



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE INGENIERO EN GESTIÓN AMBIENTAL

“Inoculación *in vitro* de hongos micorrízicos (MUCL 46238; MUCL 43204) en *Cinchona officinalis*.”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Feijoo Blacio Dennis Emanuel

DIRECTOR: Lucero Mosquera Hernán Patricio, Ing.

LOJA – ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Ingeniero.

Hernán Patricio Lucero Mosquera

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: "INOCULACIÓN *IN VITRO* DE HONGOS MICORRIZICOS (MUCL 46238; MUCL 43204) EN *CINCHONA OFFICINALIS*." realizado por Dennis Emanuel Feijoo Blacio ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2014

f).

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Dennis Emanuel Feijoo Blacio declaro ser autor del presente trabajo de fin de Titulación: INOCULACIÓN IN VITRO DE HONGOS MICORRICICOS (MUCL 46238; MUCL 43204) EN CINCHONA OFFICINALIS, de la Titulación Gestión Ambiental 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. 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”

f.....

Autor: Dennis Emanuel Feijoo Blacio

Cédula: 1104049315

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios por bendecirme a cada momento, a mis padres Gonzalo y Norma que con su gran esfuerzo me han educado y me han apoyado siempre, a mi hermano Gonzalo por su ayuda y consejos a cada momento, finalmente a mi esposa Abigail por su ayuda constante y por estar siempre a mi lado.

Dennis

AGRADECIMIENTO

Mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Técnica Particular de Loja por haberme formado en ciencia y en conciencia, a la titulación de Gestión Ambiental por todas sus gestiones para mi aprendizaje, al Ing. Hernán Lucero por su dedicación, enseñanza a cada momento lo cual ha contribuido a la realización de este trabajo.

Dennis Feijoo Blacio

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
Lista de tablas.....	VII
Lista de figuras	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO.....	XI
INTRODUCCIÓN	XII
CAPÍTULO I	- 1 -
1.1 Generalidades de la <i>Cinchona</i>	- 2 -
1.1.1 Etimología.....	- 2 -
1.1.2 Generalidades y usos.....	- 2 -
1.1.3 Descripción taxonómica	- 3 -
1.1.4 Ubicación geográfica en el Ecuador	- 3 -
1.1.5 Descripción.....	- 3 -
1.2 MICORRIZAS:	- 4 -
1.2.1 Definición:	- 4 -
1.2.2 Clasificación Morfológica de Micorrizas:.....	- 4 -
1.3 HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA)	- 6 -
1.3.1 Descripción de los HMA	- 6 -
1.3.2 Filogenia de los Hongos Formadores de Micorriza Arbusculares (HFMA).....	- 6 -
1.3.3 Arquitectura de la micorriza Arbuscular	- 8 -
1.3.4 Multiplicación de inóculo Micorrízico:.....	- 10 -
1.3.5 Plantas hospederas:	- 11 -
1.3.6 Desarrollo de la simbiosis.....	- 11 -
1.4 Cultivo monoxénico:.....	- 14 -
1.4.1 Cultivo monoxénico:.....	- 14 -
1.4.2 Beneficios de los hongos micorrízicos en plantas micropropagadas.....	- 14 -
1.4.3 Raíces Hospederas transformadas:.....	- 14 -
1.4.4 Efectividad e infectividad de los HMA:	- 15 -
CAPÍTULO II	- 15 -
Metodología.....	- 16 -
2.1 Localización de la Investigación	- 16 -

2.1.2 Fases de la investigación	- 16 -
2.2 Multiplicación del inóculo a utilizar (cepas: 46238; 43204).....	- 17 -
2.3 Obtención de <i>Cinchona officinalis</i>	- 17 -
2.4 Obtención de <i>Medicago truncatula</i> (plántula donadora de micelio)	- 19 -
2.5 Desarrollo del diseño experimental	- 20 -
2.6. Parámetros evaluados.....	- 22 -
2.7. Determinación del porcentaje de colonización de las plantas <i>Cinchona officinalis</i>	- 22 -
CAPÍTULO III	- 23 -
Resultados y Discusión	- 24 -
3.1 Multiplicación del inóculo a utilizar (cepas: 46238; 43204).....	- 24 -
3.2 Banco plántulas de <i>Cinchona officinalis</i>	- 25 -
3.3 Banco de plántulas de <i>Medicago truncatula</i> (plántula donadora de micelium)	- 25 -
3.4 Análisis de Mortalidad de las especies utilizadas.....	- 26 -
3.5 Variables morfológicas	- 26 -
3.6 Evaluación de las plántulas de <i>Cinchona officinalis</i> inoculadas con las cepas (MUCL 43204; MUCL 46238).....	- 27 -
3.7 Porcentaje de micorrización de plántulas de <i>Cinchona officinalis</i> inoculadas con las cepas (MUCL 43204; MUCL 46238).....	- 30 -
CONCLUSIONES	- 29 -
RECOMENDACIONES	- 30 -
BIBLIOGRAFÍA	- 31 -
ANEXOS	- 39 -
Anexo 1.....	- 39 -
Anexo 2.....	- 40 -
Anexo 3.....	- 41 -
Anexo 4.....	- 43 -

Lista de tablas

Tabla 1: Porcentaje de Mortalidad y supervivencia en el tratamiento.	- 26 -
---	--------

Lista de figuras

Figura 1: Principales estructuras de los tipos de micorrizas.....	- 5 -
Figura 2: Representación de un hongo Micorrízico Arbuscular	- 6 -
Figura 3: Árbol filogenético de Glomeromycota.....	- 8 -
Figura 4: Estructura de los Hongos Micorrízicos Arbusculares	- 10 -
Figura 5:(a) Morfología Arum tipo arbusculos. (b) Morfología intracelular tipo Paris.	- 13 -
Figura 6: Proceso de multiplicación del inóculo.....	- 17 -
Figura 7: Repique de <i>Cinchona</i>	- 17 -
Figura 8: <i>Cinchona</i> en etapa de crecimiento	- 18 -
Figura 9: Material para desinfección de semillas de <i>Cinchona</i>	- 18 -

Figura 10:Desinfección de semillas.....	- 19 -
Figura 11: Germinación de <i>Cinchona</i>	- 19 -
Figura 12:Germinación de <i>Medicago truncatula</i>	- 20 -
Figura 13: Esquema de la abertura de los orificios.....	- 21 -
Figura 14:Inoculación de las cepas de hongos en <i>Medicago truncatula</i>	- 21 -
Figura 15 : Diseño final concluido.....	- 22 -
Figura 16:Raíces de Cichorium.....	- 24 -
Figura 17:Raíces de <i>Cichorium</i> inoculadas las esporas de los hongos.	- 24 -
Figura 18: Plántulas de <i>Cinchona officinalis</i>	- 25 -
Figura 19: <i>Medicago truncatula</i>	- 26 -
Figura 20:Raíz de <i>Cinchona</i> cambiando su morfología	- 27 -
Figura 21: Hifas colonizando raíces de <i>Cinchona officinalis</i>	- 28 -
Figura 22 : Presencia de vesículas.....	- 28 -
Figura 23:Abundancia de Vesículas.....	- 29 -

RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son organismos del suelo responsables de la simbiosis mutualista que se establece entre hongos del Phylum Glomeromycota y la mayoría de plantas vasculares, es de gran importancia en los sistemas agrícolas porque tiene la capacidad de incrementar la absorción de nutrientes, principalmente fósforo y beneficios como: estimulación del crecimiento, resistencia al ataque de plagas, tolerancia a estrés hídrico y contribuye a mejorar la estructura del suelo. Las plantas de *Cinchona* producen un metabolito conocido como “quinina”, que ha demostrado propiedades antimaláricas. En el presente proyecto se basó en el diseño experimental en la inoculación de las cepas: MUCL 46238 *Rhizophagus clarus* y MUCL 43204 *Rhizophagus irregularis* en *Cinchona officinalis*. Al final evaluamos porcentaje de colonización micorrízica, mortalidad y variables morfológicas como coloración de la raíz. Los resultados mostraron efectos positivos en tratamientos con HMA. La asociación *Cinchona officinalis* inoculadas las dos cepas (MUCL43204 y MUCL 46238) demostró un porcentaje de colonización del (74%), donde se reveló el efecto que estos tienen sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de *Cinchona officinalis* en condiciones *in vitro*.

Palabras clave: *Cinchona officinalis*, hongos micorrízicos arbusculares, inoculación, cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are soil organisms responsible for mutualistic symbiosis established between fungi of the phylum Glomeromycota and most vascular plants, is of great importance in agricultural systems because it has the ability to increase the absorption of nutrients, mainly phosphorus and benefits: stimulating growth, resistance to pests , tolerance to water stress and helps to improve soil structure . Cinchona plants produce a metabolite known as "quinine" , which has proven antimalarial properties. This draft was based on the experimental design in the inoculation of the strains: MUCL MUCL 46238 and 43204 *Rhizophagus clarus* *Rhizophagus irregularis* in *Cinchona officinalis*. Finally we evaluated percentage of mycorrhizal colonization, mortality and morphological variables as color of the root. The results showed positive effects in treatment with HMA. The association *Cinchona officinalis* inoculated both strains (MUCL43204 and MUCL 46238) showed a percentage of colonization (74 %), where the effect these have on growth and development of seedlings of *Cinchona officinalis* in vitro conditions was revealed.

Keywords: *Cinchona officinalis*, arbuscular mycorrhizal fungi, inoculation, cultivation *in vitro*.

FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

Fin del Proyecto:

- Dilucidar el efecto de las comunidades de HMA asociados a *Cinchona officinalis* en etapa *in vitro*.

- Aportar información para desarrollar, utilizar y aplicar técnicas y/o métodos para el cultivo *in vitro* de HMA con el fin de incentivar su uso en el campo agrícola como biofertilizantes de primera elección.

Propósito del Proyecto “Inoculación *in vitro* de hongos micorrizicos (MUCL 43194; MUCL 46238; MUCL 43204) en *Cinchona officinalis*.”

- Evaluar la inoculación de HMA en plántulas *in vitro* de *Cinchona officinalis*.

- Fortalecer estudios ya realizados en la universidad, dentro del departamento de Ciencias Naturales en el campo de las micorrizas y *Cinchona officinalis*.

Componentes del Proyecto (productos).

Los resultados que se esperan son:

- Co-cultivar *in vitro* *Cinchona officinalis* y HMA (cepas MUCL).

- La factibilidad de Inoculación *in vitro* de *Cinchona Officinalis* con esporas de 2 cepas de HMA:
 - ✓ MUCL 46238 *Rhizophagus clarus* (Cuba).
 - ✓ MUCL 43204 *Rhizophagus irregularis* (Canadá).

- Evaluar la inoculación de HMA en *Cinchona officinalis*.

INTRODUCCIÓN

Las quininas o cascarillas son especies del género *Cinchona*, se distribuyen a lo largo de la zona tropical y ecuatorial de la cordillera de los Andes desde los 12° de latitud norte hasta los 20° de latitud sur (Andersson y Taylor, 1994). Dentro de este género existen especies endémicas localizadas en pequeñas áreas geográficas, como *Cinchona officinalis* que sólo se encuentra en el valle de Loja, al sur de Ecuador. (Garmendia, 2005) (Andersson y Taylor, 1994).

Sus hojas son de color verde con pequeñas flores, productoras de semillas y pueden alcanzar una altura que puede llegar los 25 metros (Garmendia, 2005).

Las plantas de *Cinchona* producen un metabolito conocido como “quinina”, que ha demostrado propiedades antimaláricas; además se le atribuye su uso para, estimular el apetito, tonificar el organismo, para casos de estrés psíquico y físico y en convalecencias, arritmias cardíacas, estimular el crecimiento del cabello y evitar su caída (Garmendia, 2005); por lo tanto es de gran importancia dentro de la industria farmacéutica. (Mahecha *et al.* 2004).

En los bosques de Cajanuma y Uritusinga ubicados en la provincia de Loja se explotó la cascarilla hasta el siglo XIX, debido a sus propiedades medicinales por el contenido de metabolitos secundarios (alcaloides) en su corteza (Nieto, 2000).

Las poblaciones naturales de esta especie se están reduciendo principalmente por prácticas de quema en agricultura migratoria y explotación de la madera (Mejía *et al.* 2012).

Todos estos antecedentes resaltan la necesidad de aplicar técnicas de propagación asexual y sexual en condiciones de cultivo *in vitro*, como una herramienta para la conservación y rescate de las especies útiles (González *et al.* 2002).

El término micorriza deriva del griego: mico (hongos) y rhyza (raíz), que es una simbiosis entre las raíces de la mayoría de las plantas y ciertos hongos del suelo (Hernández *et al.* 2000), (Read *et al.* 1999). La micorriza arbuscular (MA) es el microorganismo del suelo responsable de la simbiosis mutualista que se establece entre hongos del Phylum Glomeromycota y la mayoría de plantas vasculares (Schübler *et al.* 2001); (Smith y Read *et al.* 2008), es de gran importancia en los sistemas agrícolas (Gosling *et al.* 2006), y tiene capacidad de incrementar la absorción de nutrientes poco móviles, principalmente fósforo (P) (Sanders y Tinker *et al.* 1971) (Nakano *et al.* 2001).

Además, la Micorriza Arbuscular confiere a la planta otros beneficios, tales como: estimulación del crecimiento, resistencia al ataque de plagas y enfermedades, tolerancia a estrés hídrico, y contribuye a mejorar la estructura del suelo (Bethlenfalvay y Linderman *et al.* 1992); (Varma *et al.* 2008).

El cultivo monoxénico, es una técnica que ha logrado producir cultivo *in vitro* de raíces, a las cuales se les ha inoculado esporas de hongos MA previamente

desinfectadas, de tal forma que se la asociación micorrízica *in vitro* sin la necesidad de contar con una planta hospedera completa (Bago *et al.* 2000).

Esta técnica ofrece propágulos puros, estériles, libre de contaminantes, que hasta ahora no ha sido posible lograrlo utilizando los modos convencionales de cultivo en macetas Otra ventaja que ofrece es el aumento en la producción de esporas/propágulos el cual se logra en menos tiempo y espacio (Fortin *et al.* 2002).

El objetivo de nuestro estudio se basa en dilucidar el efecto de las comunidades de HMA asociados a *Cinchona officinalis* en etapa *in vitro*.

También aportar información para desarrollar, utilizar y aplicar técnicas y/o métodos para el cultivo *in vitro* de HMA con el fin de incentivar su uso en el campo agrícola como biofertilizantes de primera elección, mediante el uso de cultivos monoxénicos, una técnica que ha conseguido producir el cultivo *in vitro* de raíces que han sido inoculados con esporas previamente desinfectados en medios sintéticos anteriormente. Por consiguiente, el uso de estos microsimbiontes podría tenerse en cuenta en el diseño de cualquier sistema de producción agrícola, ya que se consideran como sustitutos biológicos de los fertilizantes minerales (Castillo *et al.* 2009).

CAPÍTULO I

1.1 Generalidades de la *Cinchona*

1.1.1 Etimología

Género dedicado a Ana Osorio, esposa de Luis J. Fernández de Cabrera y Bobadilla, conde de Chinchón, que logró curarse gracias a la corteza de quina o cascarilla de la fiebre palúdica que padecía en 1632 (Loayza y Sánchez, 1996). De la corteza se obtiene la quinina el más antiguo medicamento para controlar la malaria.

1.1.2 Generalidades y usos

La *Cinchona* también conocida como “cascarilla o árbol de quina”, pertenece a la familia *Rubiaceae*. Generalmente son árboles de tamaño mediano a pequeño o también arbustos con corteza amarga (Garmendia, 2005). (**Fig. 1**). Se encuentra ampliamente distribuida desde Costa Rica hasta Bolivia con más de 40 especies. Son de color verde con pequeñas flores, productoras de semillas y pueden alcanzar una altura que puede llegar los 25 metros o un poco más (Garmendia, 2005).

Las plantas de *Cinchona* producen un metabolito conocido como “quinina”, que ha demostrado propiedades antimaláricas para combatir fiebres especialmente en el paludismo, además se le atribuye su uso para, estimular el apetito, tonificar el organismo, para casos de estrés psíquico y físico y en convalecencias, arritmias cardíacas, estimular el crecimiento del cabello y evitar su caída (Garmendia, 2005); por lo tanto es de gran importancia dentro de la industria farmacéutica (Mahecha *et al*, 2004).

Cinchona officinalis L:



Figura 1: Árbol de *Cinchona officinalis*

Fuente: González J, 2007.

1.1.3 Descripción taxonómica

Grupo: *Euasterids*.

Orden: *Gentianales*.

Familia: *Rubiaceae*.

Género: *Cinchona*.

Nombre científico: *Cinchona officinalis*.

Nombre común: Cinchona, cascarilla, quina.

1.1.4 Ubicación geográfica en el Ecuador

Es conocido como un árbol o arbusto nativo de los Andes que se encuentra entre los 1000 a 3500 msnm. En el Ecuador se encuentra ampliamente distribuido en las provincias de Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay, Morona, Zamora y Loja (Jorgensen y León, 1999). Según estudios realizados por (Garmendia, 2005), la especie *Cinchona officinalis* es una especie endémica de la región sur del Ecuador específicamente del valle de Loja.

1.1.5 Descripción

Cinchona officinalis es un árbol de 11 a 15 m de alto, de 30 a 40 centímetros de diámetro de tallo; ramificación simpodial; con copa globosa irregular, bastante densa.

La corteza externa es de color marrón oscuro, ligeramente fisurada y desprende pequeñas placas en forma irregular. La forma de la hoja varía de casi orbicular o lanceolada a elípticoovalada, de 8 a 27 cm de largo y 7 a 18 cm de ancho.

Las flores se encuentran en panículas terminales de 20 a 25 cm de longitud, son hermafroditas, actinomorfas; la corola es blanca-roja. Los frutos son cápsulas de color marrón oscuro, de forma elipsoide.

El desarrollo particularmente en los primeros años es rápido, los árboles de 6 a 8 años de edad pueden alcanzar 12 m de altura. Las ramas principales parten del tronco a una altura de más o menos 6 m, puesto que las ramas bajas son desechadas continuamente (Mahecha *et al*, 2004).

1.2 MICORRIZAS:

1.2.1 Definición:

El término micorriza proviene del griego: *myco*, (hongo), y *rhyza*, (raíz), este término fue acuñado por Frank en 1885, Casi todas las especies vegetales son susceptibles de formar simbiosis con micorrizas porque estas se encuentran en la mayoría de los hábitats naturales (más del 90% de todas las especies vegetales conocidas presentan al menos un tipo de micorriza) (Hernández, 2000).

Algunos de los beneficios que obtiene la planta con esta asociación son en el aumento del crecimiento aéreo y radicular gracias a la mayor absorción de nutrientes del suelo, especialmente de aquellos poco móviles como por ejemplo el fósforo, magnesio, calcio, potasio, azufre, hierro, cobre, boro y manganeso (Holguin *et al* 1996), además debido al mayor volumen de suelo explorado por las hifas, se incrementa la captación de agua a la planta, mejorando la tolerancia al estrés hídrico (Smith y Read 1997).

La diversidad funcional de los hongos micorrízicos provee la oportunidad de seleccionar un hongo adaptado específicamente al hospedero, medio ambiente y condiciones de suelo que optimiza el crecimiento de las plantaciones (Brundrett *et al*, 1996).

1.2.2 Clasificación Morfológica de Micorrizas:

Se pueden distinguir tres grupos fundamentales según la estructura de la micorriza formada (Read, 1999):

Ectomicorrizas: Este grupo de micorrizas se caracteriza por tener un manto compacto de hifas que cubre las raíces cortas con una red micelial, la cual crece entre las células corticales por lo que se la conoce como Red de Hartig(**Fig. 2a**).

Ectendomicorrizas: Tienen características intermedias entre las Ectomicorrizas y las Endomicorrizas (Read, 1999), pues presentan un manto muy reducido pero la red de Harting está bien desarrollada, además existe una ligera penetración de las hifas al interior de las células de la corteza radical, no existen vesículas ni arbusculos (Yu *et al* 2001)(**Fig. 2b**).

Endomicorrizas: Este grupo se caracteriza por no formar manto y las hifas penetran en las células de la epidermis y del córtex de la raíz (González *et al*, 2005). Por lo que una especie puede infectar a un gran número de especies vegetales, lo que las hace poco específicas. Son mucho menos sensibles a las agresiones externas que las

ectomicorrizas debido a que sus esporas germinan con facilidad alejadas de raíces vivas y pueden crecer considerablemente sin contacto con ninguna raíz (Rocha *et al*, 2009). Este grupo se subdivide en:

- *Ericoides*: estos hongos carecen de vesículas y arbusculos, sin embargo cuentan con estructuras intracelulares las cuales semejan a espirales que son estructuras típicas de estos hongos (Yu *et al* 2001). **(Fig. 2c)**
- *Orquidoideas*: Son micorrizas de orquídeas, tras penetrar en la células de la raíz forma ovillos dentro de la célula hospedera, así como agregados poco organizados de hifas (pelotones) que liberan los nutrientes cuando degeneran (Brundrett *et al* 1996). **(Fig. 2d)**
- *Arbusculares*: Se caracterizan por la penetración de las hifas del hongo en las células de la epidermis y córtex de la raíz y por la ausencia de manto sobre la superficie de la misma (Brundrett *et al* 1996). **(Fig. 2e)**

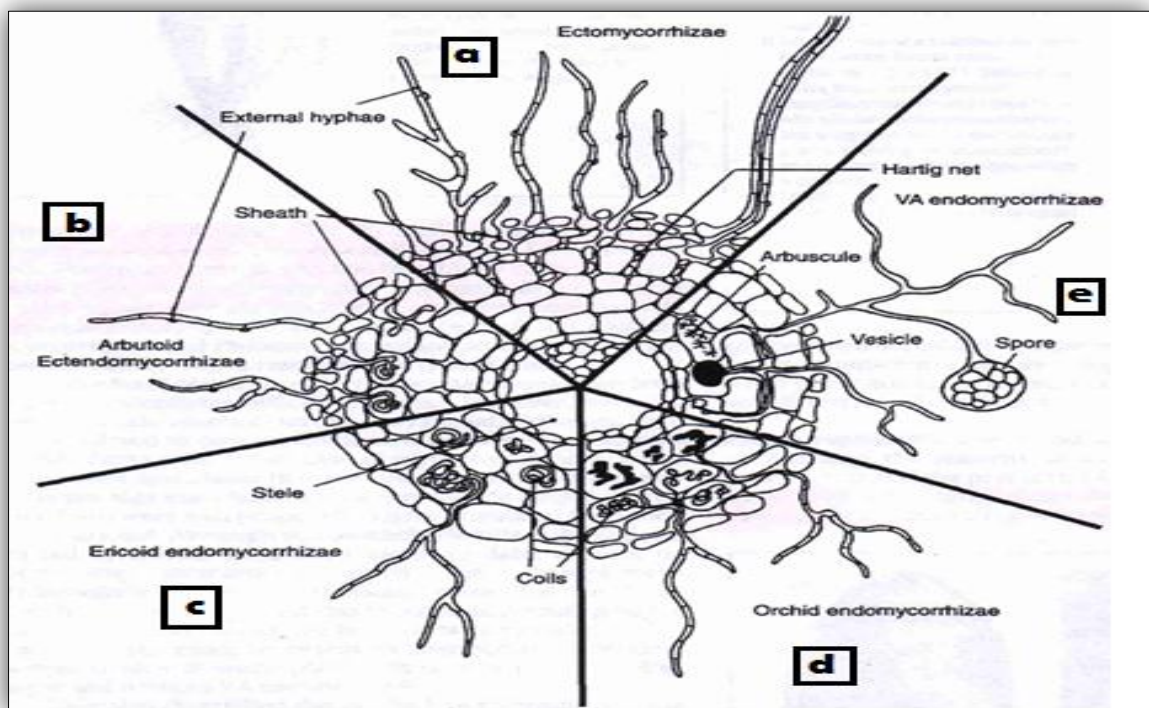


Figura 1: Principales estructuras de los tipos de micorrizas

Fuente: Selosse y Le Tacon F. (1998)

1.3 HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA)

1.3.1 Descripción de los HMA

Las micorrizas arbusculares son el resultado de la asociación mutualista entre algunos hongos del suelo y la raíz de la mayoría de las plantas. En ella, el micelio del hongo coloniza la corteza radical a modo de endófito y proyecta sus hifas tanto al interior como al exterior de la raíz (Forero *et al.*, 1996). Se estima que más del 80% de las plantas terrestres forman este tipo de asociación. Estas incluyen muchas especies de cultivo importantes en la agricultura y horticultura (Smith y Read, 1997).

Los hongos micorrízicos arbusculares se asocian con las raíces de la mayoría de las especies vegetales y les proporcionan múltiples beneficios: mayor captación de nutrientes, resistencia a las condiciones de estrés provocadas por patógenos de hábitos radicales, salinidad, sequía, acidez y elementos tóxicos (Holguin *et al* 1996). También son responsables de influenciar en la diversidad vegetal y la productividad en ecosistemas naturales (Van Derheijden, 1998). Estos hongos presentan un crecimiento intra e intercelular en la corteza de la raíz de la planta, una característica específica es la formación de estructuras intraradicales denominadas arbusculos que consisten en ramificaciones dicotómicas repetidas de un hifa, hasta dar una estructura similar a un árbol muy ramificado (**Fig. 3**). Los HMA son simbiontes obligados, de esta manera, esta simbiosis permite a las plantas captar fotosintatos que favorecen su desarrollo y propagación.

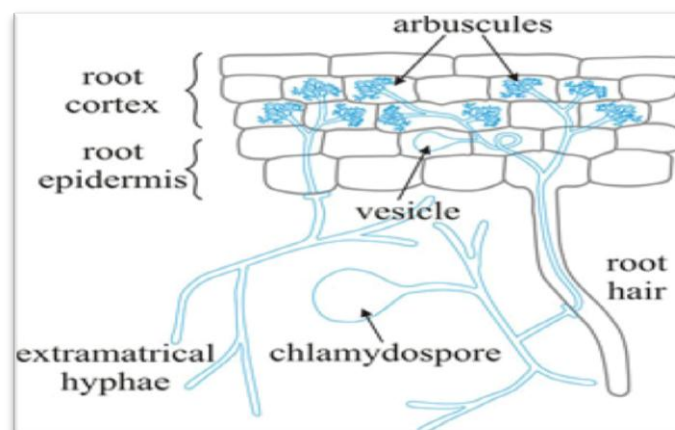


Figura 2: Representación de un hongo Micorrízico Arbuscular

Fuente:Moore-Landecker B. (1996)

1.3.2 Filogenia de los Hongos Formadores de Micorriza Arbusculares (HFMA).

La clasificación de los HFMA es complicada y ha sufrido numerosos cambios a lo largo de las últimas décadas. Hasta finales del año 2000 los HFMA formaban parte de la

clase de los Zigomicetos, y se agrupaban en un solo orden, los Glomales. Este orden estaba constituido por dos subórdenes (Glominae y Gigasporinae), tres familias (Glomaceae, Acaulosporaceae y Gigasporaceae) y seis géneros (*Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Scutellispora*). Actualmente se considera que pertenecen al Phylum Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001), con más de 150 especies descritas. Tradicionalmente, la identificación de los HFMA se ha basado en las características morfológicas de las esporas. Sin lugar a duda estas estructuras contienen una información taxonómica importante (Sieverding & Oehl, 2006), pero ésta puede llegar a ser limitada y confusa. Este nuevo Phylum es creado mediante estudios filogenéticos y a través de la secuencia de genes de la subunidad pequeña del ARNr. La aplicación de las técnicas moleculares ha permitido estructurar la taxonomía de estos hongos en cuatro órdenes en los que se incluyen nueve familias. Con base en estos estudios, separan a los hongos de un Phylum polifilético (Zygomycota) hacia otro que es aparentemente monofilético (Glomeromycota) (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).

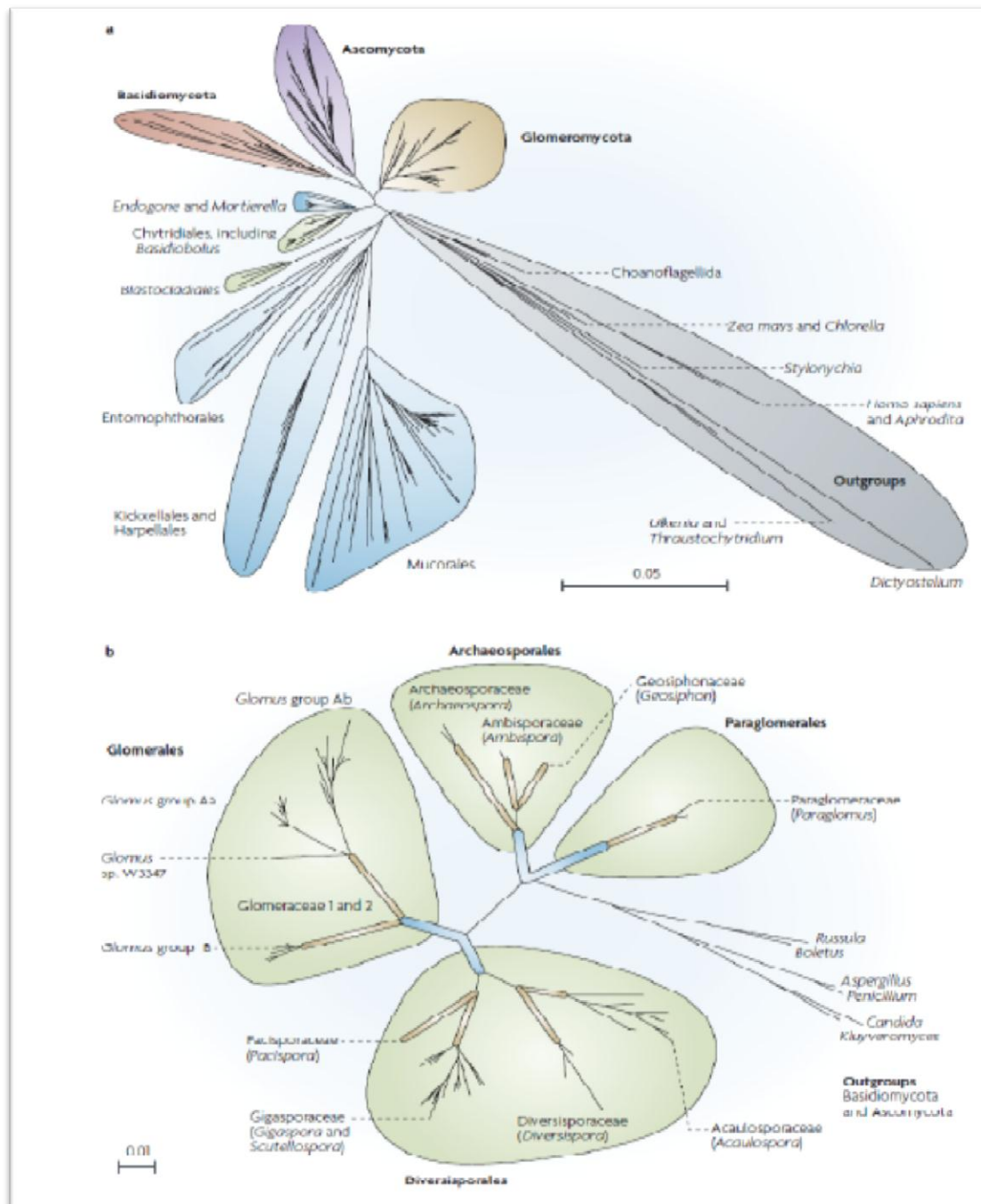


Figura 3:Árbol filogenético de Glomeromycota.

Fuente:Schüßler *et al.* (2001).

1.3.3 Arquitectura de la micorriza Arbuscular

1.3.3.1 Hifas

Las hifas son estructuras filamentosas que en conjunto forman un micelio.

Existen tres tipos de hifas: las intercelulares, intracelulares y las extraradicales.

1.3.3.1.2 *Hifas intercelulares:*

Son aquellas que crecen dentro de la pared de las células de la raíz **(Fig. 5a)**.

1.3.3.1.3 *Hifas intracelulares:*

Son aquellas que crecen entre la pared de las células de la raíz **(Fig. 5b)**.

1.3.3.1.4 *Hifas extraradiculares:*

Este tipo de hifas se clasifican en tres subtipos según su morfología y las funciones que llevan a cabo: hifas infectivas, son las que inician los puntos de colonización en una o varias raíces; hifas absorbentes son las que se encargan de explorar el suelo para la extracción de nutrientes y las hifas fértiles son las que llevan las esporas (Guzmán y Farías 2005). **(Fig. 5c)**.

1.3.3.2 *Apresorios*

Son apéndices, que se forman cuando una hifa hace contacto con la superficie de una célula epidérmica de la raíz (León, 2006), esta estructura facilita la penetración del hongo (García y Ocampo, 2002). **(Fig. 5d)**

1.3.3.3 *Vesículas*

Son órganos de paredes delgadas que almacenan lípidos y glicolípidos se forman a partir del hinchamiento de una hifa terminal (Holguin *et al* 1996). Las vesículas pueden ser inter o intracelulares y pueden ser encontradas tanto en el interior como en las capas externas del parénquima cortical. Estas no están presentes en todos los géneros de HMA (Mosse, 1981). **(Fig. 5e)**

1.3.3.4 *Arbúsculos*

Son minúsculas ramificaciones dicotómicas, sirven como sitio de intercambio nutrimental entre el hongo y el hospedero. Son de corta duración 9 a 15 días, al cabo de lo cual colapsan o son digeridos por la célula hospedera, después de un gran período de actividad metabólica. (Requena, 1996). **(Fig. 5f)**

1.3.3.5 *Células auxiliares*

Son estructuras abultadas de paredes delgadas, que se agrupan en las hifas extraradiculares. Puede presentar una superficie espinosa o lisa y son característicos de *Scutellospora* y *Gigaspora*, son abundantes durante la colonización temprana, pero

disminuyen durante la esporulación. Al parecer no funcionan como propágulos (Blaszkowski, 2003).

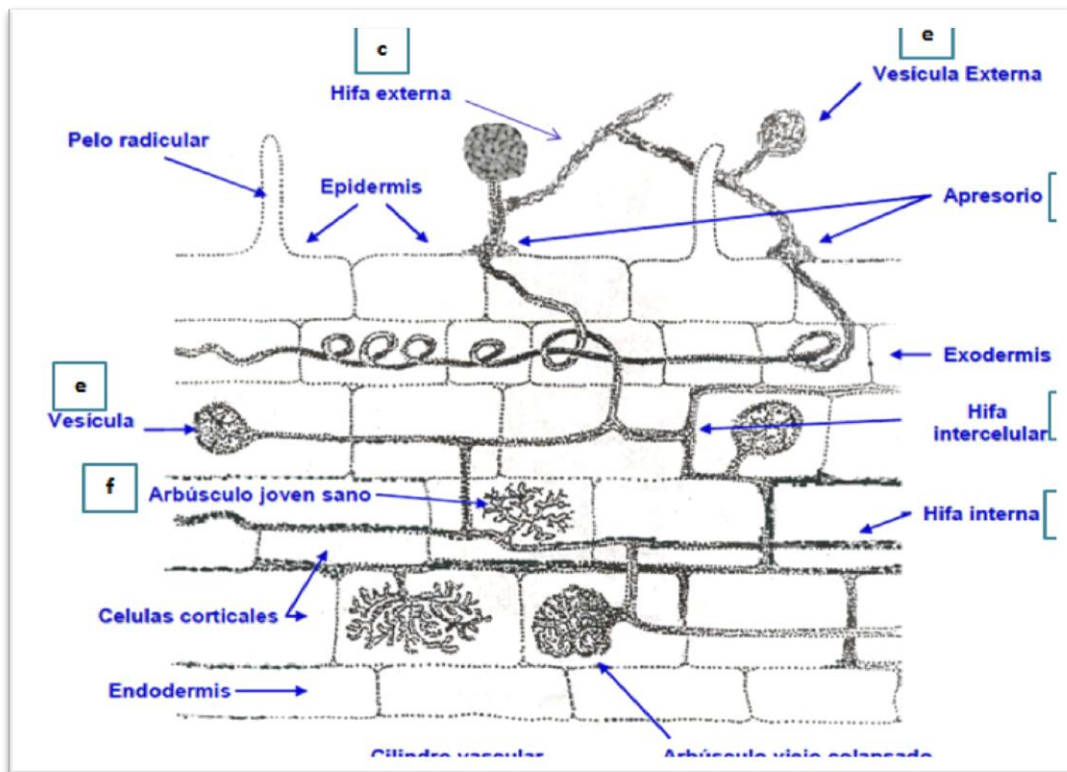


Figura 4: Estructura de los Hongos Micorrízicos Arbusculares

Fuente: Chung, P. 2005

1.3.4 Multiplicación de inóculo Micorrízico:

El carácter de simbiote obligado de los HMA conlleva al uso de plantas hospederas para que pueda completar su ciclo de vida (Usuga *et al* 2008).

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

Las muestras de suelo generalmente son tomadas de porciones cercanas a la raíz, éstas, pueden contener diferentes tipos de propágulos, pero son las esporas que por sus características morfológicas permiten la identificación de las especies (Brundrett *et al* 1996). Sin embargo las esporas provenientes de estas porciones de suelo pueden no estar en buenas condiciones para su identificación, por lo que el inóculo tiene que multiplicarse en plantas hospederas micorrizicas cultivadas en sustratos o suelo

estéril. Este sistema conocido como cultivo trampa permite multiplicar las especies nativas colectadas del campo (Sieverding, 1991)

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

1.3.5 Plantas hospederas:

Se ha demostrado que la asociación de HMA y plantas no es específica, puesto que cualquiera de los HMA puede colonizar a cualquiera de las plantas susceptibles de formar simbiosis (Brundrett *et al* 1996). Algunos hongos muestran un mejor grado de efectividad que beneficia el establecimiento de la micorriza bajo determinadas condiciones (Pozo, 1999).

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

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

1.3.6 Desarrollo de la simbiosis.

La formación de la micorriza arbuscular implica una serie de pasos a partir del reconocimiento de la superficie de la raíz por el hongo hasta la formación de un apresorio, la penetración de células epidérmicas, desarrollo de hifas intrarradicales y arbusculares, y en algunos casos, la formación de vesículas. Todos estos pasos están, sin duda bajo un control genético (Peterson *et al.* 2004).

La colonización comienza con la germinación de las esporas y esta fase es independiente de la raíz del hospedero. Si bien es cierto que la colonización puede estar determinada por ciertos factores edáficos, de manera que favorezcan el desarrollo del micelio, se ha considerado que esta no es un proceso totalmente

dependiente de la presencia de la planta (Smith y Read, 1997). Sin embargo, la presencia de algunos exudados de plantas no micotróficas es determinante en el retraso de la germinación y la reducción de la colonización (Schreiner y Koide, 1993).

En esta fase denominada asimbiótica se presentan señales bioquímicas relacionadas con compuestos volátiles que forman parte de los exudados de las raíces. Uno de ellos es el CO₂, que es fundamental para la germinación de esporas y el crecimiento de la hifa germinativa (Bécard y Piché, 1989). Sin embargo, éste no es el único compuesto involucrado en esta fase. Otros compuestos de los exudados radicales, como los flavonoides, favorecen ramificación de hifas (Vierheilig y Piché, 2002); es importante considerar que, raíces de maíz deficientes en producción de flavonoides, son colonizadas por HFMA, mostrando que los flavonoides no son esenciales para este proceso (Siquiera *et al.* 1991). Uno de los compuestos de los exudados de las raíces, denominadas —factor de ramificaciónII, que induce una amplia ramificación de hifas, fue identificada en *Lotus japonicus* como una strigolactona, la cual ha demostrado ser una señal de fundamental importancia en el desarrollo de la simbiosis (Akiyama *et al.* 2005).

Posterior a la germinación, el tubo germinal, una vez que llega a la epidermis de la raíz, debe recibir la señal procedente de ésta para dirigirse hacia ella y, a partir de ahí diferenciar y formar apresorio. En ausencia de un hospedero el crecimiento de la hifa con el tiempo se detiene, probablemente debido a la falta de moléculas de señalización a partir de los exudados radicales que estimulan la ramificación de las hifas (Tamasloukht *et al.* 2003); (Akiyama *et al.* 2005); (Besserer *et al.* 2006). La detención del crecimiento parece ser programada, con retracción controlada del citoplasma, núcleos y la producción de tabiques, lo que permite a la espora y al micelio mantener la viabilidad a largo plazo y la capacidad de germinar de nuevo y colonizar las raíces (Koske, 1981); (Logi *et al.* 1998), es por eso que antes de que la hifa agote sus reservas debe ser capaz de localizar las raíces e iniciar la formación del apresorio; es así que a partir del apresorio se inicia la penetración en la epidermis e inicia la colonización del tejido parenquimático de la raíz.

A partir de la penetración de las hifas, en la parte cortical de la raíz pueden desarrollarse, al interior de las células, dos clases morfológicas estructurales diferentes de micorriza arbuscular: tipo *Arum* y tipo *Paris* (Figura 6). (Gallaud, 1904) describió estas dos clases, en función de sus hábitos de desarrollo en las células corticales. En el primer caso, la colonización se desarrolla de manera extensiva intracelularmente, formando a intervalos regulares pequeñas ramificaciones laterales que penetran las paredes celulares y se ramifican dicotómicamente de forma repetida,

y en la parte terminal de las hifas se forman los arbusculos. En el tipo *Paris* no se observa desarrollo de las hifas intercelulares, pero existen enrollamientos extensivos de las hifas intracelulares que cruzan las células corticales, de las cuales se forman o no arbusculos muy pequeños en forma intercalada (Smith y Read, 1997); (Barker *et al.* 1998).

La formación de los arbusculos supone una alteración profunda de la célula vegetal, lo que se manifiesta principalmente por la deformación del plasmalema y del protoplasto para acomodar el arbusculo, el cual nunca penetra al citoplasma. Se produce igualmente una ordenación del citoesqueleto (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1981; Matsubara *et al.* 1999), lo que conlleva a un cambio en la posición del núcleo, que pasa a una posición central, y una fragmentación de la vacuola. El arbusculo es excluido del citoplasma del hospedero por una membrana periarbuscular (PAM) (Parniske, 2008).

La PAM es continua con la membrana plasmática de la planta, sin embargo, en esta se encuentran proteínas transportadoras de fosfato como PT4 que están ausentes en la membrana plasmática (Harrison *et al.* 2002). La vida media de los arbusculos es muy breve, aproximadamente 7 días (Alexander *et al.* 1989), transcurrido este tiempo los arbusculos se degeneran. Especies de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* no forman vesículas dentro de la raíz, pero en el micelio externo producen células auxiliares. La función biológica de las células auxiliares sigue siendo especulativa (Bonfante y Bianciotto, 1995). (Jabaji-Hare, 1988) observó grandes cantidades de lípidos dentro de las células auxiliares de una especie de *Gigaspora*. (De Souza y Declerck, 2003) sugieren que las células auxiliares pueden jugar un posible papel en el almacenamiento de carbono, para su uso como energía para la producción de esporas y el desarrollo y/o reparación del micelio.

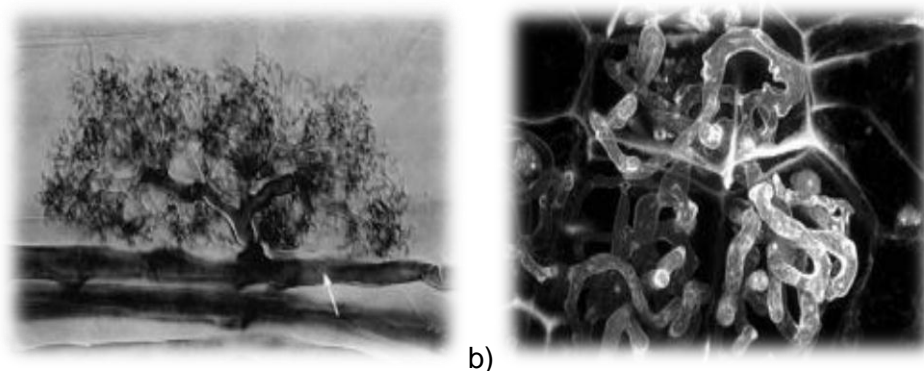


Figura 5:(a)Morfología Arum tipo arbusculos. (b) Morfología intracelular tipo Paris.

Fuente:Smith y Read 2008.

1.4 CULTIVO *IN VITRO* DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

1.4.1 Cultivo monoxénico:

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

Esta técnica ofrece propágulos puros, estériles, libre de contaminantes, que hasta ahora no ha sido posible lograrlo utilizando los modos convencionales de cultivo en macetas Otra ventaja que ofrece es el aumento en la producción de esporas/propágulos el cual se logra en menos tiempo y espacio (Fortin *et al* 2002).

La producción en masa de hongos MA se ha logrado con varias especies, pero *G. intraradices* sigue siendo el más indicado por el aumento de la producción de esporas obtenidos en cultivos de primeras investigaciones hasta la actualidad (Diop *et al.* 1994). Sin embargo, recientes estudios han demostrado el cultivo de *Scutellospora reticulata* y *Acaulospora rehmi*, mediante esta técnica (Dalpé y Declerck, 2002)

1.4.2 Beneficios de los hongos micorrízicos en plantas micropropagadas.

La transferencia de plántulas cultivadas *in vitro* a condiciones *ex vitro*, es uno de los pasos más importantes para la adaptación fisiológica a la fase de aclimatación (Kapoor *et al.* 2008). Durante la aclimatación, las plántulas deben aumentar la absorción de agua y minerales así como la tasa fotosintética (Grattapaglia y Machado, 1990). Los hongos micorrízicos son bien conocidos porque aumentan el vigor de las plantas por absorción de agua y nutrientes minerales, especialmente el fósforo; así mismo pueden proteger a las plantas contra ciertos patógenos de la raíz y mitigar los efectos de las variaciones extremas de temperatura el pH y estrés hídrico (Siqueira, 1994). Se han realizado numerosos estudios en la inoculación de hongos micorrízicos en la etapa de aclimatación o incluso bajo condiciones *in vitro* (Sbrana *et al.* 1994); (Elmeskaoui *et al.* 1995); (Sharma *et al.* 1996); (Siqueira *et al.* 1998); (Duponnois y Plenchette, 2003); (Kapoor *et al.* 2008); (Roveda *et al.* 2007).

1.4.3 Raíces Hospederas transformadas:

Agrobacterium rhizogenes es una bacteria gram negativa del suelo que induce un fenotipo particular denominado "raíz pilosa" en plantas dicotiledóneas. En las raíces transformadas con esta bacteria, un segmento de ADN de la bacteria, llamada la región T (ADN transferido) del plásmido Ri (inducción de la raíz) se incorpora a las

células de la planta hospedera (Chiltón *et al.*1982). La integración y la expresión de este ADN en el genoma de la planta provocará el desarrollo del fenotipo “raíz peluda” y la síntesis de un compuesto de bajo peso molecular llamada opina (Tepfer, 1989).

1.4.4 Efectividad e infectividad de los HMA:

El grado de efectividad de los HMA, puede verse afectado por muchos factores que influyen en el establecimiento y función de los mismos. Algunos estudios mencionan que las esporas de HMA inhiben su germinación bajo presión hídrica (Sieverding, 1991), así mismo la profundidad del suelo determina la supervivencia de estos endófitos, ya que a menor profundidad existe una mayor abundancia, y a mayor profundidad el grado de colonización de las raíces es menor (Tapia, 2003).

Particularmente al momento de seleccionar un potencial y apropiado inóculo se deben considerar el pH, el contenido de materia orgánica, así como el de fósforo del suelo ya que son parámetros que determinan en gran parte el desarrollo, las relaciones de los HMA y por ende su efectividad en las plantas hospederas (Williams *et al* 1992) . Existen datos de que comunidades de HMA disminuyen en suelos perturbados por la labranza y el manejo tecnificado (Jansa *et al* 2002). Para la restauración de un ecosistema degradado, los HMA utilizados deben ser apropiados para las condiciones edafoclimáticas, y para la producción de hongos nativos locales se requiere material de la zona (Rillig, 2004).

Sin embargo, en ocasiones la micorrización nativa puede presentarse en bajo número, o puede no ser tan efectiva para aumentar el crecimiento (Hamel, 1996). Por lo que es necesaria la inoculación incorporando HMA (nativos o no) con el fin de aumentar el crecimiento de las plantas. En el caso de que la inoculación se realice con HMA no nativos, debe considerarse que los suelos difieren en su receptividad a los microorganismos a ser introducidos (Covacevich y Echeverría, 2008). En este contexto la receptividad es un factor clave en la efectividad de los HMA no nativo que se lo define como la capacidad de un suelo para favorecer el desarrollo de la simbiosis luego de la inoculación (Plenchette, 2000)

Es importante conocer las diferencias estructurales y funcionales existentes entre las especies, con vista a seleccionar el hongo adecuado para cada interacción, lo cual permitiría tener resultados satisfactorios (Rodríguez *et al* 2004).

CAPÍTULO II

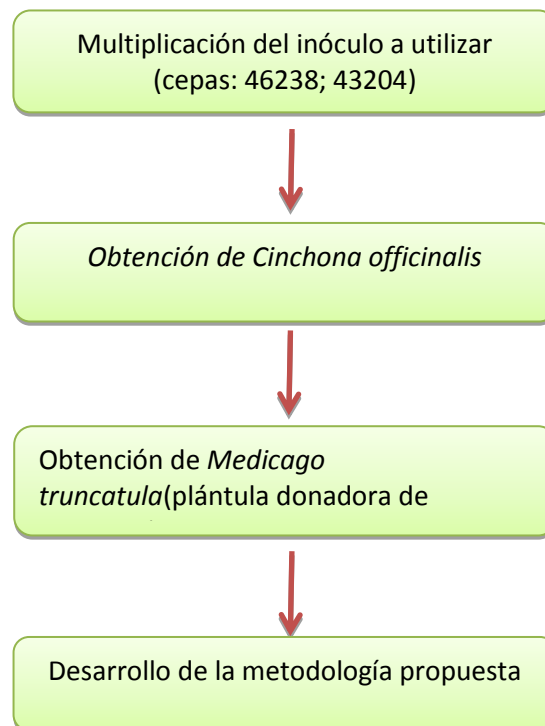
Metodología

2.1 Localización de la Investigación

La presente investigación se llevó a cabo en el Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja, en el laboratorio de Cultivo y conservación de microorganismos.

2.1.2 Fases de la investigación

A continuación se detallan cada una de las fases de investigación contempladas en el desarrollo del proyecto que consistió de la siguiente manera.



2.2 Multiplicación del inóculo a utilizar (cepas: 46238; 43204)

Las fuentes de inóculo fueron las cepas MUCL 43268 y MUCL 40204, proveniente de la Micoteca de la Universidad Católica de Lovaina, se trata de una cepa de *Rhizophagus irregularis* proveniente de las Islas Canarias.

Las cepas MUCL 43268 y MUCL 43204 se conservaban en la raíz modificada *Cichorium intybus* donde para la conservación y multiplicación se las paso a nueva raíz de *Cichorium intybus*(Figura 7), para esto se utilizó una micropipeta con puntas estériles y se depositaron en medio Modified Strullu Romand (MSR), y se incubaron a la sombra a 27°C.

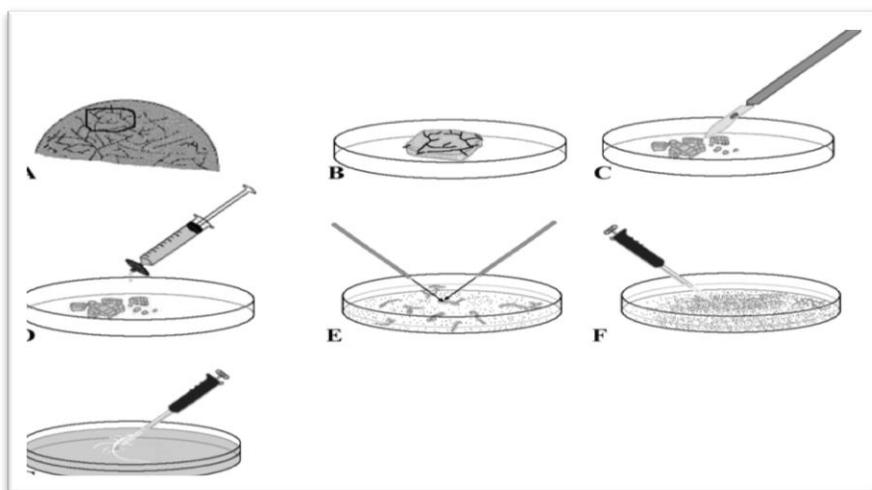


Figura 6:Proceso de multiplicación del inóculo

2.3 Obtención de *Cinchona officinalis*

Para la obtención de esta plántula en un inicio se partió de segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro*(figura 8), diferenciando los que contienen yemas apicales y axiales, las cuales fueron cultivadas en (MS,1962) al 50% de la concentración de sales y sin reguladores de crecimiento(figura 9).



Figura 7:Repique de *Cinchona*

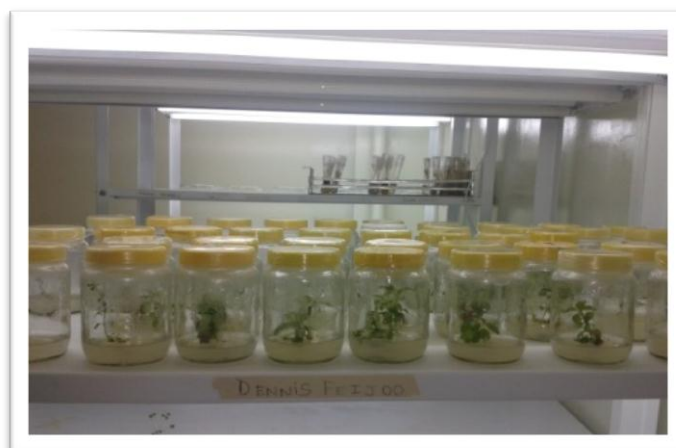


Figura 8: *Cinchona* en etapa de crecimiento

Luego para mantener el banco de plántulas se procedió a desinfectar semillas de *Cinchona officinalis*.



Figura 9: Material para desinfección de semillas de *Cinchona*

Procedimiento de desinfección:

Se Colocó las semillas en el frasco más agua jabonosa y se agitó por 5 min., luego se enjuagó con agua destilada hasta eliminar el jabón, se colocó el alcohol por 30 segundos y se enjuagó con agua estéril, finalmente se colocó 1% de hipoclorito de sodio y se agitó por 5 min, enjuagar con agua estéril hasta eliminar el cloro (se realiza en la cámara de flujo laminar con la ayuda de un cernidor para evitar la caída de las semillas)(**Figura 10**).

Una vez desinfectadas las semillas se las imbibió por 24 horas con agua destilada estéril, pasadas las 24 horas(**Figura 11**). Se escurrió el agua y se procedió a sembrar en medio MA en una cantidad de 20 semillas por frasco. Finalmente los frascos fueron etiquetados y colocados en el cuarto de crecimiento para esperar una respuesta(**Figura 12**).

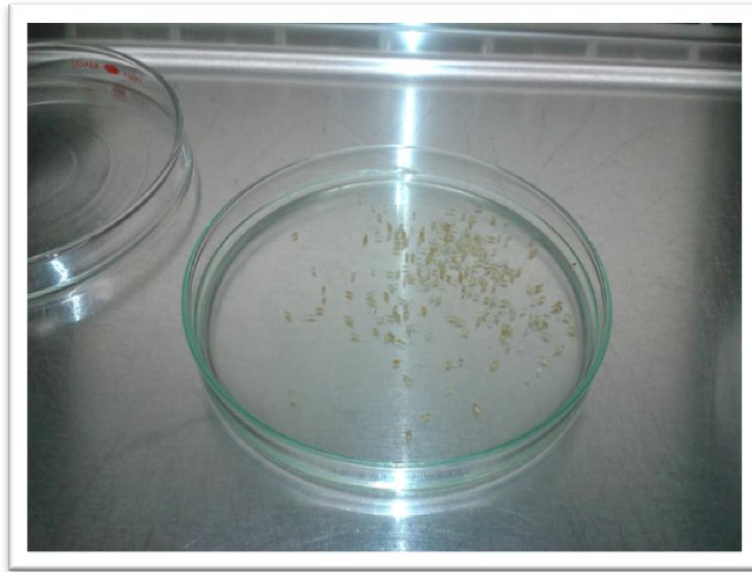


Figura 10:Desinfección de semillas

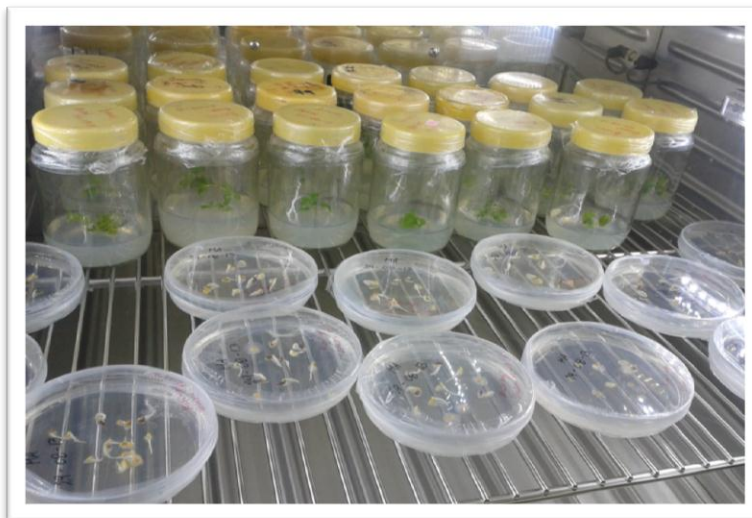


Figura 11: Germinación de *Cinchona*

2.4 Obtención de *Medicago truncatula* (plántula donadora de micelio)

Para la obtención de *Medicago truncatula* se partió de semillas obtenidas de la Micoteca de la Universidad Católica de Lovaina, donde se aplicó el mismo protocolo de desinfección de *Cinchona officinalis* y se las sembró en medio MA que contiene (N, P, K) hasta que germinaron y luego se las pasó a medio modificado Modified Strullu Romand (MSR) hasta su crecimiento.



Figura 12: Germinación de *Medicago truncatula*

2.5 Desarrollo del diseño experimental

Se estableció un sistema de cultivo autotrófico para plántulas de *Cinchona officinalis* tal y como lo describen (Voets *et al.* 2005), en plántulas de patata. Se realizó 10 repeticiones y 1 testigo. El diseño consistió en realizar dos orificios en un extremo de una caja de Petri (\pm 2mm de diámetro), uno en la base y otro en la tapa (Figura 8); las placas fueron bicompartidas y contenían 30 ml de medio MSR, donde en una compartición contenía sacarosa y la otra sin sacarosa y solidificado con 3 g/l de Phytigel. A continuación se transfirieron plántulas de *Medicago truncatula* micropropagadas de 8 semanas de edad (de 3cm de longitud aproximadamente) que estaban creciendo en sistemas de cultivo *in vitro* tradicionales. Las raíces se colocaron en contacto con la superficie del medio, mientras que el tallo sobresalía a través del orificio de la placa. Luego se inocularon esporas de las dos cepas MUCL 43268 y MUCL 43204. Finalmente las placas se sellaron con parafilm y el orificio se cubrió con grasa de silicona (E Merck, D-6100 Darmstadt, F R. Germany) para evitar contaminación.

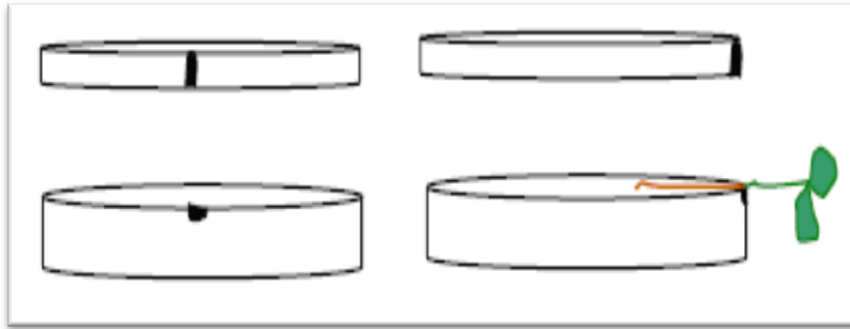


Figura 13: Esquema de la abertura de los orificios.

Fuente: Nogales (2006).

Los sistemas autotróficos se cubrieron con bolsas de plástico negras para proteger las raíces de la luz, pero dejando la parte aérea al aire libre (Figura 9). Estas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de 12h luz / 12h oscuridad y una temperatura de 24°C durante 60 días.

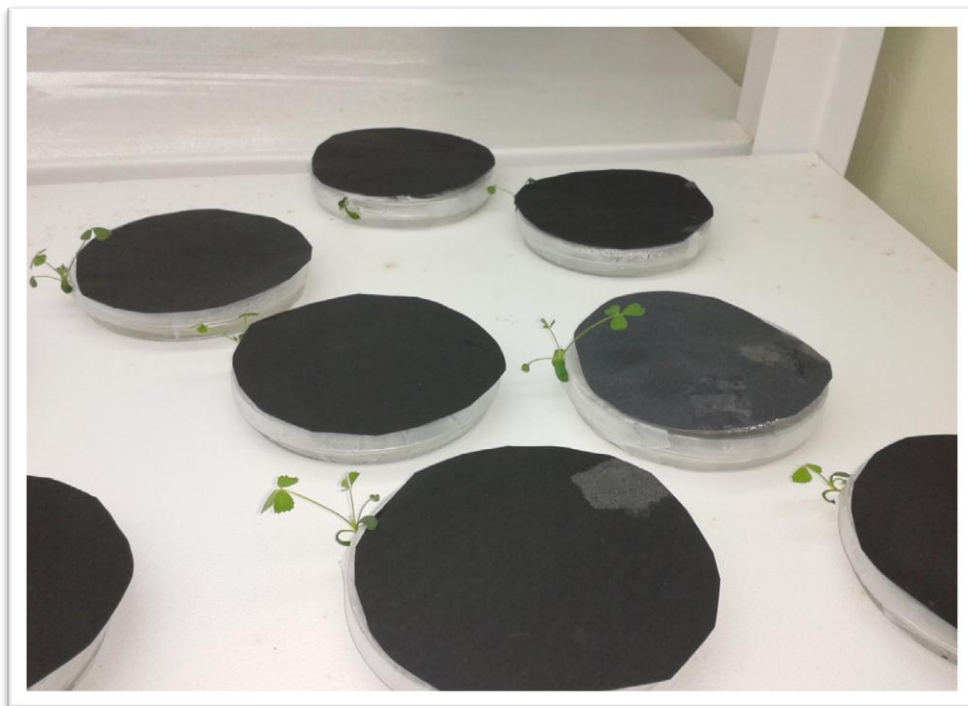


Figura 14: Inoculación de las cepas de hongos en *Medicago truncatula*

Posteriormente se evaluó las cajas, donde se observó que estaba totalmente poblada de raíces con esporas y micelios y se procedió al siguiente paso que era sembrar dos plántulas de *Cinchona officinalis* en la otra compartición para que se produzca la infección por parte del micelio de la planta donadora (*Medicago truncatula*) a las raíces de *Cinchona officinalis*. (Figura 15).



Figura 15 : Diseño final concluido

Finalmente se cubrieron nuevamente con bolsas de plástico negras para proteger las raíces de la luz, pero dejando la parte aérea de ambas plántulas al aire libre. Estas también se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de 12h luz / 12h oscuridad y una temperatura de 24°C durante 60 días.

2.6. Parámetros evaluados.

Al final del ensayo evaluamos mortalidad y variables morfológicas tales como coloración de la raíz y los niveles de colonización micorrízica que se detalla a continuación:

2.7. Determinación del porcentaje de colonización de las plantas *Cinchona officinalis*.

Las raíces de las plántulas obtenidas se limpiaron con agua de grifo eliminando así todas las impurezas, se seleccionaron las raíces más jóvenes y finas, se cortaron en piezas de ± 1.5 cm de longitud y se los colocó en tubos Eppendorf de 1.5 cm. Posteriormente se realizó la tinción usando el método de (Phillips y Hayman, 1970) y con la ayuda de un microscopio ZEISS estándar Axioplan, a 100X y 400X de magnificación se observó las diferentes estructuras como vesículas, arbuscúlos e

hifas. Los niveles de colonización de las plantas se determinaron de acuerdo a la estimación de la micorrización según (Trouvelot *et al*/1986), en la que se le asigna una clase, tomando en cuenta las diferentes estructuras micorrízicas de cada fragmento de raíz y la abundancia de arbusculos.

Las clases obtenidas fueron colocadas en el programa informático "Mycocalc" para calcular los parámetros (%F): Frecuencia de las micorrizas en las raíces y (%A): Abundancia arbuscular en el sistema radicular.

CAPÍTULO III

Resultados y Discusión

3.1 Multiplicación del inóculo a utilizar (cepas: 46238; 43204)

Las cepas MUCL 43268 y MUCL 43204 se conservaron en la raíz modificada *Cichorium intybus* donde para la y multiplicación se las paso a nueva raíz de *Cichorium intybus*, para esto se utilizó una micropipeta con puntas estériles y se depositaron en medio Modified Strullu Romand (MSR), y se incubaron a 27°C (**Figura 17**).



Figura 16: Raíces de *Cichorium*

Se logró multiplicar 25 cajas de cada cepa (MUCL 46238; MUCL 43204) con aproximadamente 100 esporas en cada una. Se las conservó en una incubadora a 27°C (**Figura 18**).



Figura 17: Raíces de *Cichorium* inoculadas las esporas de los hongos.

3.2 Banco plántulas de *Cinchona officinalis*

Para los cultivos in vitro de *Cinchona officinalis* se partió desde la desinfección de las semillas provenientes del banco de germoplasma de la UTPL, donde luego fueron sembradas en medio MA (N, P, K) hasta su germinación para posteriormente ser pasados a medio MS. Todo este procedimiento tuvo una duración de 3 meses hasta la utilización del mismo. **(Figura 19)**

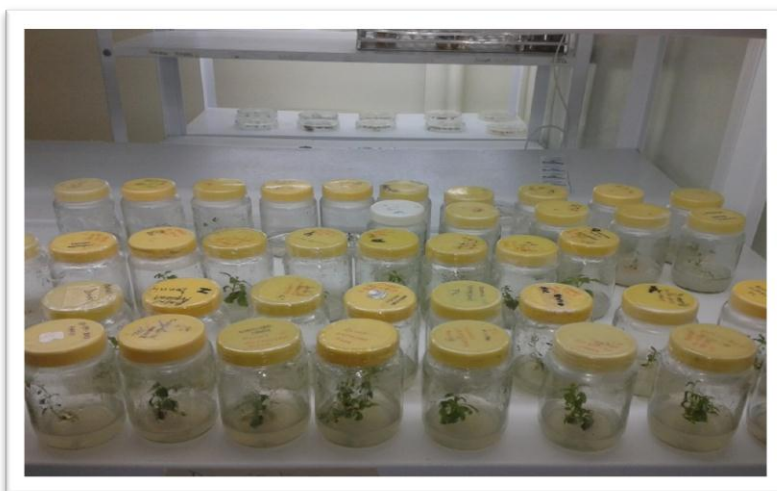


Figura 18: Plántulas de *Cinchona officinalis*

3.3 Banco de plántulas de *Medicago truncatula* (plántula donadora de micelium)

Para la obtención de *Medicago truncatula* se partió de semillas obtenidas de la Micoteca de la Universidad Católica de Lovaina, donde se aplicó el mismo protocolo de desinfección de *Cinchona officinalis* y se las sembró en medio MA que contiene (N, P, K) hasta que germinaron y luego se las pasó a medio modificado Modified Strullu Romand (MSR) hasta su crecimiento. A continuación una imagen de las plántulas obtenidas **(Figura 20)**



Figura 19: *Medicago truncatula*

3.4 Análisis de Mortalidad de las especies utilizadas.

Tabla 1: Porcentaje de Mortalidad y supervivencia en el tratamiento.

Mortalidad			
Especie a trabajar	Estado	Muertas	Vivas
<i>Cichorium intybus</i>	Raíz hospedera	2%	98%
<i>Cinchona officinalis</i>	Plántulas	2%	98%
<i>Medicago truncatula</i>	Plántulas	5%	95%
Cepa MUCL 43204	Esporas	5%	95%
Cepa MUCL 46238	Esporas	5%	95%

Al analizar la tasa de mortalidad en la elaboración de nuestro proyecto, se observó que la Mortalidad no es mayoritaria para ninguna de las especies trabajadas sin embargo se obtuvo un 2% de Mortalidad en las raíces hospederas y las plántulas de *Cinchona officinalis* y 5 % de mortalidad en las plántulas de *Medicago truncatula* y las cepas de los hongos MUCL 46238 y MUCL 43204.

3.5 Variables morfológicas

Entre las variables encontramos que la coloración de la raíz fue cambiando se fue poniendo de color más oscuro y se empezaba a ensanchar(**figura 21**).



Figura 20: Raíz de *Cinchona* cambiando su morfología

(Rocha *et al*2009), mencionan que los efectos fisiológicos que originan los HMA en cuanto a la captación de humedad y nutrientes permite apreciar un mayor vigor del tallo y área foliar de las plantas, incrementando esos parámetros entre un 15 y 50%.

3.6 Evaluación de las plántulas de *Cinchona officinalis* inoculadas con las cepas (MUCL 43204; MUCL 46238).

Pasado dos meses de crecimiento y bajo condiciones in vitro, se realizó las tinciones para evaluar el porcentaje de micorrización.

Por medio de la tinción de raíces usando el método de (Phillips y Hayman,1970)(ver **anexo 2**)y con la ayuda del microscopio, se evaluaron 10 placas y se encontró que siete de ellas tenían mayor presencia de estructuras micorrízicas (**Figura 22, 23 y 24**).



Figura 21: Hifas colonizando raíces de *Cinchona officinalis*

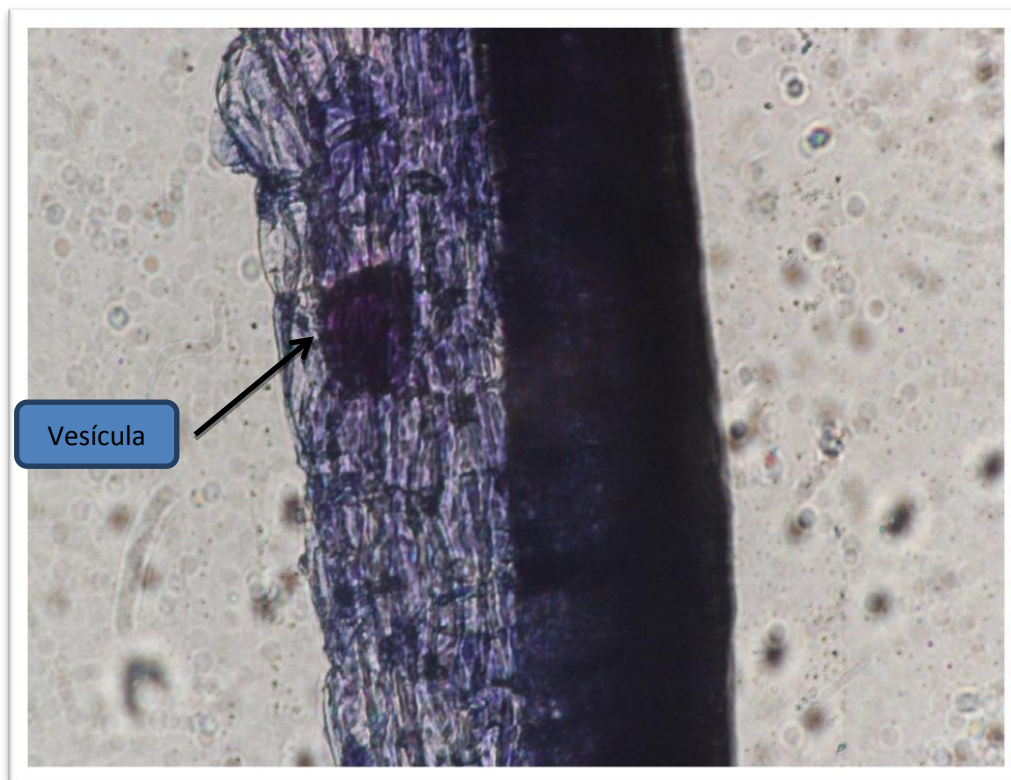


Figura 22 : Presencia de vesículas

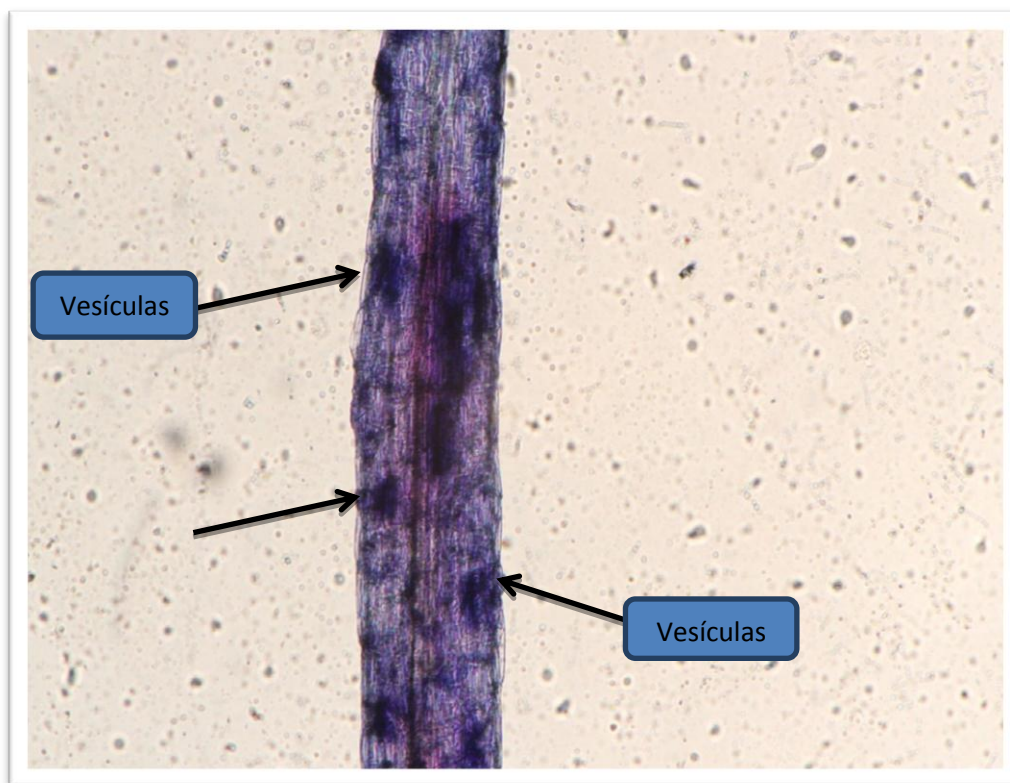


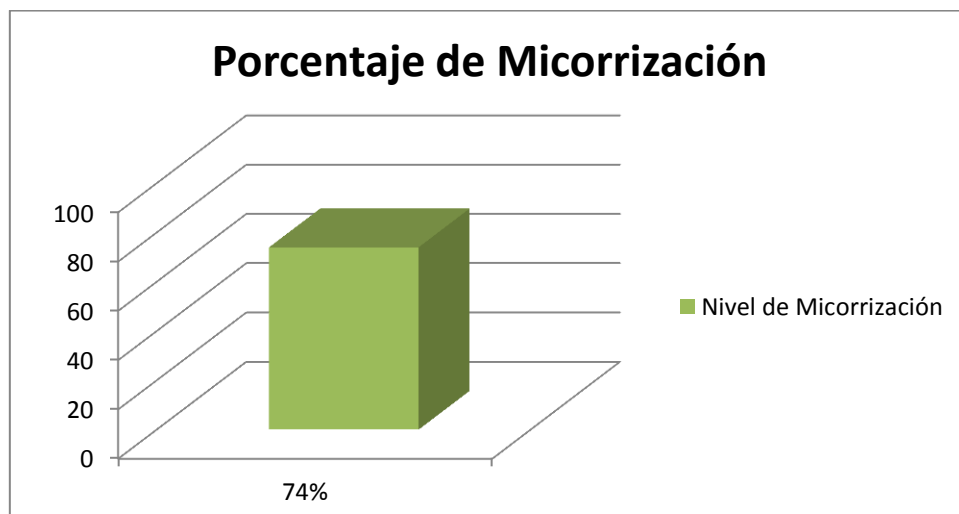
Figura 23: Abundancia de Vesículas

En cuanto a la especie *Cinchona officinalis*, podemos darnos cuenta que esta especie responde positivamente al ser inoculadas con HMA, independientemente del tipo. En este estudio se probó utilizar dos cepas inoculadas (MUCL; 43204; MUCL 46238) simultáneamente lo cual se pretendió imitar las condiciones naturales donde sabemos que una sola especie vegetal se puede encontrar diversidad de micorrizas. Esto concuerda con (Guachon y Prado, 2012), que analizaron el efecto de la micorriza arbuscular en el crecimiento de *Cinchona officinalis* donde el tratamiento también respondió favorablemente, así mismo (Serrano, 2013) también estudió el porcentaje de micorrizas en la especie de *Cinchona* mostrándose que si se encuentra presente en ella. Es importante resaltar que no se había probado inocular HMA simultáneamente en ninguna especie vegetal lo cuál demuestra la importancia de este estudio. Los efectos beneficiosos de la introducción artificial de un inóculo micorrízico, resultan más evidentes en tratamientos donde las poblaciones de HMA nativos no existen. Sabemos que se requieren más investigaciones para poder explicar el beneficio que le proporciona la inoculación de los HMA con *Cinchona*, los resultados del presente estudio sugieren que estos hongos podrían ser utilizados como una estrategia de conservación in vitro, a fin de mejorar la supervivencia de esta especie en peligro de

extinción. Con ello se estaría promoviendo a la utilización de esta metodología para trabajar también con otras especies.

3.7 Porcentaje de micorrización de plántulas de *Cinchona officinalis* inoculadas con las cepas (MUCL 43204; MUCL 46238).

Según los resultados que nos arrojó el programa "Mycocalc" nuestra frecuencia micorrízica es de 74% lo cual nos indica que estas cepas de hongo si se asocia favorablemente con *Cinchona officinalis*.



CONCLUSIONES

Se logró la multiplicación de los HMA sobre raíces de plántulas de *Medicago truncatulas* hospederas de las cepas (MUCL 43204; MUCL 46238), y se reveló el efecto que estos tienen sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de *Cinchona officinalis* en condiciones in vitro. Las plántulas de *Cinchona officinalis* inoculadas con HMA, permitieron la obtención de mejores rendimientos y un mayor desarrollo de la plántula y tamaño total, mayor diámetro de tallo, mayor desarrollo radical, mayor número de hojas, en comparación de los tratamientos testigo.

Con respecto al porcentaje de colonización micorrízica, inoculando (MUCL 43204; MUCL 46238) en *Cinchona officinalis* se obtuvo un 74%.

De esta forma, queda demostrado que si hay una asociación entre estos hongos y *Cinchona officinalis*.

Si bien se pudieron observar estructuras micorrízicas como vesículas e hifas, la presencia de arbuscúlos fue escasa, esto se debió a que las raíces de las plantas ya no estaba en un proceso activo de intercambio de nutrientes en cuyos casos los arbuscúlos mueren y su presencia en las placas teñidas es nula o casi nula.

El escaso periodo de tiempo puede llegar a ser un factor de este resultado por lo que se recomienda que los cultivos permanezcan mucho más tiempo y evaluar futuros resultados.

Hoy en día la utilización de micorrizas constituye uno de los componentes más importantes dentro de la agroecología moderna y es una buena opción para el desarrollo de una agricultura sostenible, evitando así el uso de productos químicos, (Barea y Azcon, 1983). Ligándose siempre a mantener el equilibrio de los ecosistemas terrestres y la fertilidad de los suelos. En este contexto los HMA juegan un papel importante en la producción de plantas de *Cinchona officinalis*, la cual se encuentra amenazada en la provincia de Loja.

RECOMENDACIONES

Continuar con los estudios que permitan conocer la interacción de los HMA con el medio que les rodea, mediante experimentos multifactoriales en campo y muestreos, que revelen la realidad ecológica de los mismos, de tal forma que se impulse la aplicación de procesos de restauración de ecosistemas degradados, y así se puedan desarrollar especies alimenticias y medicinales que son usadas por el ser humano.

Al momento de querer empezar el ensayo, tomar en cuenta que las cepas a utilizar sean sembradas en la misma fecha para luego tener un material micorrízico en condiciones más favorables para la manipulación.

Tener un cuarto de crecimiento netamente para los ensayos que estemos realizando ya que así nos aseguramos de que no ingrese alguna otra persona con otro tipo de cultivos que afecten de una o de otra manera en la contaminación de los nuestros.

Realizar más ensayos de cultivos monoxénicos, puesto que representa una forma más segura y estéril de aislamiento de HMA.

Crear un banco de germoplasma de HMA que permita conservar la biodiversidad de estos hongos y sea un aporte científico para posteriores investigaciones.

Seleccionar inóculos de HMA eficientes (interacción HMA- raíz en condiciones *in vitro*) para diferentes cultivos de plantas.

En ensayos para inoculaciones, utilizar raíces modificadas como hospederas ya que tienen una mayor afinidad con los hongos y un mejor comportamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Akiyama, K., Matsuzaki, K., Hayashi, H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. Vol 435: 824-827.

Alexander, T; Meier, R; Toth, E; Weber, H. 1989. Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytol.* Vol 110:363-370.

Andersson, L y Taylor, C. 1994 "Rubiaceae-Cinchoneae-Coptosapelteae". En: Harling G. Andersson L (Eds), *Flora of Ecuador* no 50.

Bago, B; Pfeffer, F; Shachar Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant. Mundi Prensa. México*, pp78-99.

Barea, J. M. y Azcon, G. A. 1983. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen - fixing plants. En: *Advances in Agronomy* 36: 1 - 54.

Barker, S; Tagu, D; Delp, G. 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physio.* Vol 116:1201-1207

Bécard, G; Fortin J. 1988. Early events of arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed root. *New Phytologist.* Vol 108:211-218

Bécard, G; y Piché, Y. 1989. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microbiol.* Vol 55:2320–2325.

Bellgard, S. 1993. The topsoil as the major store of propagules of vesicular-arbuscular fungi in southeast Australian sandstone soil, *Mycorrhiza* 3:19-24.

Bethlenfalvay, G; Linderman, R. 1992. *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. ASA special publication No. 54, Madison, Wisconsin, USA.

Besserer, A; Puech-Pages, V; Kiefer, P. 2006 Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology.* Vol 4, 1239–1247

Blaszkowski, J. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) species deposited in the Department of Plant Pathology, University of Agriculture in Szczecin, Poland

Bonfante, P; Bianciotto, V. 1995. Presymbiotic versus symbiotic phase in arbuscular endomycorrhizal fungi: morphology and cytology. In: Varma A, Hock B, eds. Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology. Springer-Verlag.p 229–247.

Brundrett M;Bougher, N;Dell, B;Grove, T;Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhiza in forestry and agriculture, Aciar Monograph, Australia, 185 pp.

Castillo, R; Sotomayor, L; Ortiz, O; Borie, F; Rubio, R. (2009). Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on an Ecological Crop of Chili Peppers (*Capsicum annuum* L.), Chilean J. Agric. Res, .69:79-87.

Chaurasia, B; Khare, K. 2005. *Hordeum vulgare*: A suitable host for mass production of Arbuscular mycorrhizal fungi from natural soil. Applied Ecology and Environmental Research 4:45-53.

Chiltón, M;Tepfer, D;Petit, A;David, C;Tempé, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of host plant root cells. Nature, 295:432–434

Covacevich, F;Echeverria, H. 2008. Receptivity of an Argentinean pampas soil to Arbuscular mycorrhizal *Glomus* and *Acaulospora* strains. World J. Agric. Sc. 4:688-698.

Dalpé, Y;Declerck, S. 2002. Development of *Acaulospora rehmanii* spore and hyphal swellings under root-organ culture, Mycologia, 94:850–855.

De Souza, F; Declerck, S. 2003. Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. Mycologia. Vol 95(6):1004–1012

Diop, T;Plenchette, C;Strullu, D. 1994. Dual axenic culture of sheared-root inocula of Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots, Mycorrhiza 5:17–22

Duponnois, R; Plenchette, C. 2003. Helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza*. Vol 13: 85-91.

Elmeskaoui, A; Damont, J; Poulin, M; Piché, Y; Desjardins, Y. 1995. A tripartite culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. *Mycorrhiza*. Vol 5:313-319.

Ferrera–Cerrato, R; Alarcón, A. 2007. Micorriza arbuscular. En: *Microbiología Agrícola*. Editorial Trillas. p. 90-118

Forero, E; Azcón, C; Barea, J; Moyersoen, B; Orozco, C. 1996. Micorrizas. Recurso biológico del suelo.

FORTIN, J; BÉCARD, G; DECLERCK, S; DALPÉ, Y; COUGHLAN, A; PICHÉ, Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Can J Bot* 80:1–20

Gallaud, I. 1904. Études sur les mycorrhizes endotrophes. Lille, France : Le Bigot Frères.

García, J; Ocampo, J. 2002. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Exp. Bot.*, 53:1377-1386

Garmendia, A. 2005. El árbol de la quina (*cinchona* spp), Distribución, caracterización de su hábitat y arquitectura, U.T.P.L.

Gianinazzi-Pearson, V; Morandi, D; Dexheimer, J; Gianinazzi, S. 1981. Ultrastructural and ultracytochemical features of *Glomus tenuis* mycorrhizal. *New Phytol.* Vol 88: 633-639.

González, C; Monroy, A; García, E; Orozco, M. 2005. Influencia de hongos micorrizógenos arbusculares (hma) en el desarrollo de plántulas de *Opuntia streptacantha* Lem. sometidas a sequía en condiciones de invernadero, Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 8(1):5-10

González, M. 2002. Manual de Laboratorio de Técnicas de Micropropagación, Monografías de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid – España

Gosling, P; Hodge, G; Goodlass, G; Bending. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems and Env*, 113: 17-35.

Grattapaglia, D; Machado, M. 1990. Micropropagac,ãõ. In: Torres, A.C., Caldas, L.S. (Eds.), *Técnicas e aplicac,ões da cultura de tecidos de plantas*. ABCTP/Embrapa-CNPq, Brasilia. 99–170p.

Guachón, T; Prado, M. 2012. “Evaluación del efecto del inóculo Micorrízico arbuscular en el crecimiento de *Cinchona pubescens* y *Cinchona officinalis* en condiciones de vivero”. UTPL. Loja – Ecuador.

Guzmán, S;Farías, J. 2005. Biología y regulación molecular de la micorriza Arbuscular, *Avances en Investigación Agropecuaria*, 9:17-31.

Hamel, C. 1996. Prospects and problems pertaining to the management of Arbuscular mycorrhizae in agriculture. *Agric. Ecos. Env*. 60:197-210.

Harrison, M; Dewbre, G; Liu, J. 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*. Vol 14: 2413–2429.

Hernández, M. 2000. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizósfericas como complemento de la nutrición mineral de tomate (*Lycopersicon esculentm mill*), Tesis de Maestría, Inca.

Holguin, G;Bashan, Y;Ferrera, R. 1996. Interactions between Plants and Beneficial Microorganisms. Ed. Terra, 14:2

Jansa, J;Mozafart, A; Anken, T. 2002. Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12: 225-234.

Jorgensen, P; LEÓN, M. 1999. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Syst. Bot. Missouri Bot. Gard*. 75:1–1182

Kapoor, R; Sharma, D; Bhatnagar, A. 2008. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Sci Hort.* Vol 116:227-239.

Koske, R. 1981. Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. *Transactions of the British Mycological Society.* Vol 76: 328–330.

León, D. 2006. Evaluación y Caracterización de Micorrizas Arbusculares asociadas a Yuca (*Manihot esculenta* sp) en dos regiones de la amazonia colombiana. Trabajo de tesis para el título de microbiólogo, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Linderman, R; Davis, E. 2004. Varied response of marigold (*Tagetes spp.*) genotypes to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi. *Sci. Hort.* 99:67-78

Loaiza, T; Sánchez, E. 2006. La corteza de Loja, *Revista Ecuador Tierra Incógnita*, ECU-10:1-4

Logi, C; Sbrana, C; Giovannetti, M. 1998. Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol 64: 3473–3479.

Mahecha, G; Ovalle, A; Camelo, D; Rozo, A; Barrero, D. 2004. Vegetación del territorio: 450 especies de sus llanuras y montañas, Colombia 871pp

Matsubara, Y; Uetake, Y; Peterson, R. 1999. Entry and colonization of *Asparagus officinalis* root by arbuscular mycorrhizal fungi with emphasis on changes in host microtubules. *Can J Bot.* Vol 77: 1159-1167.

Mejía, F; Suni, M; Albán, J. 2012. Viabilidad y germinación de semillas de *Cinchona officinalis* L. Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima

Mosse, B. 1981. Vesicular micorrizas arbusculares, *Investigación de Agricultura Tropical*, Universidad de Hawaii, Hawaii. mycorrhiza in forestry and agriculture, *Aciair Moniograph*, Australia, 185 pp.

Nakano, A; Kazushi; Kimura, M. (2001). Effect of host shoot clipping on carbon and nitrogen sources for arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 10(6): 287-293.

Nieto, M. 2000. Remedios para el imperio: Historia Natural y la apropiación del nuevo mundo. ICAH. Pág.184-232.

Parniske, Martin. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews. Microbiology*. Vol 6:763- 775.

Peterson, L; Hugues, B; Massicotte, M. 2004. MYCORRHIZAS: Anatomy and Cell Biology. 57-79.p.

Phillps, J; Hayman, D. 1970 .Improve procedure for clearing roots and stainin parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid asesment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.

Plenchette, C. 2000. Receptiveness of some tropical soils from banana fields in Martinique to the arbuscular fungus *Glomus intraradices*. *Appl. Soil Ecol.* 15: 253-260.

Pozo, M. 1999. Inducción de enzimas hidrolíticas en raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*) como respuesta a la formación de MA y su implicación en el control biológico de *Phytophthora* parasítica. Tesis de doctorado, Universidad de Granada, España.

Read, D. 1999. Mycorrhiza: The state of the art, second edition, A. Varma & B. Hock, Berlin, pp 3- 34.

Requena, N. 1996. Exploración de la biodiversidad microbiana (hongos de las micorrizas arbuscula-*Rhizobium*-Rizobacterias) en un ecosistema mediterráneo desertificado dirigida a una estrategia de revegetación, Tesis doctoral de la Universidad de Granada.

Rillig, M. 2004. Arbuscular Mycorrhizae and Terrestrial Ecosystem Processes. *Ecology Letters* 7:740-754.

Rocha, L; Ramos, C; Rosales C. 2009. Multiplicación de Hongos Micorrízicos arbusculares MA nativos de cultivos de cacao (*Theobroma cacao*), en Maiz (*Zea*

mays), bajo distintos tratamientos agronómicos, Tesis- Universidad Popular del Cesar, Valledupar.

Rodriguez, Y; Del Anoval, B; Fernandez, F; Rodriguez, P. 2004. Estudio comparativo del comportamiento de seis cepas de hongos micorrizicos arbusculares en la interacción en el tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Ecología aplicada* 3:162-171.

Roveda, G; Cabra, L; Ramirez, M; Peñaranda, A. 2007. Efecto de las micorrizas Arbusculares sobre la aclimatación y endurecimiento de microplántulas de mora (*Rubus glaucus*). *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. Vol 8(1): 28-36.

Sanders, F; Tinker, P. 1971. Mechanism of absorption of phosphate from soil by *Endogone* micorrizas. *Nature* 233: 278-279.

Sbrana, C; Giovannetti, M; Vitagliano, C. 1994. The effect of mycorrhizal infection on survival and growth renewal of micropropagated fruit rootstocks. *Micorriza*. Vol 5:153-156.

Schereiner, R; Koide, R. 1993. Antifungal compounds from the root of mycotrophic and non-mycotrophic plant species, *New Phytol.*, Vol 123: 99-105. (1993b). Mustards, mustard oils and micorrizas. *New Phytol.*, Vol 123: 107-113.

Schüßler A; Schwarzott, D; Gerig, H; Walker, C. 2001. Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer desing and phylogeny. *Mycological Research*. Vol 105, pp. 5-15.

Selosse, M; Le Tacon, F. 1998. The land flora: A phototroph–fungus partnership. *Reviews*.

Serrano, F. 2013. Identificación molecular de hongos micorrizicos arbusculares (HMA) asociados a *Cinchona pubescens* (*Rubiaceae*); una especie invasora en la Isla Santa Cruz (Galapagos). UTPL. Loja – Ecuador.

Sharma, M; Bhatia, A; Adholeya, A. 1996. Growth responses and dependence of *Acacia nilotica* var. *cupriciformis* on the indigenous arbuscular mycorrhizal consortium of a marginal wasteland soil. *Mycorrhiza*. Vol 6:441-446.

Sharmila, P; Puthur, J; Pardha, P. 2000. Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi improves establishment of micropropagated plants. In: Mukerji, K.G. (Ed.), *Mycorrhizal Biology*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 235–250.

Sieverding, E. 1991. *Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems*, Academic Press, Great Britain 605pp.

Sieverding, E; Oehl, F. 2006. Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. *J Applied Bot Food Qual*. Vol 80: 69-81

Siqueira, J. 1994. Micorrizas. In: Araújo, R.S., Hungaria, M. (Eds.), *Microrganismos de importancia agrícola*. Embrapa-CNPAF, Embrapa-CNPSO. Embrapa-SPI, Brasília, pp. 151–194.

Siqueira, J; Saggin-júnior, O; Flores-aylas, W; Guimarães, P. 1998. Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. *Mycorrhiza*. Vol 7:293-300.

Smith, S; Read, D. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2da edición, Academic Press, London. 605 pp.

Smith, S; Read, D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Third Edition. Academic Press is an imprint of Elsevier. pp. 2-6.

Tapia J. 2003. Identificación de hongos micorrízicos Arbusculares aislados de suelos salinos y su eficiencia e plantas de lechuga. Tesis Doctoral, Universidad de Colima. México

Tamasloukht, M; Séjalon-Delmas, N; Kluever, A. 2003 Root factors induce mitochondrial related gene expression and fungal respiration during the developmental

switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiology*. Vol 131, 1468–1478

Tepfer, D. 1989. Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes*: a source of genes having applications in rhizosphere biology and plant development, ecology and evolution. In: Kousugg T., Nester E., (eds), *Plant microbe interactions: Molecular and genetic perspectives*. Mc Graw- Hill, New York, pp 294–342

Trouvelot, A;Kough, J;Gianinazzi, V. 1986. Mesure du taux de mycorhization va d'un systeme racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: GIANINAZZI V and GIANINAZZI S. (eds.), *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*, Inra press, Paris, pp. 217-221.

Usuga, C;Castañeda, D;Franco, A. 2008. Multiplicación de hongos micorriza Arbuscular (H.M.A) y efecto de la micorrización en plantas micropropagadas de banano, *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 61:4279-4290.

VanDerheijden, M. 1998. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure, *Ecology*, 79(6): 2082-2091.

Varma A. 2008. *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*. Springer. India. vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid asesment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.

Vierheilig, H; Piche, Y. 2002. Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. *Advantage Experimental Medicine Biology*. Vol 505: 23–39.

Voets, L; Dupre de Boulois, H; Renard, L; Strullu, D; Declerck, S. 2005. Development of an autotrophic culture system for the *in vitro* mycorrhization of potato plantlets. *FEMS Microbiology Letters*. Vol 248 : 111–118.

Williams, S; Vestberg, M; Uosukainen, M; Dod, J. 1992. Effects of fertilizer and Arbuscular mycorrhizal fungi on the post-vitro growth of micropropagated strawberry. *Agron*, 12: 851-857.

Yu, T;Egger, K;Peterson, R. 2001, Ectendomycorrhizal associations characteristics and functions, *Mycorrhiza* 11: 167-177.

ANEXOS

Anexo 1

Datos generales de Cinchona officinalis



Género dedicado a Ana Osorio, esposa de Luis J. Fernández de Cabrera y Bobadilla, conde de Chinchón, que logro curarse gracias a la corteza de quina o cascarilla de la fiebre palúdica que padecía en 1632.(Loayza y Sánchez, 1996) De la corteza se obtiene la quinina el más antiguo medicamento para controlar la malaria.

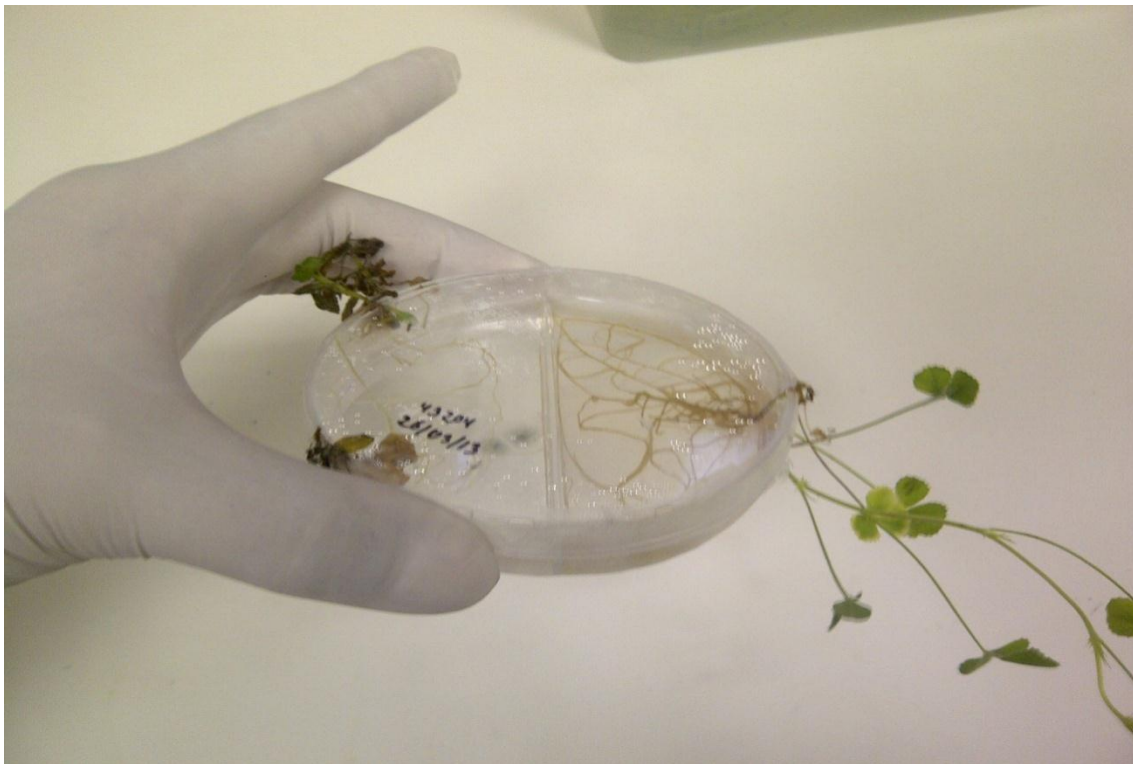
Anexo 2

MODIFICACIÓN DEL MÉTODO DE PHILLIPS Y HAYMAN, (1974) PARA LA CLARIFICACIÓN Y TINCIÓN DE RAÍCES.

- 1.** Desechar el alcohol de las raíces y enjuagar con agua de grifo.
- 2.** Cortar segmentos de aproximadamente 1cm de longitud y colocarlos en tubos eppendorf de 1,5ml
- 3.** Adicionar KOH al 10% a las raíces y poner en el bloque calentador a 45°C durante 15-20 minutos. Enjuagar 3 veces con agua de grifo.
- 4.** Adicionar HCl al 10% durante 1 minuto a temperatura ambiente
- 5.** Desechar el HCl y sin lavar, agregar el azul de metileno al 0,05% a 45°C durante 15 minutos.
- 6.** Pasado el tiempo de tinción se sacan las raíces y se colocan en un portaobjetos limpio, agregándoles una gota de Polivinyl-lactoglycerol.
- 7.** Evaluar en el microscopio.

Anexo 3

Fotos del diseño





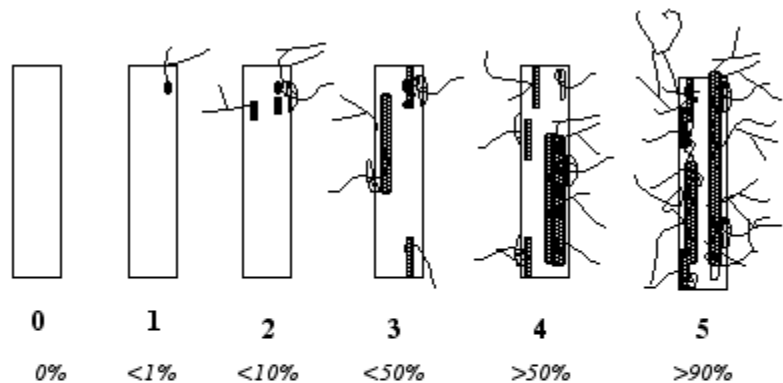
Diseño Final listo para evaluar resultados

Anexo 4

ESTIMACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN

SEGÚN TROUVELOT et al., 1986

SCORING MYCORRHIZAL COLONIZATION
IN CLASSES FROM 0 TO 5



SCORING ARBUSCULE ABUNDANCE

None : A0
Few arbuscules : A1
Frequent : A2
Abundant : A3

