: 263- 277.
- Salas E., 2003, Las micorrizas y su importancia para el manejo y la conservación de los árboles del trópico, Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Costa Rica.
- Salas E., Blanco F., 2000, Selección de plantas hospederas y efecto del fósforo para la producción de inóculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares por el método de cultivo en macetas, *Agronomía costarricense*, 24 (1), 19-28.
- Schussler. A., Schwarzott D., Walker C., 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and Evolution. *Mycol. Res.* 105 (12) : 1413-1421.
- Serralde A., Ramírez M.; 2004; Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos; *Revista Corpoica*, Vol. 5 N°1, pp 31-39.

- Sieverding, E. 1984. Curso Nacional sobre Micorrizas; Aspectos básicos de la investigación en micorrizas vesiculoarbusculares. Universidad Nacional de Palmira.
- Smith S., Read D., 1997, Mycorrhizal Symbiosis, 2nd Edition, Academic Press, London.
- Smith S., Read D., 2008, Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. London, UK. 787 p.
- Trouvelot A, 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En 'Physiological and genetical aspects of mycorrhizae'. Gianinazzi-Pearson V and Gianinazzi S eds., Inra, Paris, 101-109.
- Van der Heijden, M.G.A. 1998, Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity, *Nature* 396, 69–72.
- Varela L, Trejo D.; 2001, Los Hongos Micorrízicos Arbusculares como componentes de la Biodiversidad en el suelo de México, Redacyl, Acta Zool. Mex. (ns). 1: 39-51.
- Varma, A. (ed.) Mycorrhiza, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008; Ajit Varma Editor. Mycorrhiza. State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics. Third Edition
- Walker, C. 1997. *Scutellospora spinosissima* sp nov, A newly described Glomalean fungus from low nutrient communities in Venezuela. *Ann. Bot.* 82: 721-725.
- Walker. C., 1999., Methods for culturing and isolating arbuscular mycorrhizal fungi., Mycorrhiza News 11(2).

11. ANEXOS

ANEXO 1: PLANTAGO LANCEOLATA



Llantén menor: (*Plantago lanceolata*) L. es una especie de planta herbácea perenne natural de toda Europa, Norteamérica y Asia occidental donde crece en terrenos secos, taludes, bordes de caminos y lugares no cultivados.

Características

Es una planta herbácea vivaz sin tallos ramificados y con tallos florales que alcanzan 30-50 cm de altura, tiene un rizoma corto del que brotan muchas raicillas de color amarillo. Las hojas, algo dentadas y radicales están dispuestas en una roseta basal en la base del tallo, tienen de 3-7 nervaciones longitudinales que se estrechan y continúan en el peciolo. La inflorescencia terminal es una espiga densa con flores muy pequeñas de color blanca o purpúrea. El fruto es un pixidio con 4-16 semillas.

Nombre vernáculo:

Castellano: alpiste pajarero, calracho, carmel, carrajó, hierba de las almorranas, la de las almorranas, liantel, llanté, llantel, llanten, llantén, llantén de cinco nervios, llantén de hoja estrecha, llanten de hojas de lanza, llantén de hojas estrechas, llantén de siete nervios, llantén lanceolado, llantén menor, llanter, michitos, orejillas de liebre, pelosilla, planta de las almorranas, plantaina, raíz de las almorranas, rampetes, siete nervios, sietevenas, lengua de oveja *Catalán (Català)*: *Plantatge de fulla estreta* *Vascuence (Euskera)*: *ezpata-bedarra*.

