



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

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

TRABAJO DE FIN DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Rodríguez Narváez, Fabián Nicolás

DIRECTOR: Lucero Mosquera, Hernán Patricio, Ing

LOJA – ECUADOR

2014

APROBACION DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACION

Ing.

Hernán Patricio Lucero Mosquera

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “Inoculación *in vitro* de hongos micorrízicos (mucl 46238; mucl 43204) independientemente en *Cinchona officinalis*” realizado por Rodríguez Narváez Fabián Nicolás ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, marzo de 2014

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Fabián Nicolás Rodríguez Narváz declaro ser autor (a) del presente trabajo de fin de titulación “Inoculación *in vitro* de hongos micorrízicos (mucl 46238; mucl 43204) independientemente en *Cinchona officinalis*” de la Titulación de Bioquímico Farmacéutico siendo el Ing. Hernán Patricio Lucero Mosquera director (a) 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: Fabián Nicolás Rodríguez Narváz

Cédula: 1104431596

DEDICATORIA

Quiero dedicar mi trabajo de tesis a:

A Dios, por haberme dado luz y fortaleza para alcanzar mis metas, ser nuestro guía, y darnos la sabiduría y valor necesario para sobrellevar todos los obstáculos y terminar con éxito esta investigación.

A mis padres, por darme la vida, por su sacrificio, trabajo y constancia en forjar mi personalidad y por brindarme siempre todo su amor y comprensión.

A mi F.V.R.C quien me enseñó como enfrentar la vida cuando no se está preparado.

Finalmente a la persona que siempre creyó en mi e hizo de mí persona el profesional que soy ahora, a ti madre querida, mi vida, mis triunfos y todo este trabajo.

Fabián Rodríguez

AGRADECIMIENTO

Expreso mi gratitud:

Mi sincero e inmenso agradecimiento, a mi director de tesis, el Ing. Hernán Lucero quien compartió sus conocimientos, experiencias y guías, apoyándonos en todo momento con sus acertados comentarios, sugerencias y correcciones que contribuyó para la finalización del presente proyecto.

A la Universidad Técnica Particular de Loja en cuyas aulas tuvimos la oportunidad de formarnos integral y profesionalmente, al Centro de Biología Celular y Molecular por brindarnos los medios para llevar a cabo esta investigación.

A todos y a cada uno de los docentes de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, de la Universidad Técnica Particular de Loja, ya que con sus conocimientos coadyuvaron todos a mi formación, hasta la culminación de mis estudios.

A mis compañeros de carrera por apoyarnos y compartir todas las experiencias buenas y malas que tuvimos durante nuestra vida estudiantil.

A todos, gracias, muchas gracias

Fabián Rodríguez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Pág.

CARÁTULA.....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORÍA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
RESUMEN	1
ABSTACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
Capítulo I	5
1.-Antecedentes	6
1.1 Generalidades de la <i>Cinchona</i>	6
1.1.1 Etimología	6
1.1.2 Generalidades y Uso.....	6
1.1.3 <i>Cinchona officinalis</i> L	7
1.1.4 Descripción taxonómica	7
1.1.5 Ubicación geográfica en el Ecuador.....	7
1.1.6 Descripción	8
1.2. Micorrizas	8
1.2.1 Definición	8
1.2.2 Clasificación Morfológica de Micorrizas	8
1.3 HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA)	11
1.3.1 Descripción de HMA.....	11
1.3.2 Estructura de la micorriza Arbuscular.....	12
1.3.2.1 Hifas	12
1.3.2.2 Esporas	12
1.3.2.3 Apresores.....	12
1.3.2.4 Vesículas.....	12
1.3.2.5 Arbúsculos.....	12
1.3.2.6 Células Auxiliares.....	12
1.3.3 Clasificación de los HMA.....	14
1.4 Multiplicación de inóculo Micorrízico	14
1.5 Como se produce la simbiosis para formar micorrizas	15
1.6 Plantas hospederas	15

1.7 Ciclo de vida de los hongos micorrízicos arbusculares	16
1.8 Cultivo <i>in vitro</i> de hongos micorrízicos arbusculares	17
1.8.1 Cultivo monoxénico	17
1.9 Beneficios de los hongos micorrízicos en plantas micropropagadas	18
1.10 Raíces Hospederas transformadas	18
1.11 Rol ecológico e importancia de los HMA en la restauración de ecosistemas degradados	18
1.12 Efectividad e infectividad de los HMA	19
 Capítulo II	 21
 2.- Metodología	 22
2.1 Localización de la Investigación	22
2.2 Fases de la investigación	22
2.3 Multiplicación del Inóculo a utilizar (cepas: MUCL 46238, MUCL 43204)	23
2.4 Obtención de plántulas de <i>Cinchona officinalis</i>	24
2.5 Obtención de plántulas de <i>Medicago truncatula</i>	26
2.5 1 Protocolo de desinfección que se utilizó para <i>Medicago truncatula</i>	27
2.6 Desarrollo del diseño experimental	28
2.7 Determinación del porcentaje de colonización de las plantas <i>Cinchona officinalis</i>	28
 Capítulo III	 34
 3. Resultados y Discusión	 35
3.1 Banco de cepas MUCL 43268 y MUCL 4020437.....	35
3.2 Banco plántulas de <i>Cinchona officinalis</i>	36
3.3 Banco plántulas de <i>Medicago truncatulas</i>	36
3.4 Mortalidad de la plantas	37
3.5 Variables morfológicas	37
3.6 Resultado de la evaluación de la colonización de las plántulas de <i>Cinchona officinalis</i>	39
3.7 Análisis estadístico del Porcentaje de colonización	42
 Conclusiones y Recomendaciones	 43
 Bibliografía	 45
 Anexos	 53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de <i>Cinchona officinalis</i>	7
Figura 2. Representación gráfica de las principales tipos de micorrizas: A). Ectomicorriza; las hifas no penetran en las células radicales, forman manto alrededor de la raíz. B). Micorrizas Vesículo-arbuscular (Endomicorriza) las hifas penetran en las células de la raíz, en su interior forman arbuscúlos y vesículas. C). Endomicorrizas de oville de las orquídeas (Orquideoide); forman ovillos en el interior de las célula s. D). Endomicorrizas de los heliantemos y breznos (Ericales). E). Ectendomicorrizas; forman un manto y las hifas penetran en las células en forma de ovillos.....	10
Figura 3. Representación de un Hongo Micorrízico Arbuscular	11
Figura 4. Estructura de los Hongos Micorrízicos Arbusculares	14
Figura 5. Diagrama del ciclo de vida de los HMA durante el establecimiento de la simbiosis funcional	17
Figura 6. Cepa (MUCL 46238)	23
Figura 7. Cepa (MUCL 43204)	23
Figura 8. A-G) Ilustración de las subculturas de esporas disueltas. Una selección de una pieza de gel que contiene las esporas. B-D) La adición de tampón de citrato 10 mM para disolver el gel. Las esporas pueden ser mejor separarse cuando la pieza de gel está fragmentada. E) Separación de esporas en pequeños racimos. F, G) Inoculación raíz anfitriona	23
Figura 9. Plántulas de <i>Cinchona officinalis</i>	24
Figura 10. Replica de plántulas de <i>Cinchona officinalis</i>	25
Figura 11. Plántulas de <i>Cinchona officinalis</i> replicadas	25
Figura 12. <i>Medicago truncatula</i> en etapa de germinación.....	26
Figura 13. <i>Medicago truncatula</i> en etapa de plántulas.....	26
Figura 14. Desinfección de semillas.....	27
Figura 15. Proceso de germinación y crecimiento de la plántula.....	27
Figura 16. Crecimiento de la plántula.....	28

Figura 17. Esquema de la abertura de los orificios en la base y en la tapa de una caja de Petri y su posterior introducción de la plántula de <i>Medicago truncatula</i> en la caja. Tomado de Nogales (2006).....	29
Figura 18. Plántula de <i>Medicago truncatula</i> recientemente inoculada	29
Figura 19. Plántulas de <i>Medicago truncatula</i> inoculadas con micorrizas.....	30
Figura 20. Plántula de <i>Medicago truncatula</i>	30
Figura 21. Plántula de <i>Medicago truncatula</i> inoculada (donadora de micelio) y dos plántulas de <i>Cinchona officinalis</i>	31
Figura 22. A) Representación esquemática de la planta donante micelio (MDP) en el sistema de cultivo <i>in vitro</i> desarrollado en bi-compartimental placas de Petri forfast micorrización de plantas de semillero. RC (compartimiento de la raíz), HC (compartimiento hifal). Una plántula <i>Medicago truncatula</i> asociado con <i>Glomus intraradices</i> en un sistema de cultivo <i>in vitro</i> en el medio modificado Strullu Romand (MSR), carente de sacarosa y vitaminas. B) Planta de <i>M. truncatula</i> después de 8 semanas de asociación en el MDP en el sistema de cultivo <i>in vitro</i> , en el que una profusa esporas rodamientos micelio extra se produjo en la HC. C) Dos 4 días de edad <i>M. truncatula</i> plántulas se insertan en el sistema para obtener micorrización rápido de las raíces. Las plántulas micorrizadas fueron cultivadas en un medio MSR para analizar el nuevo crecimiento del hongo AM . Fuente (Voets, 2005)	32
Figura 23. Raíz modificada de <i>Cichorium intybus</i>	35
Figura 24 y 25. Esporas MUCL 43204 y MUCL 46238 se conservaban en la raíz modificada <i>Cichorium intybus</i>	35
Figura 26. Plántulas de <i>Cinchona officinalis</i>	36
Figura 27. Plántulas de <i>Medicago truncatula</i>	36
Fig.28. Porcentaje total de plantas muertas y vivas	37
Figura 29. Raíz de <i>Cinchona</i> cambiando su morfología.....	38
Figura 30. Testigo.....	38
Figura 31. Presencia de vesículas	39
Figura 32. Presencia de hifas.....	39
Figura 33. Presencia de vesículas	40

Figura 34. Presencia de hifas.....	40
Figura 35. Testigo.....	41
Figura 36. Porcentaje de Micorrización de las plántulas de <i>Cinchona officinalis</i> : Inóculo 1.- MUCL 43204, Inóculo 2.- MUCL 46238	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación de los hongos formadores de micorrizas	14
Tabla 2.- Porcentaje de Mortalidad de las plantas.....	37

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, y es de gran importancia en los sistemas agrícolas porque tiene la capacidad de incrementar la absorción de nutrientes, estimulación del crecimiento y resistencia al ataque de plagas. A si mismo las plantas de *Cinchona* producen un metabolito conocido como “quinina”, que ha demostrado propiedades antimaláricas. El objetivo del trabajo es dilucidar el efecto de las comunidades de HMA asociados a *Cinchona officinalis* en etapa *in vitro*. En el presente trabajo se evaluó con 20 plantas de *Cinchona officinalis*, bajo un diseño experimental basado en dos inoculaciones por separado: MUCL 46238 *Rhizophagus clarus* (Cuba) y MUCL 43204 *Rhizophagus irregularis* (Canada) co-cultivadas y con un testigo. Los resultados mostraron un porcentaje de colonización de (73,33%) con MUCL46238 y de (62,50%) con MUCL43204. Aún es necesario estudiar la diversidad de HMA asociados a *Cinchona* en Ecuador continental ya que es un campo muy extenso en el cual se puede lograr muchas más investigaciones importantes.

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

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are soil organisms responsible for establishing mutualistic symbiosis between fungi of the phylum Glomeromycota and most vascular plants, and is of great importance in agricultural systems because it has the ability to increase the absorption of nutrients , stimulation of growth and resistance to pests. Self-*Cinchona* plants produce a metabolite known as “quinine”, which has proven antimalarial properties. The objective of this work is to elucidate the effect of AMF communities associated with *Cinchona officinalis* *in vitro* stage. In this paper we evaluated 20 *Cinchona officinalis* plants under an experimental design based on two separate inoculations: 46238 MUCL *Rhizophagus clarus* (Cuba) and MUCL 43204 *Rhizophagus irregularis* (Canada) and co -cultured with a witness. The results showed colonization percentage (73.33%) with MUCL46238 and (62.50%) with MUCL43204. It is still necessary to study the diversity of AMF associated with *Cinchona* in mainland Ecuador as it is a very broad field in which you can achieve many major investigations.

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

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 cardiacas, estimular el crecimiento del cabello y evitar su caída (Garmendia, 2005)

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, 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, 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, 2000; Read, 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, 2001; Smith & Read, 2008), es de gran importancia en los sistemas agrícolas (Gosling, 2006), y tiene capacidad de incrementar la absorción de nutrientes poco móviles, principalmente fósforo (P) (Sanders & Tinker, 1971) (Nakano, 2001). Además, la MA 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 & Linderman, 1992; Varma, 2008).

El cultivo de tejidos *in vitro* puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales (Jiménez, 1998). 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, 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, 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*. 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, 2009).

CAPITULO I

1.- Antecedentes

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, 2006). De la corteza se obtiene la quinina el más antiguo remedio de la malaria.

1.1.2.- Generalidades y usos

Las quinas 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).

Las plantas de *Cinchona* producen un metabolito conocido como “quinina”, que ha demostrado propiedades antimaláricas para combatir fiebres especialmente 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)

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).

Hoy en día existe estudios donde demuestra que existe una especie como *Artemisia annua*, que se usa para tratar la malaria, (Flora of China Editorial Committee, 2011). La planta también tiene efecto antimalárico y antineoplásico (Flora of North America Editorial Committee, e. 2006).

Las últimas publicaciones referidas tratan del aislamiento e identificación de los alcaloides en diversos órganos de la planta obtenidos mediante cultivo celular. Además de los alcaloides quinina y quinidina, en las cortezas de *Cinchona* se encuentran sus análogos no metoxilados: cinconidina y cinconina (Córdor *et al.* 2009).

1.1.3.- *Cinchona officinalis* L.

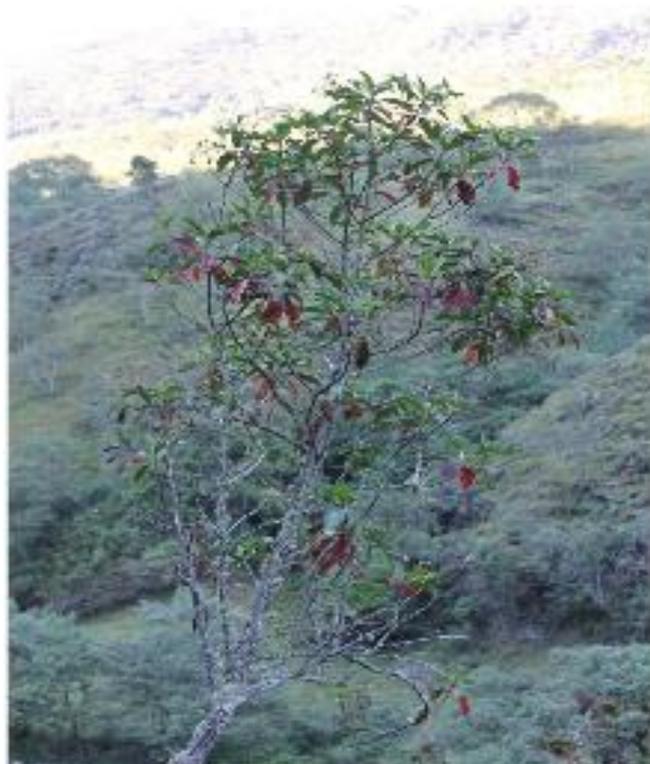


Figura. 1.- Árbol de *Cinchona officinalis*
Foto: Tomada de (Tapia, J. 2013)

1.1.4.- Descripción taxonómica

Grupo: *Euasterids I*

Orden: *Gentianales*

Familia: *Rubiaceae*

Género: *Cinchona*

Nombre científico: *Cinchona officinalis*

Nombre común: *Cinchona*, cascarilla, quina

1.1.5.- Ubicación geográfica en el Ecuador

Es conocido como un árbol o arbusto nativo de los Andes que se encuentra entre los 1000 a 3500 m.s.n.m. En el Ecuador se encuentra ampliamente distribuido en las provincias de Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay, Morona, Zamora y Loja (Jorgensen y Leon, 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.

1.1.6.- 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. **Fig. 1**

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 A.B. Frank en 1885, para describir las asociaciones simbióticas entre raíces vegetales y hongos del suelo (Frank, 1885). En la actualidad se estima que el 90% de las plantas que crecen sobre la tierra están micorrizadas (Smith & Read, 2008).

Es de gran importancia en los sistemas agrícolas (Gosling, 2006). Y tiene capacidad de incrementar la absorción de nutrientes poco móviles, principalmente fósforo (P) (Sanders & Tinker 1971, Nakano, 2001). Además, la MA 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 & Linderman 1992, Varma, 2008).

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, 2002).

1.2.2.- Clasificación Morfológica de Micorrizas:

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

Ectomicorriza

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

hongo-planta (Halling, 2001). Del manto a veces se desprenden algunas hifas emergentes que pueden llegar a formar una red, esto es micelio externo que incluye hifas absorbentes, cordones miceliales y rizomorfos (Brundrett, 1996), estos últimos presentan una parte interna parecida a tubos que se especializan en transportar nutrientes y agua desde largas distancias. El manto incrementa el área de la superficie absorbente de la raíz y con frecuencia afecta la morfología de las raicillas (Halling, 2001). **Fig. 2a**

Ectendomicorriza

Las ectendomicorrizas comparten características con la endo- y ectomicorrizas, ya que presentan manto externo y red de Hartig como las ectomicorrizas, pero también penetran las células corticales de la planta como en las endomicorrizas sólo que no existen vesículas ni arbuscúlos. En algunos casos no se forma el manto, pero siempre la red de Hartig (Peterson y Farquhar, 1994). **Fig. 2b**

Endomicorrizas

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

Ericoide

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

Distribución: zonas polares y alpinas.

Plantas hospederas: ericales.

Hongos endófilos: ascomicetos y basidiomicetos (Álvarez y Ramos, 2004). **(Fig. 2c)**

Orquideoide

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

Distribución: zonas templadas y tropicales.

Plantas hospederas: orquídeas.

Hongos endófilos: basidiomicetos (Álvarez y Ramos, 2004). **(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, 1996). **(Fig. 2e)**

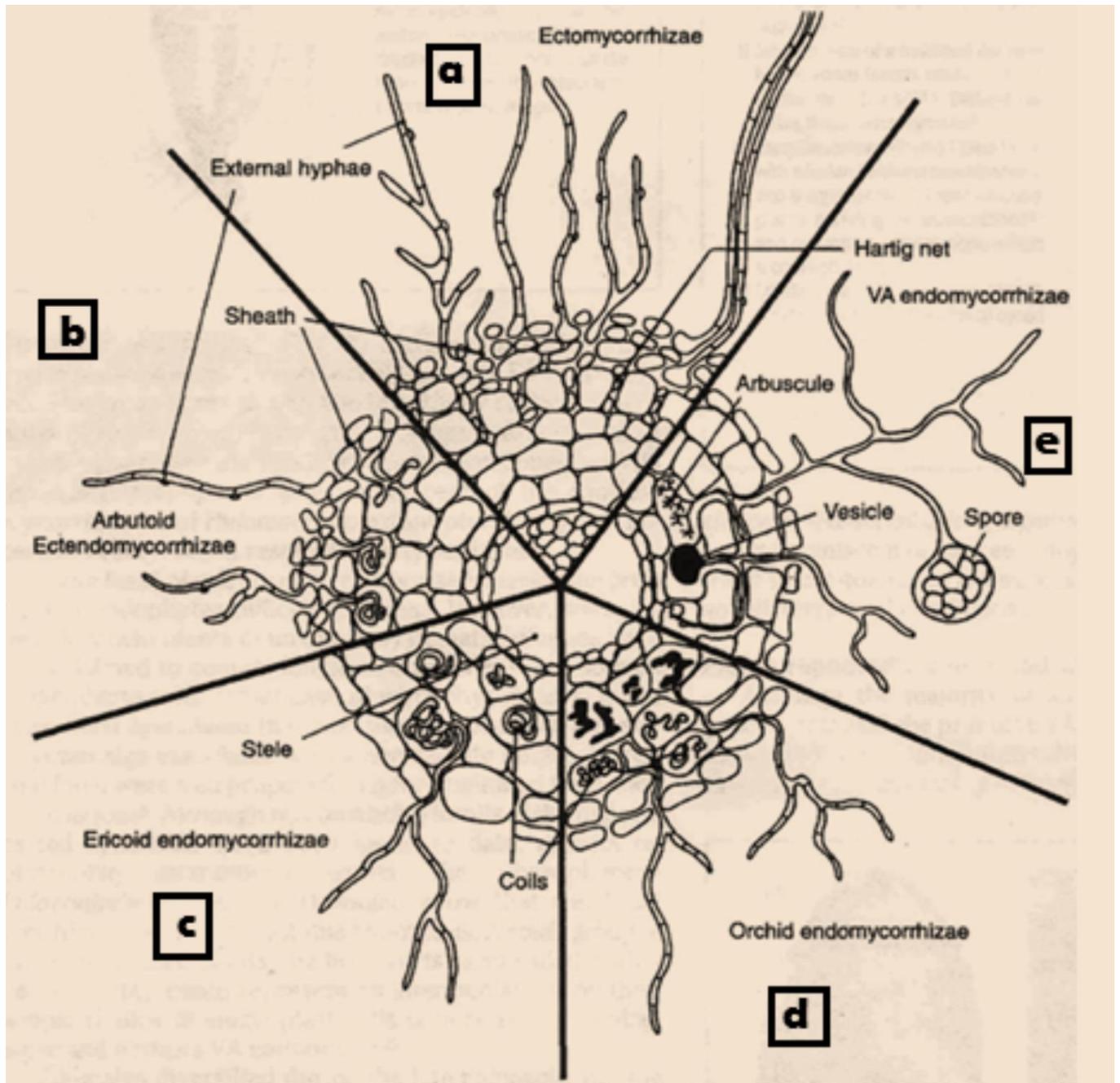


Figura. 2.- Principales estructuras de los tipos de micorrizas
(Figura tomada de Selosse y Le Tacon F. 1998)

1.3.- HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA)

1.3.1.- Descripción de los HMA

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

A cambio, se ha estimado que cerca del 20% del carbono fijado fotosintéticamente a nivel mundial podría depositarse en el hongo simbiote. Ello convierte a esta asociación en la más dispersa sobre el planeta (Gianinazzi-Pearson, 1996; Bundrett, 2002; Harrison, 2005). La asociación micorrízica ha existido desde hace 350 millones de años (Simon et al., 1993; Taylor et al. 1995). **Fig. 3**

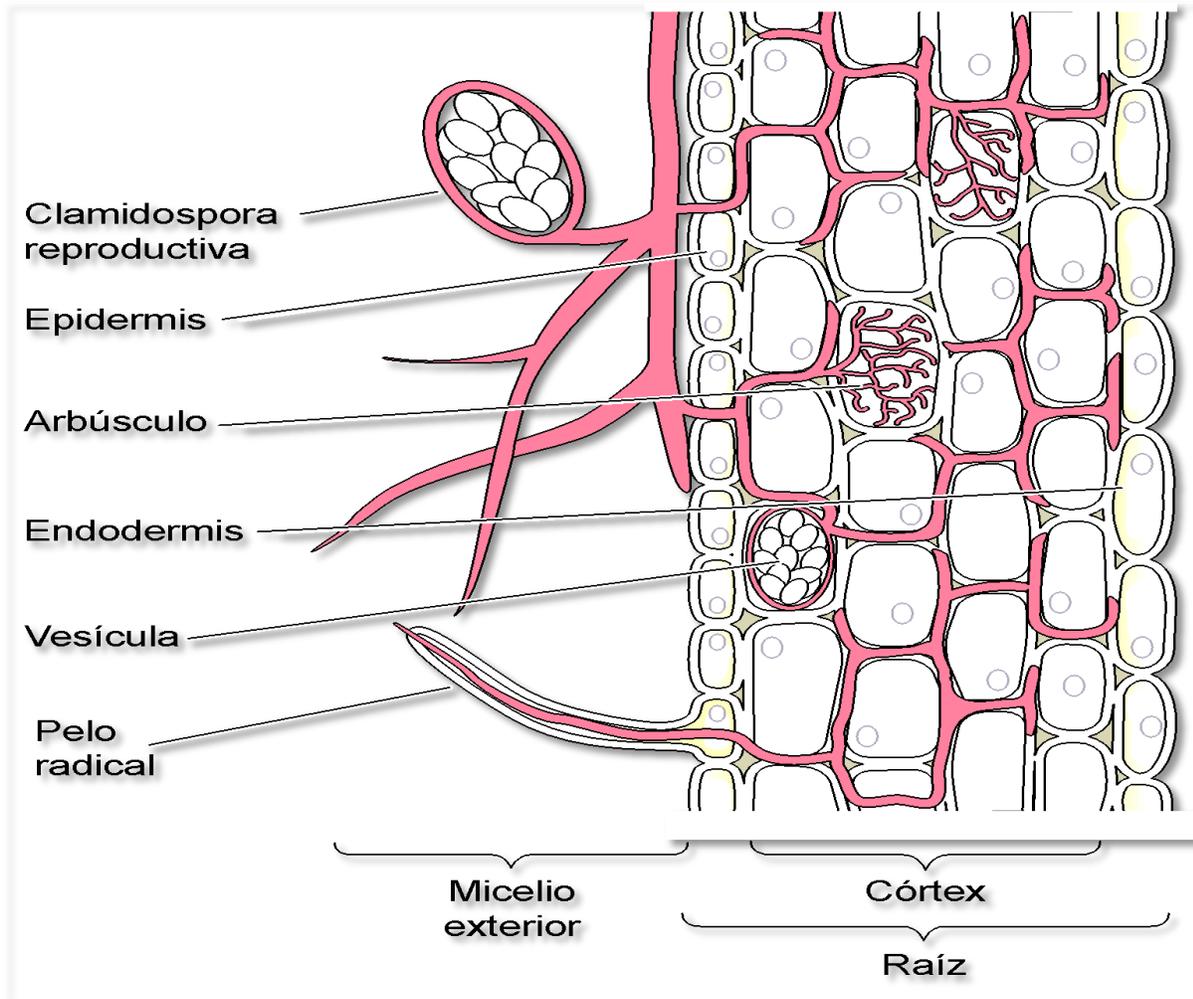


Figura.3.-Representación de un hongo Micorrízico Arbuscular

Fuente: Tayz & Zeiger, (<http://5e.plantphys.net/contents.ph>)

1.3.2.- Estructura de la micorriza Arbuscular

Las estructuras del mico-simbionte que se extienden dentro de la raíz de la planta hospedadora y en el sustrato circundante, son características de cada tipo de micorriza y sirven para su diferenciación (Allen, 2007) **Fig. 5**

1.3.2.1.-Hifas. Tiene contacto con la célula epidérmica o con un pelo radical y se forma un apresorio, a partir del cual se desarrollan ramificaciones infectivas. Posteriormente se produce

la penetración de la epidermis (Harley & Smith, 1983), por actividad mecánica y enzimática, este proceso de penetración puede tardarse desde unas pocas horas y hasta tres días después de iniciado el contacto con la raíz (Declerck, Strullu & Fortin, 2005).

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

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

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

1.3.2.5.- Arbúsculos: Estos se forman poco tiempo después de iniciada la infección mediante la ramificación dicotómica repetidas de hifas intracelulares, hasta la formación de hifas de menos de 0.2 micrómetros de diámetro.

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

1.3.2.6.- Células auxiliares

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

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)

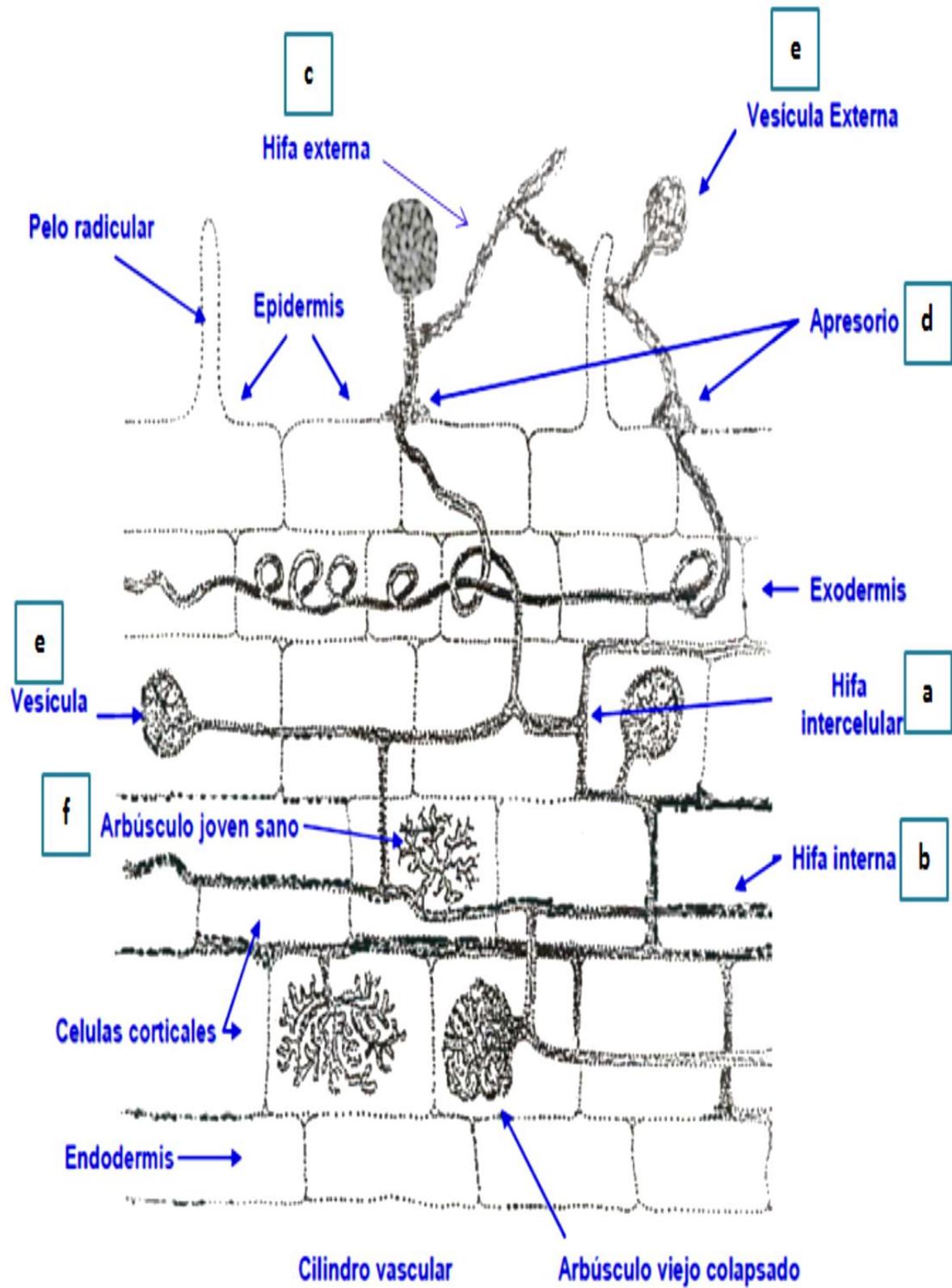


Figura. 4.- Estructura de los Hongos Micorrízicos Arbusculares
 (Figura tomada de Chung, P.2005)

1.3.4.- Clasificación de los HMA

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

Tabla 1. Clasificación de los hongos formadores de micorrizas

Reino	División	Clase	Orden	Familia	Género
Fung	<i>Glomeromycota</i>	<i>Glomeromycetes</i>	<i>Glomerales</i>	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i>
					<i>Funneliformis</i>
					<i>Rhizophagus</i>
					<i>Sclerocystis</i>
				<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglomus</i>
			<i>Diversisporales</i>	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora</i>
					<i>Scutellospora</i>
					<i>Racocetra</i>
				<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>
				<i>Entrophosporaceae</i>	<i>Entrophospora</i>
				<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i>
				<i>Diversisporaceae</i>	<i>Diversispora</i>
					<i>Otospora</i>
					<i>Redeckera</i>
			<i>Paraglomerales</i>	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>
			<i>Archaeosporales</i>	<i>Geosiphonaceae</i>	<i>Geosiphon</i>
				<i>Ambisporaceae</i>	<i>Ambispora</i>
				<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeospora</i>

Fuente: (Schüßler & Walker, 2010)

1.4 - 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, 2008).

Los ecosistemas naturales ofrecen comunidades de hongos micorrízicos nativos que frecuentemente son usados como fuente de inóculo. Estos propágulos fúngicos están

constituidos por trozos de raíces colonizadas, esporas y segmentos de hifas que por lo general se encuentran concentrados en los primeros centímetros del suelo (Bellgard, 1993).

Las muestras de suelo generalmente son tomadas de porciones cercanas a la raíz, éstas, pueden contener diferentes tipos de propágulos, pero son las esporas que por sus características morfológicas permiten la identificación de las especies (Brundrett, 1996). Sin embargo las esporas provenientes de estas porciones de suelo pueden no estar en buenas condiciones para su identificación, por lo que el inóculo tiene que multiplicarse en plantas hospederas micotróficas cultivadas en sustratos o suelo estéril. Este sistema conocido como cultivo trampa permite multiplicar las especies nativas colectadas del campo (Sieverding, 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).

1.5.- ¿CÓMO SE PRODUCE LA SIMBIOSIS PARA FORMAR MICORRIZAS?

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

Primer paso.- Se produce identificación mutua planta-hongo/hongo-planta en la rizósfera, o en regiones próximas a las raíces o pelos radicales. La identificación es al parecer por sustancias exudadas desde la raíz que provocan el crecimiento del micelio y un biotropismo positivo del mismo hacia la raíz.

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

Tercer paso.- Se realiza la colonización y se producen cambios morfológicos y estructurales tanto en los tejidos colonizados por el hongo, como en la organización de la pared celular de la raíz. Posteriormente se produce la integración fisiológica de ambos simbioses (hongo-raíz) y, por último se produce una alteración de las actividades enzimáticas que se coordinan entre los simbioses para integrar sus procesos metabólicos.

Este proceso de asociación para formar Micorrizas provoca alteraciones morfológicas y anatómicas en las plantas colonizadas tales como cambios en: la relación tallo raíz; la estructura de los tejidos radicales; el número de cloroplastos; aumento de la lignificación; alteración de los balances hormonales, etc. Efectos que no sólo son explicables como simple mejora nutritiva de la planta debido al aumento de eficacia en la absorción de nutrientes por la raíz gracias a la formación de la Micorriza, sino que responde a cambios metabólicos más profundos y complejos, debidos a la integración fisiológica de los simbioses (De la Vega, 2006).

1.6.- 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, 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 & 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.(Churasia & Khare, 2005).

1.7.- CICLO DE VIDA DE LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUZCULARES:

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son simbiontes biotróficos obligados; estos cuentan con un ciclo de vida dividido en dos etapas, la primera etapa, son los estadios de reposo y reproductivo que son independientes de la planta y en el que es frecuente observar esporas, esporocarpos y algunas vesículas. Y la segunda etapa, los estadios vegetativos, representadas por las hifas, arbusculos y vesículas dentro de las raíz, implicadas en las interacciones donde ocurre el reconocimiento, la colonización y el intercambio de nutrientes entre hongo-planta(León, 2006).

El proceso de infección de la planta, está relacionada con la actividad de los propágulos infectivos presentes en el suelo y que circunda la raíz, los cuales pueden ser esporas o micelios fúngicos que provienen de raicillas de plantas vivas o segmentos de raíces infectadas (Rocha, 2009).

La manera como el hongo Micorrízico Arbuscular penetra a las células de la planta hospedera sin causarle ningún daño, se da por la invaginación de las paredes del plasmalema a través de una serie de procesos mecánicos y enzimáticos controlados, esta es la primera indicación de una alta compatibilidad entre el hongo y la planta (Siqueira,1988).

Los estados morfológicos del desarrollo son variables y dependen también, de la especie de la planta implicada, pero habitualmente, las esporas del suelo van a germinar y la hifa fúngica va a crecer desde la espора hasta la superficie de las células epidérmicas de la raíz, este contacto, va a formar un abultamiento denominado apresorio, que originará seguidamente la hifa colonizadora que penetrará en dicha célula o atravesará el espacio intercelular¹⁶. La unidad de colonización avanza mediante el crecimiento de las hifas que se extienden entre las células corticales y que generan estructuras características como los arbusculos y las vesículas.²⁸ Semanas después, y sobre la red tridimensional de las hifas se forman las esporas que al madurar completan el ciclo del hongo (García, 2002). **Fig. 6**

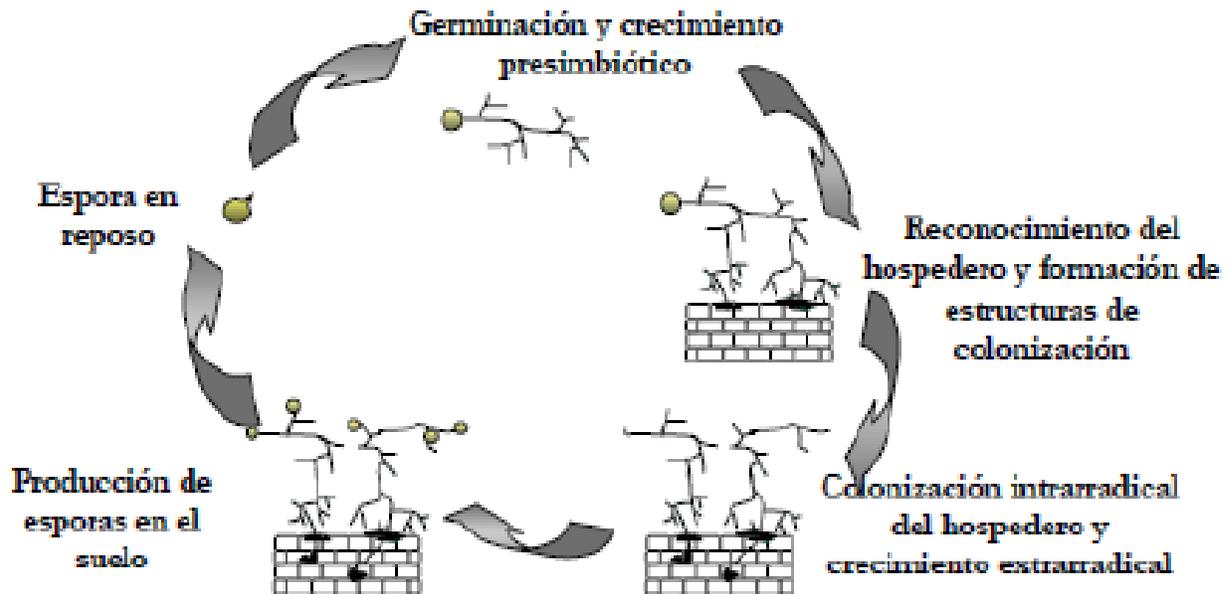


Figura. 5.- Diagrama del ciclo de vida de los HMA durante el establecimiento de la simbiosis funcional (Tomada de Giovannetti, 2000)

1.8.- CULTIVO *IN VITRO* DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

1.8.1.- 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, 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 (Fortín, 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, 1994). Sin embargo, recientes estudios han demostrado el cultivo de *Scutellospora reticulata* y *Acaulospora rehmi*, mediante esta técnica (Dalpe, 2002).

1.9.- 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 de éstas; esta fase de aclimatación es el comienzo de una condición heterótrofa a una autótrofa implicando procesos fisiológicos necesarios para

la supervivencia (Kapoor, 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, 1994; Elmeskaoui, 1995; Sharma, 1996; Siqueira, 1998; Duponnois y Plenchette, 2003; Kapoor, 2008; Roveda, 2007).

1.10.- 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 (Chilton, 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 (Tepper, 1989).

1.11.- Rol ecológico e importancia de los HMA en la restauración de ecosistemas degradados.

La simbiosis micorrízica es clave para la diversidad y productividad de los ecosistemas vegetales naturales en el marco de una agricultura sostenible. Los beneficios que las plantas obtienen al formar estructuras micorrízicas hace que se presenten ventajas tales como mayor absorción de agua y de nutrientes como el N, P, K, Na, debido al aumento del área del suelo que está en contacto con la estructura micorrízica; mayor tolerancia a la salinidad y a las condiciones adversas, disminución de la toxicidad de ciertos metales como el Al, Cu o Zn, debido al incremento de la actividad biológica de la rizósfera, acelerando los procesos de mineralización y reciclaje de nutrientes (Ferrera-Cerrato & Perez, 1995). En los ecosistemas perturbados, debido a la erosión de los suelos se ha observado, que las poblaciones de los HMA nativos disminuyen drásticamente (Barea y Azcón - Aguilar, 1983).

Los ecosistemas naturales presentan una serie de características estructurales y funcionales que permiten su preservación, pero dentro de esto es necesario destacar las relaciones interespecíficas, refiriéndonos a la interacción que presentan los HMA con la plantas. Las micorrizas arbusculares cumplen un rol importante dentro de procesos ecológicos, es por ello que actualmente la utilización y/o aplicación correcta de estos microorganismos permite reducir el uso de energía, la degradación del agroecosistema y las pérdidas de nutrientes de los suelos agrícolas (Hernández, 2000).

Otro aspecto importante a considerar sobre los hongos micorrízicos arbusculares, es su influencia en la colonización de nuevos hábitats. En efecto, se ha observado que intervienen en la estabilización de suelos sueltos y dunas, mediante la formación de agregados de arena por el micelio fúngico. Los factores que contribuyen a mejorar la estructura del suelo son: las hifas de la MA y las raíces de las plantas, las cuales enredan físicamente a los micro agregados

formando así macro agregados, los residuos microbianos, exudados radicales y sustancias pegajosas (polisacaridos) producidas por la MA, los cuales disminuyen de esta forma la erosión del suelo (Clough y Sutton, 1978; Tisdall, 1997).

1.12.- 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).

La intensidad de luz, la fertilidad (la variación de los niveles de potasio y fósforo, los niveles de calcio, magnesio, la baja tasa de descomposición de materia orgánica y la relación Carbono/Nitrógeno), temperatura, humedad, textura, pH del suelo y la presencia de algún elemento contaminante en el suelo, son algunos factores que pueden afectar o en su caso beneficiar el desarrollo de las micorrizas (López, 1990; Cano, 1992).

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, 1992).

De acuerdo con los estudios de Abbott y Robson (1982), las características que definen la eficacia de un hongo MA son: la capacidad de formar un micelio externo y bien distribuido en el suelo; así como formar colonizaciones extensivas en las raíces nuevas, la eficacia para absorber el fosfato de la solución del suelo y el tiempo que las hifas permanecen efectivas en el transporte de elementos minerales.

Existen datos de que comunidades de HMA disminuyen en suelos perturbados por la labranza y el manejo tecnificado. (Jansa, 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 & Echeverria, 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).

El estudio de los hongos micorrízicos arbusculares y la simbiosis formada con las raíces de las plantas hospederas es complicado por la naturaleza biotrófica de los micosimbiontes involucrados. (Fortín, 2002) proponen que para conocer la efectividad del sistema micorrízico

arbuscular, es necesario realizar estudios en el ámbito fisiológico, bioquímico y molecular en condiciones *in vitro*.

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. (Rodrigues, 2004).

CAPITULO II

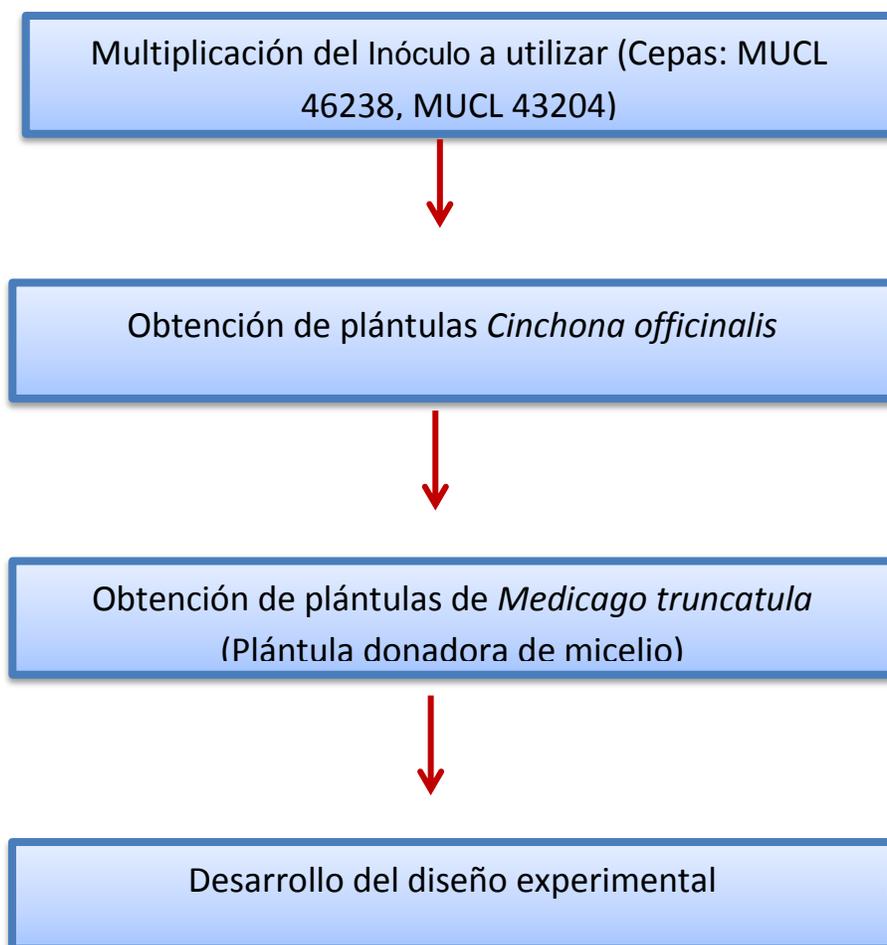
2.- Metodología

2.1.- Localización de la Investigación

La presente investigación es una continuación al proyecto de inoculación y 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.

2.2.- Fases de la investigación

A continuación se detallan cada una de las fases de la investigación contempladas en el desarrollo de los experimentos cuya metodología se la obtuvo de Cranenbrouck S, Voets L, Bivort C, Renard L, Declerck S (2005) y esto se lo realizó de la siguiente manera:



2.3.- Multiplicación del inóculo a utilizar (cepas: MUCL 46238, MUCL 43204)

La fuentes de inóculo fueron las cepas MUCL 43268 y MUCL 40204, proveniente de la Micoteca de la Universidad Católica de Lovaina(MUCL), se trata de una cepa de *Rhizophagus irregularis* proveniente de las Islas Canarias. A estas cepas para la su conservación y multiplicación se las paso a nueva raíz modificada de *Cichorium intybus* tomadas del laboratorio de cultivo y conservación de microorganismos de la Universidad Tecnica Particular de Loja estas fueron utilizadas en esta investigación como hospedero previamente replicadas en medio Modified Strullu Romand (MSR) y se incubaron a la sombra a 27°C. **Fig. 6, Fig.7 y Fig. 8**



Figura.6.- Cepa (MUCL 46238)



Figura.7.- Cepa (MUCL 43204)

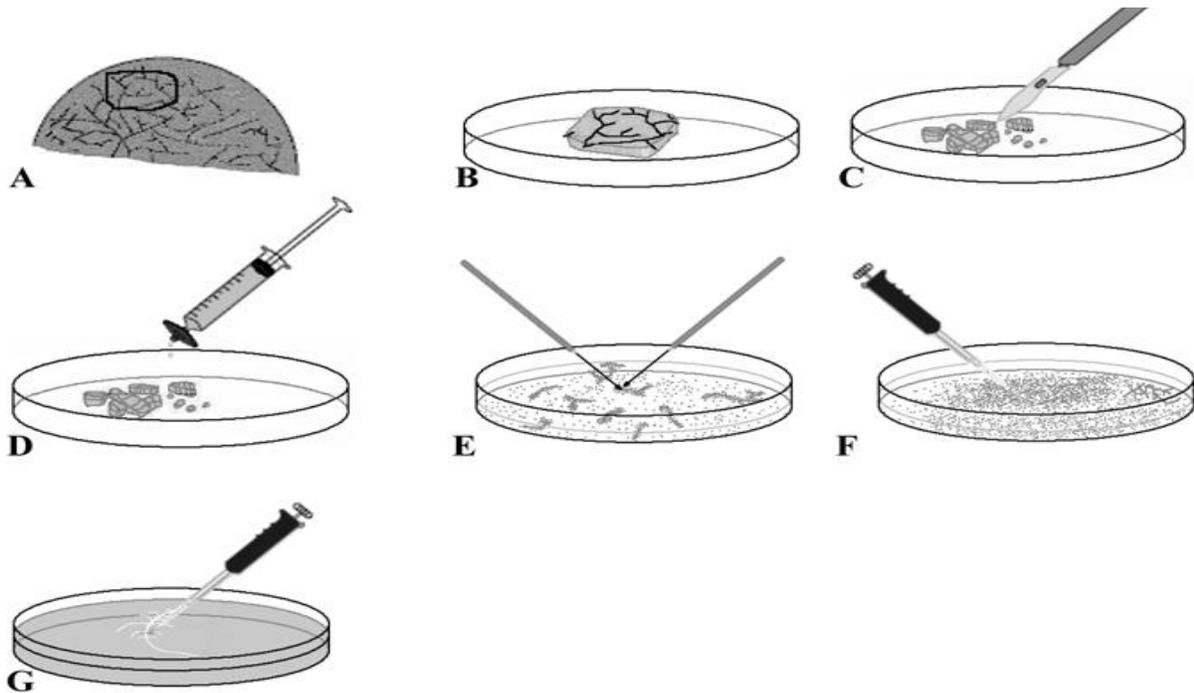


Figura. 8 A-G) Ilustración de las subculturas de esporas disueltas. Una selección de una pieza de gel que contiene las esporas. B-D) La adición de tampón de citrato 10 mM para disolver el gel. Las esporas pueden ser mejor separarse cuando la pieza de gel está fragmentada. E) Separación de esporas en pequeños racimos. F, G) inoculación raíz anfitriona **Fuente:** (Cranenbrouk, 2005)

2.4.- Obtención de plántulas de *Cinchona officinalis*

Para la obtención de plántulas de *Cinchona officinalis*, en un inicio se partió de segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro*, diferenciando los que contienen yemas apicales y axiales, las cuales fueron cultivadas en MS (Murashige and Skoog, 1962) al 50% de la concentración de sales y sin reguladores de crecimiento estas fueron tomadas del laboratorio micropagación. **Fig. 9, Fig. 10 y Fig. 11** Luego para mantener el banco de plántulas se las repicó.



Figura.9.- Plántulas de *Cinchona officinalis*



Figura. 10.- Repicas de plántulas de *Cinchona officinalis*



Figura. 11.- Plántulas de *Cinchona officinalis* repicadas

2.5.- Obtención de plántulas de *Medicago truncatula* (plántula donadora de micelio)

Para la obtención de la plántula de *Medicago truncatula* donante de micelio se partió de semillas obtenidas de la Micoteca de la Universidad Católica de Lovaina (MUCL), donde se les aplicó un protocolo de desinfección y se las sembró en medio MA que contiene (N, P, K) hasta su germinación y crecimiento, luego se las pasó a medio modificado Modified Strullu Romand (MSR) para su utilización en el diseño experimental. **Fig. 12 y Fig. 13**



Figura. 12.- *Medicago truncatula* en etapa de germinación



Figura. 13.- Plántula *Medicago truncatula*

2.5.1.- Protocolo de desinfección que se utilizó para *Medicago truncatula*

Para desinfectar las semillas *Medicago truncatula* se utilizó el mismo protocolo que es utilizado para *Cinchona officinalis*.

Protocolo de desinfección:

Se coloca las semillas en el frasco más agua jabonosa y se agitan por 5 min., enjuagar con agua destilada hasta eliminar el jabón, colocar el alcohol por 30 segundos y enjuagar con agua estéril, colocar 1% de hipoclorito de sodio y agitar por 5 min, enjuagar con agua estéril hasta eliminar el cloro (todo esto se realiza en la cámara de flujo laminar con la ayuda de un cernidor para evitar la caída de las semillas).

Una vez desinfectadas las semillas se las imbiben por 24 horas con agua destilada estéril, pasadas las 24 horas se escurre el agua y se procede a sembrar en medio MA en una cantidad de 20 semillas por frasco. Finalmente los frascos serán etiquetados y

colocados en el cuarto de crecimiento para esperar una respuesta. **Fig. 14, Fig. 15 y Fig. 16**

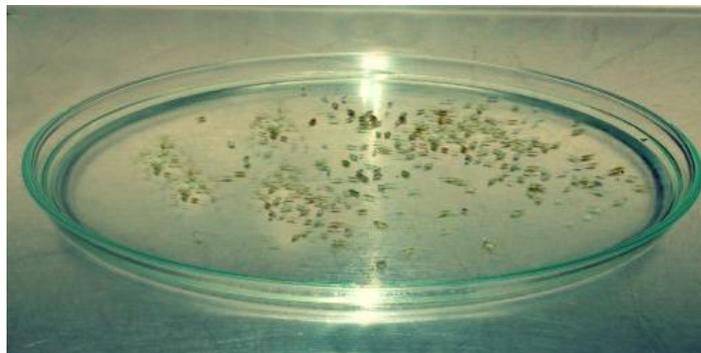


Figura. 14. - Desinfección de semillas



Figura. 15. -Proceso de germinación y crecimiento de la plántulas



Figura.16. - Crecimiento de la plántula

2.6.- Desarrollo del diseño experimental

Se inició con el diseño experimental multiplicando las cepas MUCL 46238 y MUCL 43204 en raíces de *Cichorium intybus* estas fueron utilizadas en este diseño como hospedero de las cepas, se depositaron en medio Modified Strullu Romand (MSR), y se incubaron a la sombra a 27°C, esto se lo realizó mediante la metodología de (Cranenbrouck, 2005). Luego se procedió a desinfectar semillas de *Medicago truncatula* que va a ser la planta donadora de micelio las sembramos en medio MA que contiene (N,P,K) hasta su germinación y crecimiento, después se las pasó a medio modificado Modified Strullu Romand (MSR) para su utilización en el diseño experimental, luego de eso tomamos las plántulas de *Cinchona officinalis* la planta en estudio, las sembramos y replicamos en medio MS (Murashige and Skoog 1962) al 50% de la concentración de sales y sin reguladores de crecimiento, ya obtenido todo el material comenzamos con el ensayo.

Un total de 40 cajas de hongos micorrizicos arbusculares de las cepas (MUCL 46238 y MUCL 43204) en medio (MSR) bicompartimental (sacarosa/sin sacarosa) de 5 meses de edad ya aptos para cualquier ensayo, 50 frascos de plántulas de *Cinchona officinalis* en medio (MS) de 8 semanas de edad y 50 frascos de plántulas de *Medicago truncatula* con 7 días de edad.

Diseño experimental:

Se estableció un sistema de cultivo autotrófico para plántulas *Medicago truncatula* y como lo describe (Voets, 2005). Se hicieron 10 repeticiones con cada cepa (MUCL 46238, MUCL 43204) y se utilizó un testigo. Se comenzó la investigación haciendo dos orificios en un extremo de una caja de Petri ($\pm 2\text{mm}$ de diámetro), uno en la base y otro en la tapa, las placas fueron bicompartidas y contenían 30 ml de medio MSR, donde en la una compartición con sacarosa y en la otra sin sacarosa y solidificado con 3 g/l de Phytigel. A continuación se transfirieron plántulas de *Medicago truncatula* micropropagadas de 7 días de edad de 2cm 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 con las esporas de las dos cepas MUCL 46238 y MUCL 43204 cada cepa en una caja con *Medicago truncatula* por separado estas esporas tienen un periodo de 5 meses de edad. 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. **Fig. 17 y 18**

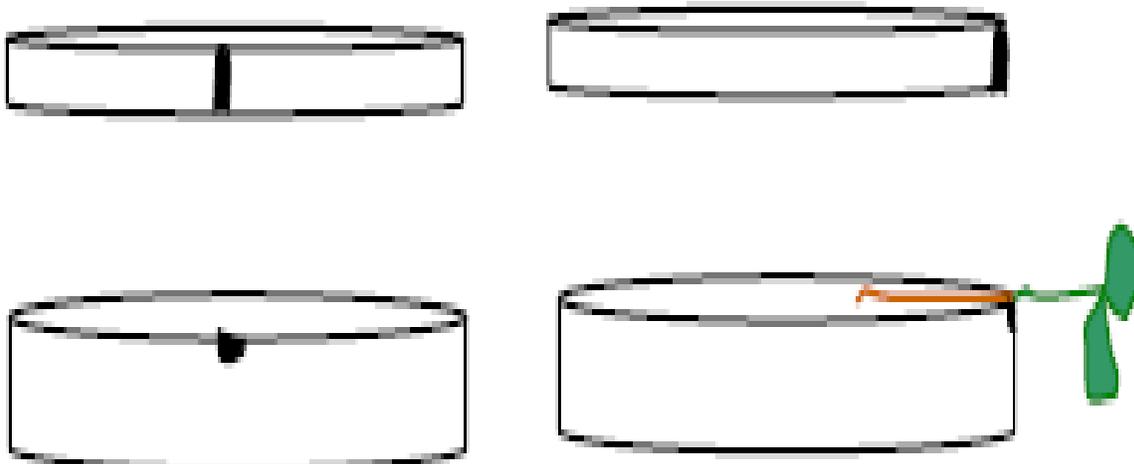


Figura.17.- Esquema de la abertura de los orificios en la base y en la tapa de una caja de Petri y su posterior introducción de la plántula de *Medicago truncatula* en la caja
Fuente: (Nogales, 2006).

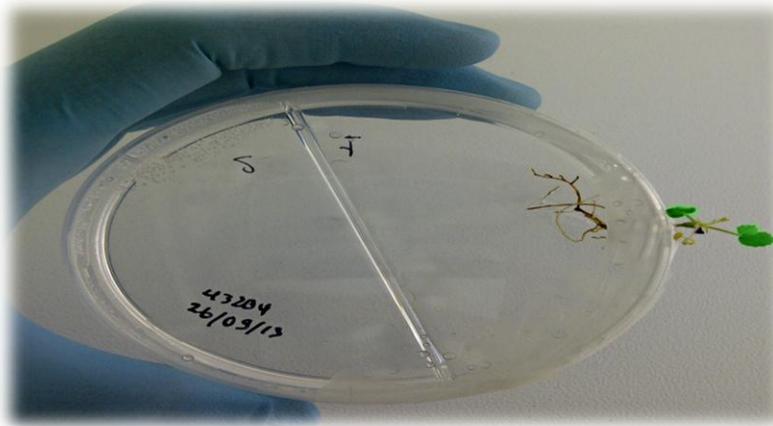


Figura.18.- Plántula de *Medicago truncatula* recientemente inoculada.

Los sistemas autotróficos se cubrieron con cartulinas negras para proteger las raíces de la luz, pero dejando la parte aérea al aire libre. Estas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de 12h luz / 12h oscuridad y una temperatura de 24°C día/. **Fig. 19**

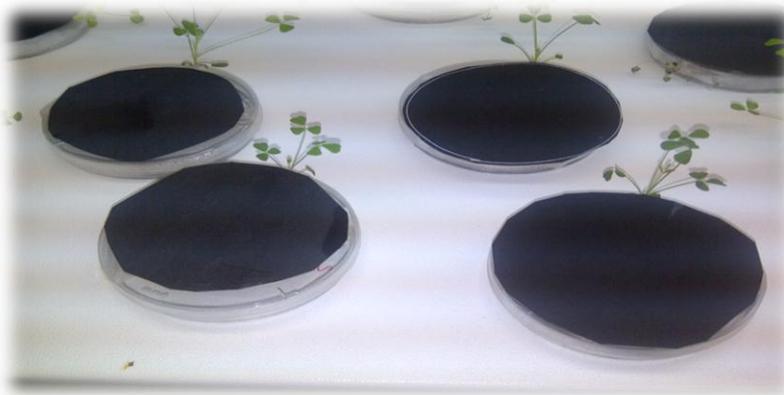


Figura.19.- Plántulas de *Medicago truncatula* inoculadas con micorrizas

A partir de cuarta semana se añadió medio MSR, se enfría y se añade al compartimiento donde está la plántula de *Medicago truncatula* inoculada con las esporas. Se añadió este medio para proporcionar a las plántulas los nutrientes y para mantener el medio en el nivel de la parte superior de la pared de partición.

Después de un período de 8 semanas se observaron 4 parámetros el número de hifas, la longitud de micelio, el número de esporas producidas y la morfología de la raíz con esto observamos que el micelio estaba sobrepasando la pared de partición y poblando el otro compartimiento de la caja, con esto se pudo continuar con el diseño experimental esto fue a las 12 semanas **Fig.20**

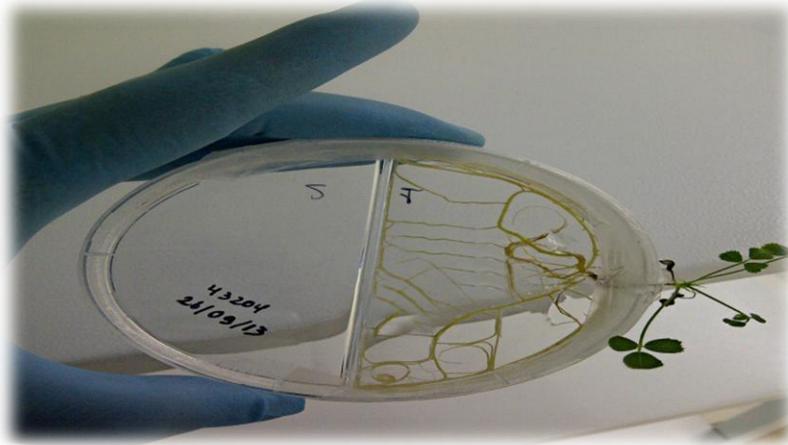


Figura.20.- Plántula de *Medicago truncatula*

Como siguiente paso se le realizó dos nuevas aperturas pequeñas (± 2 mm diámetro cada uno), separadas 4,5 cm uno del otro, se han hecho en la base y la tapa de las cajas Petri utilizando la punta del fórceps calentados. Dos plántulas de *Cinchona officinalis* de 8 semanas de edad se insertaron en cada apertura, las raíces se las colocaron en contacto con la superficie del medio, mientras que el tallo sobresalía a través del orificio de la placa, las cajas Petri se sellaron y cuidadosamente se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de 12h luz / 12h oscuridad y una temperatura de 24°C día/, en esas condiciones se esperó aproximadamente 4 semanas. **Fig. 21**



Figura.21.- Plántula de *Medicago truncatula* inoculada (donadora de micelio) y dos plántulas de *Cinchona officinalis*

Después se sacó de la caja las raíces de *Cinchona officinalis* para poder realizar la tinción según el método de Phillips y Hayman, (1970) para la clarificación y tinción de raíces. Aquí podemos observar en el grafico todo el proceso experimental. **Fig. 22**

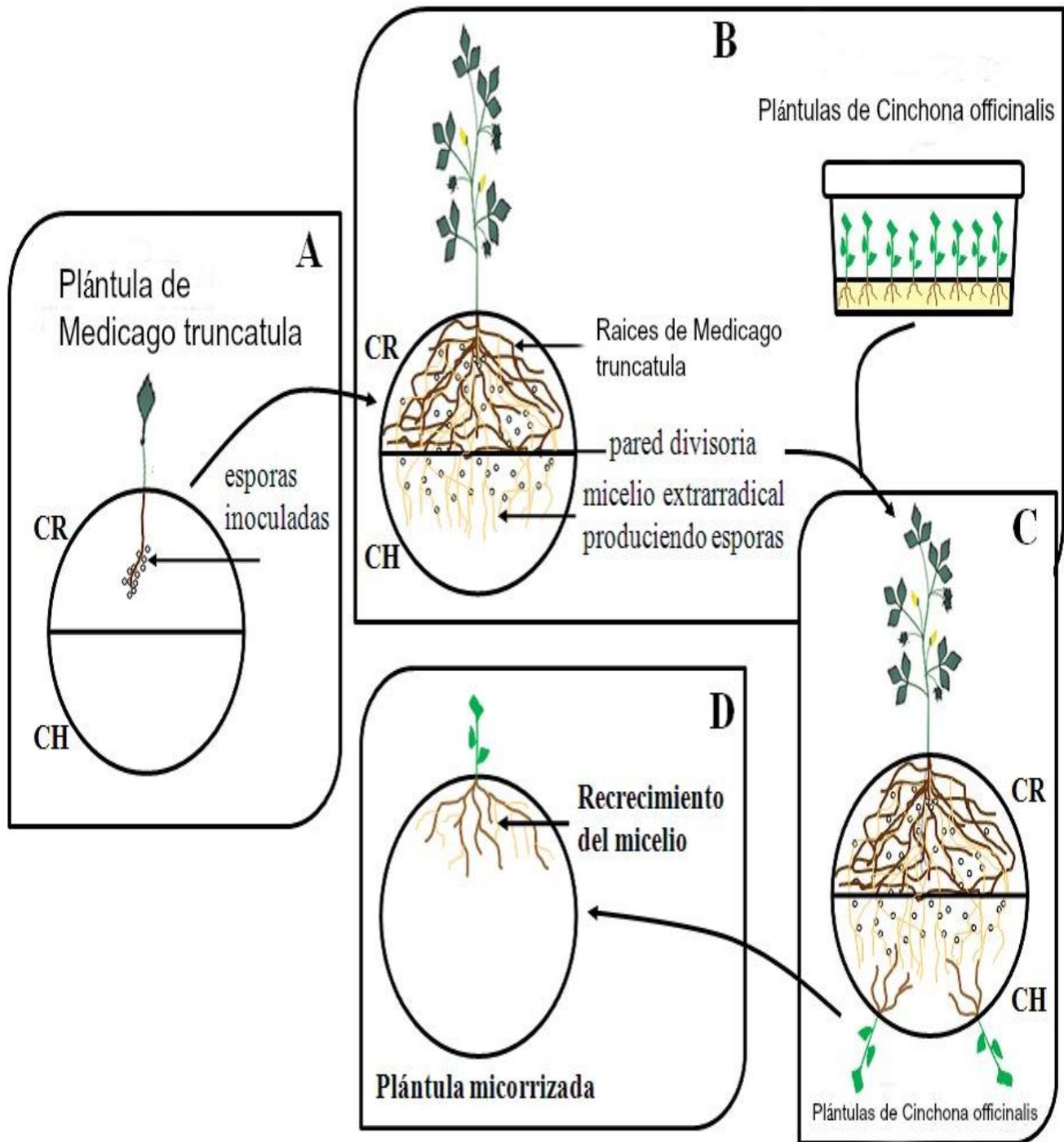


Figura.22.-Representación esquemática de la planta donante micelio (MDP) en el sistema de cultivo in vitro desarrollado en bi-compartimental placas de Petri forfast micorrización de plantas de semillero. RC (compartimiento de la raíz), HC (compartimiento hifal). A) plántula *Medicago truncatula* asociado con *Glomus* intraradices en un sistema de cultivo in vitro en el medio modificado Strullu Romand (MSR), carente de sacarosa y vitaminas. B) planta de *M. truncatula* después de 8 semanas de asociación en el MDP en el sistema de cultivo in vitro, en el que una profusa esporas rodamientos micelio extra se produjo en la HC. C) Dos 4 días de edad *M. truncatula* plántulas se insertan en el sistema para obtener micorrización rápido de las raíces. D) Las plántulas micorrizadas fueron cultivadas en un medio MSR para analizar el nuevo crecimiento del hongo AM.

Fuente (Voets, 2005)

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, arbusculos e hifas. Los niveles de colonización de las plantas se determinaron de acuerdo a la estimación de la micorrización según Trouvelot *et al* (1986) que está en el anexo 2, 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.

CAPITULO III

3.- Resultados y Discusión

3.1 - Banco de cepas (MUCL 46238 y MUCL 43204)

Las esporas de las cepas fueron inoculadas en un total de 100 esporas por caja, dando como resultado un total de 40 cajas en medio (MSR) bicompartimental (sacarosa/sin sacarosa), estas se las conservó en una incubadora a la sombra a 27°C. **Fig. 23, Fig. 24 y Fig. 25**



Figura. 23.- Raíz modificada de *Cichorium intybus*

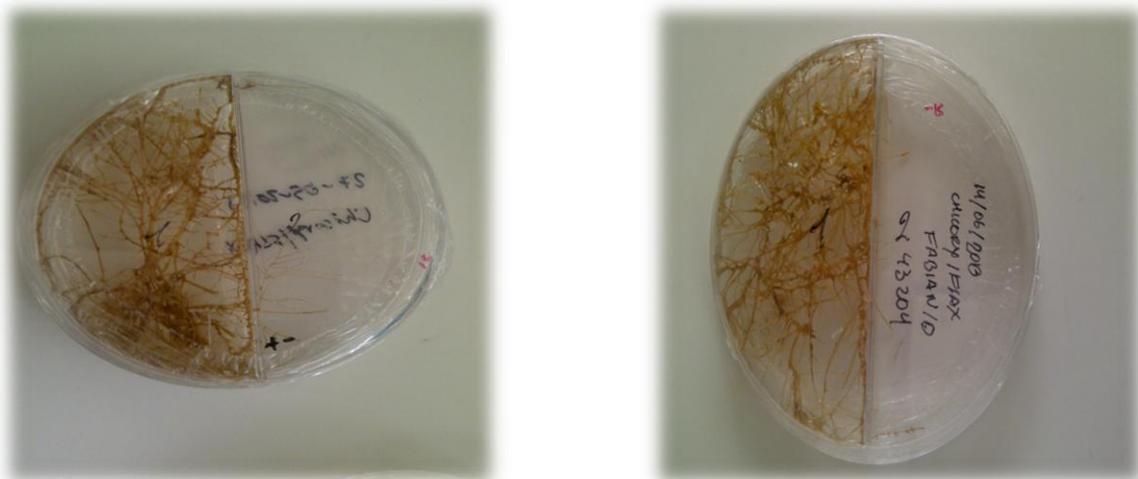


Figura. 24 y 25. - Esporas MUCL 43204 y MUCL 46238 se conservaban en la raíz modificada *Cichorium intybus*

3.3.- Banco de plántulas de *Cinchona officinalis*.

Se las replicadas en medio MS (Murashige and Skoog 1962) al 50% de la concentración de sales y sin reguladores de crecimiento dando como resultado 50 frascos con plántulas de *Cinchona officinalis*. Todo este procedimiento tuvo una duracionde de 3 meses hasta la utilización del mismo **Fig. 26**



Figura. 26.- Plántulas de *Cinchona officinalis*

3.4.- Banco de plántulas de *Medicago truncatula*.

Después de los procesos en la metodología nos dio como resultado 30 plántulas de *Medicago truncatula*. **Fig. 27**



Figura. 27.- Plántulas de *Medicago truncatula*

3.5.- Mortalidad de las plantas:

Tabla 2.-Porcentaje de Mortalidad de las plantas

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

Al analizar la tasa de mortalidad en la elaboración de nuestro proyecto, se observó que la mortalidad no es relevante para ninguna de las especies trabajadas sin embargo se obtuvo un 2% de mortalidad en las raíces modificadas 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.

Uno de los factores de tener 3.8% de mortalidad sería la manipulación que fue realizada en las mejores condiciones y que sin embargo puede existir mortalidad en algún porcentaje pero que de igual forma está por debajo de los porcentajes que se da en el laboratorio que son del 10% de mortalidad. Otro factor de este porcentaje podría ser la adición de azúcares en los medios de cultivo como fuente de carbono, lo cual incrementa la proliferación de contaminantes biológicos; el tamaño pequeño de los envases y la hermeticidad de los mismos (Kozai, Kubota, y Jeong 1997). Finalmente tenemos un 96.2% de plantas vivas más que suficiente para poder seguir con nuestro diseño experimental. **Fig. 28**

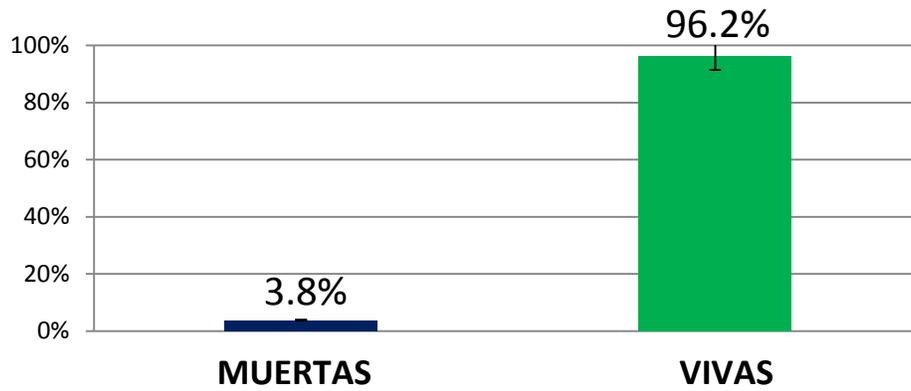


Figura.28. Porcentaje total de plantas muertas y vivas.

3.5 Variables morfológicas

Entre las variables encontramos que la coloración de la raíz fue cambiando y se empezaba a engrosar esto signo de la inoculación con los hongos micorrizicos arbusculares, **Fig. 29 y Fig.30**



Figura. 29- Raíz de *Cinchona* cambiando su morfología



Figura.30.- Testigo

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.

Es importante resaltar que un inóculo con raíces colonizadas como propágulos infectivos es de excelente calidad siempre y cuando se utilice de inmediato, porque sin la planta viva, el micelio colonizador muere en pocas semanas aún almacenado en un ambiente fresco (Leon , 2006). Por eso es importante la evaluación en la morfología con ayuda del microscopio para ir observando paso a paso la investigación y que esta sea lo más continua que se pueda so si tratando de evitar la mínima contaminación al momento de manipular.

La colonización de raíces se establece a través de las hifas en crecimiento activo que se extiende desde una red de micelio extra mediante la planta autótrofa donadora de micelio en condiciones *in vitro*, sistema de cultivo desarrollado por Voets et al. (2005).

Los resultados observados en la arquitectura del micelio fueron como los observados en los primeros estudios que se realizaron bajo condiciones *in vitro* en cultivo monoxénico con raíces de zanahoria transformadas (Bago *et al.*, 1998; 2004).

3.6.- Resultado de la tinción de las raíces de *Cinchona officinalis*

Por medio de la tinción de raíces usando el método de Phillips y Hayman (1970) que está en el anexo 1 y con la ayuda del microscopio, se evaluaron 10 segmentos de raíces en 10 placas teñidas de cada una de las cepas y se pudo encontrar estructuras micorrízicas que confirmaban la colonización.

Algunas de las estructuras que se observan aquí en las (Fig. 31.32, 33, 34 y 35)

Cepa MUCL 46238 en *Cinchona officinalis*

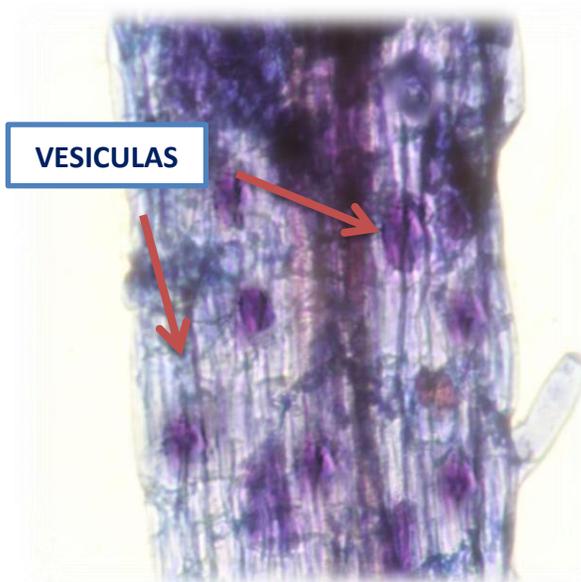


Figura.31.- Presencia de vesículas

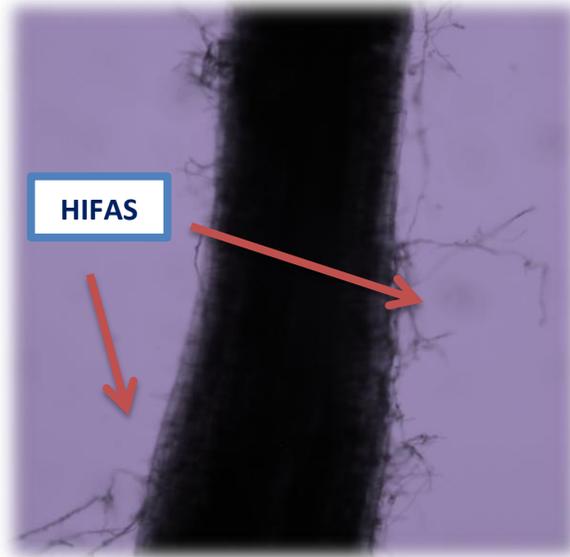


Figura.32.- Presencia de hifas

Cepa MUCL 43204 en *Cinchona officinalis*

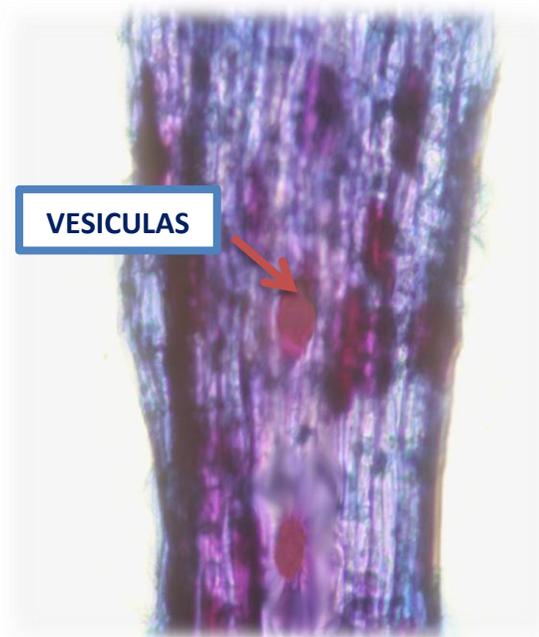


Figura. 33.- Presencia de vesículas

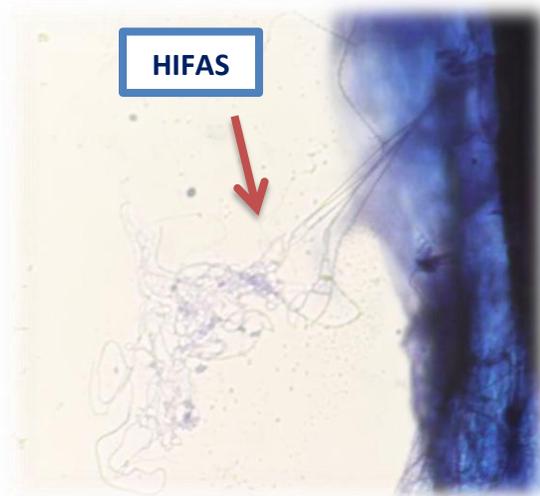


Figura.34.- Presencia de hifas

***Cinchona officinalis* (Testigo)**

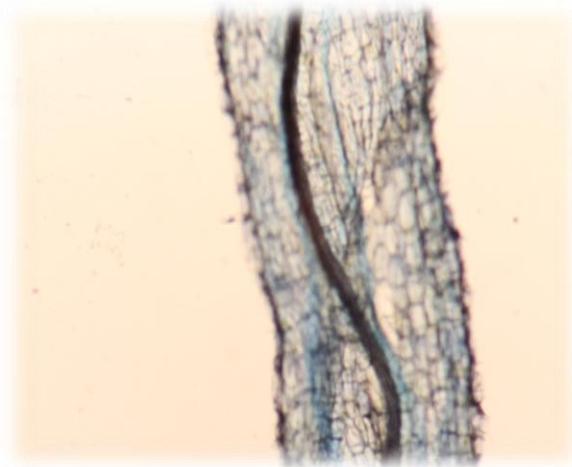


Figura.35.- Testigo

En el presente proyecto de fin de titulación se investigó dilucidar el efecto de las comunidades de HMA asociados a *Cinchona officinalis* en etapa *in vitro* y que con los resultados de la investigación podemos darnos cuenta que la especie *Cinchona officinalis* responde positivamente al ser inoculadas con HMA de estos tipos de cepas en condiciones *in vitro*, esto se demuestra al observar en el microscopio las estructuras características de los HMA presentes en las raíces de la *Cinchona officinalis* dándose así una colonización y simbiosis con los HMA, resaltando que no han sido estudiadas en condiciones tanto en inoculación *in vitro* y en *Cinchona officinalis*. Hasta la actualidad la literatura menciona que solo el 8% de las especies conocidas son usadas en este tipo de cultivos *in vitro* para el resto aún no se conocen las condiciones en las que se desarrollarían. (Cranenbrouck, 2005).

Este resultado concuerda con el encontrado en otras investigaciones ya que existe la colonización de los HMA así como los obtenidos por varios autores (Voets, 2005; Dupré de Boulois *et al.* 2006; Nogales, 2006; Koffi, 2009; Voets, 2009) en plantas autótrofas bajo condiciones de cultivo *in vitro*, donde permitió la asociación exitosa con los HMA. En la

actualidad se estima que el 90% de las plantas que crecen sobre la tierra están micorrizadas (Smith & Read, 2008).

En las raíces de la cepa MUCL 46238 y la cepa MUCL 43204 en *Cinchona officinalis* se encontraron hifas, vesículas pero no se pudo encontrar arbuscúlos de HMA. Es bien conocido que los arbuscúlos tienen una vida corta (cuatro a cinco días; Guerrero, 1996; Rocha, 2009), y cuando estos mueren son reemplazados por otros más jóvenes, siempre y cuando esté activo el intercambio de nutrientes (Cardona, 2000; Guerrero, 1996). Cuando éste cesa los arbuscúlos mueren y de la colonización interna solo quedan las vesículas, que son las estructuras de reserva de nutrientes del hongo (Rocha, 2009). Al observar bajo el microscopio las placas teñidas se lo constató, pues para ambas especies existía la presencia de vesículas. Las vesículas se observan a los 5 días y hasta 5 meses después del establecimiento de la simbiosis (Chabot, 1992).

Con todo esto podemos decir que los arbuscúlos en las muestras de las raíces teñidas no contenían una suficiente cantidad de arbuscúlos formados debido a su constante degradación para el intercambio de nutrientes.

3.7.- Colonización en *Cinchona officinalis*:

Se determinó el porcentaje de colonización total por hifas, vesículas y arbuscúlos de raíces de las plántulas de *Cinchona officinalis* tenidas usando el método de Phillips & Hayman (1970). Con el microscopio se observó que casi todos los fragmentos de raíz, teñidos, estaban colonizados por HMA y de acuerdo a la estimación de micorrización según Trouvelot, et al. (1986). Obtenida a través del software MycoCalc, presentaron una Frecuencia (%F) de 73.33 para la cepa de MUCL 46238 y una Frecuencia (%F) de 62.50 para la cepa de MUCL 43204. **Fig. 36.**

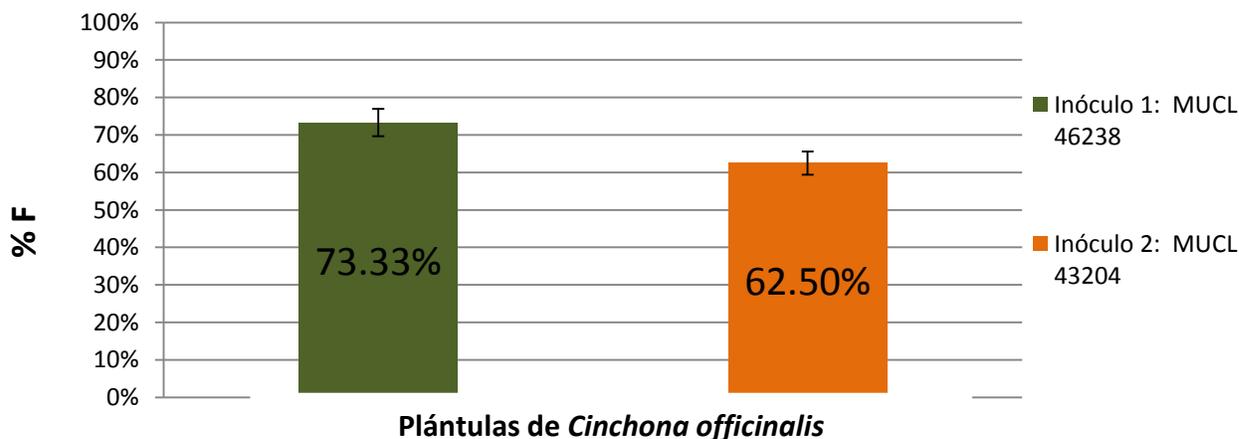


Figura. 36.- Porcentaje de Colonización de las plántulas de *Cinchona officinalis*: Inóculo 1.- MUCL 43204, Inóculo 2.- MUCL 46238.

El porcentaje de colonización puede variar por las marcadas diferencias funcionales y características específicas entre cepas pertenecientes a una misma especie esto obedece a las condiciones genéticas de cada cepa. Cada espora contiene un gran número de núcleos, con estimaciones que van de 800 a alrededor de 35 000 en diferentes especies (Hosny, 1998).

Según Covacevich et al. (2001), la técnica empleada es confiable para determinar el porcentaje de colonización en este tipo de raíces mediante el método de Trouvelot, et al. (1986).

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.

Este sistema ofrece amplias posibilidades de investigación y de aplicación. Varios monocotiledóneas económicamente importantes (maíz, banana), así como hierbas (trébol, plantago) y arbustos (viñedo) han sido colonizado con éxito en su etapa de plántula utilizando este sistema con *M. truncatula*, planta donante (Declerck, 1998).

Aunque el cultivo *in vitro* de los HMA sigue siendo un desafío, ya que sólo se han logrado cultivar algunas especies, se ha convertido en el método más eficaz y predilecto para aislamientos de HMA de especies y condiciones conocidas.

CONCLUSIONES

Se logró la multiplicación de los HMA sobre raíces de *Cichorium intybus*, así como el ensayo de inoculación de las esporas de los hongos MUCL 43268 y MUCL 40204 en *Medicago truncatula*, y se pudo observar el efecto que estos tienen sobre el crecimiento y desarrollo de las raíces.

La multiplicación de las plántulas de *Cinchona officinalis* y *Medicago truncatula*, permitieron la obtención de suficiente material vegetal para el posterior proceso, la contaminación no fue alta pues tuvimos un promedio 2-5 % de contaminación en todas las manipulaciones, lo que fue favorable para poder seguir realizando el proyecto.

Las plantas *Cinchona officinalis* se asociaron con éxito, por primera vez, con un Hongo Formador de Micorriza Arbuscular bajo condiciones *in vitro* y *este tipo de cepas*, se observó que con la cepa MUCL 46238 se obtuvo un porcentaje de colonización de 73.33% y con la cepa MUCL 43204 obtuvo un porcentaje de colonización 62.50% en las raíces de las plantas de *Cinchona officinalis*.

Se observó en otros estudios y se comprobó que los HMA podrían ser utilizados como una estrategia de manejo agrícola en planes de reforestación, a fin de mejorar el crecimiento de especies en peligro de extinción, con todo esto se minimizaría la dependencia de insumos agrícolas, especialmente fertilizantes químicos, con su consecuente reducción en el daño al ambiente.

El sistema de cultivo autotrófico es una herramienta útil para la inoculación de *Cinchona officinalis* micropropagadas con HMA.

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

RECOMENDACIONES

En la metodología de desinfección y germinación en cuestión de materiales y reactivos deben estar en óptimas condiciones tanto estériles y que no estén caducadas para que no exista ninguna contaminación en las semillas tanto de *Medicago truncatulas* y *Cinchona officinalis*.

Cuando se proceda a teñir las raíces de la planta en estudio *Cinchona officinalis* ya inoculados con los hongos micorrizicos arbusculares al momento de ver si hubo colonización revisar bien los tiempos al momento de utilizar la técnica ya que se puede teñir demasiado sin poder observar nada en el microscopio, realizar ensayos antes con otras raíces como practica antes de su utilización en el estudio e investigación.

Se recomienda fomentar la ampliación de banco esporas de las cepas estudiadas para que optimice la colección, conservación y estudio de los hongos ya que en la gran diversidad de este reino falta mucho por investigar.

Seguir aportando en la investigación de HMA para poder ir comprendiendo y entendiendo mucho más la interacción con las plantas, realizando más ensayos en plantas que tengan importancia medicinal o estén en peligro de extinción, de tal forma que se amplíe la investigación en este campo que falta mucho por encontrar y es muy importante.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, L.K. y Robson, A.D. (1982). The role of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture and the selection of fungi for inoculation. *Australian Journal Agricultural Research*, 33: 389-408.
- Allen, M.F. 2007. Mycorrhizal fungi: Highways for water and nutrients in arid soils. *Vadose Zone Journal* 6:291-297
- Álvarez y Ramos, J. (2004) "Hongos y Plantas". Beneficios a diferentes escalas en micorrizas arbusculares. 39-45 amazonia colombiana. Trabajo de tesis para el título de microbiólogo, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Andersson, L y Taylor, C. (1994) "Rubiaceae-Cinchoneae-Coptos apeltea". En: Harling G. Andersson L (Eds), *Flora of Ecuador* no 50.
- Bago B, Shachar H, Pfeffer P. (2000), El micelio externo de la micorriza Arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno, En: Alarcon A., Ferrera R., *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la micorriza Arbuscular*, Mundi Prensa, México pp 78-92.
- Bago, B, Azcón-Aguilar, C., Piché, Y. (1998). Architecture and development dynamics of the external mycelium at the arbuscular mycorrhizal *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia*. Vol 90:52-62.
- Bago, B ,Cano C, Azcón-Aguilar, C, Samson, J, Coughlan, A.P, Piché, Y. (2004) Differential morphogenesis of the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus grown monoxenically on spatially heterogeneous culture media. *Mycologia*. Vol 96: 452-462.
- Barea, J. M. y Azcon, G. A. (1983). Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen - fixing plants. En: *Advances in Agronomy* 36: 1 - 54.
- 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 GJ and Linderman RG (eds) .(1992) *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. ASA special publication No. 54, Madison, Wisconsin, USA.
- Blaszkowski J.(2003), Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) species deposited in the Department of Plant Pathology, University of Agriculture in Szczecin, Poland
- Brachman, A and Parniske, M. (2006). The Most Widespread Symbiosis on Earth. *PLoS Biology*. 4(7): e239
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. (1996) .Working with mycorrhiza in forestry and agriculture, first edition, Aciar Monograph publisher, Australia, 185 pp.
- Brundrett, M.C, N. Bougher, Dell, .B, Grove, T and Malajczuk, N. (1996). Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. *Australian Centre for International Agricultural Research Monograph* 32m, Canberra. p. 374.
- Bundrett, M. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154:275–304

- Cano, A.; Díaz, G.; Honrubia, M. y Torres, P. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales.
- Cardona, G. (2000). Ocurrencia y cuantificación de hongos formadores de micorriza arbuscular asociados a las especies del genero *Capsicum* cultivadas en la Amazonía Colombiana. (Informe técnico). Colombia: Instituto Amazónico de investigaciones científicas SINCHI
- 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
- Chabot S, Bécard G, Piché Y .(1992) Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* 84:315–321
- Chilton 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
- Chung, P. 2005. Hongos micorrízicos comestibles. Opción productiva aplicada a las plantaciones forestales. Aspectos generales. INFOR. 55p.
- Clough, K. S. y Sutton, J. C. (1978). Direct observation of fungal - aggregates in sand dune soil . *Can. J. Microbiol* 24: 333 -335.
- Cóndor E, Oliveira B, Loayza K, Reyna V. (2009). Estudio químico de los tallos de *Cinchona pubescens vahl*. Perú.
- Covacevich F, Echeverría H, (2008), Receptivity of an Argentinean pampas soil to arbuscular mycorrhizal *Glomus* and *Acaulospora* strains. *World J. Agric. Sc.* 4:688-698.
- Covacevich F, Echeverría H, Aguirrezabal L. (2001). Comparación de dos técnicas de cuantificación de infección micorrítica. *Ciencia del Suelo* ,19 (2), 155-158
- Coyne, Mark. (2000). Micorrizas. En: *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid. ISBN: 84-283-2648-7
- Cranenbrouck S, Voets L, Bivort C, Renard L, Declerck S. (2005). Methodologies for in Vitro Cultivation Of Arbuscular Mycorrhizal Fungi With Root Organs, In: Declerck S., Strullu S., Fortin J., (Eds.), *In Vitro Culture of Mycorrhizas*, Belgium, 396 pp.
- Dalpé Y, Declerck S. (2002). Development of *Acaulospora rehmii* spore and hyphal swellings under root-organ culture, *Mycologia*, 94:850–855.
- De la Vega J. (2006). Suelos y Ecosistemas. Las Micorrizas de mayor importancia son: Endomicorrizas, Ectomicorrizas lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura.
- Declerck, S. Strullu, D. & Fortin, J. (2005). *In Vitro Culture of Mycorrhizas*. Germany: Springer.

- Declerck S, Strullu DG, Plenchette C.(1998) .Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia* 90:579–585. doi:10.2307/3761216
- Diop T, Plenchette C, Strullu D. (1994). Dual axenic culture of sheared-root inocula of Vesicular arbuscula 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.
- Duran F. (2003). Manual de cultivos organicos, Alelopatía y transgénicos; Edición 2003 por Grupo Latino Ltda
- Dupré de Boulois H, Voets L, Delvaux B, Jakobsen I, Declerck S. (2006). Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* under *in vitro* conditions. *Environ. Microbiol.* Vol 8: 1926-1934.
- 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.
- Escobar- Acevedo CJ, Zuluaga-Pelaez JJ, Colorado-Gasca G, Paez D. 1998. Micorriza Vesícula Arbúscular (MVA) Recurso microbiológico para desarrollar una agricultura sostenible.
- Ferrera-Cerrato R, y Pérez J. (1995). Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo-México, pp: 36-50.
- Flora of China Editorial Committee. (2011). *Fl. China* 20–21: 1–992. Science Press & Missouri Botanical Garden Press, Beijing & St. Louis.
- Flora of North America Editorial Committee, e.(2006). Magnoliophyta: Asteridae, part 6: Asteraceae, part 1. 19: i–xxiv. In *Fl. N. Amer.*. Oxford University Press, New York.
- 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
- Frank, A.B. (1885). Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. *Berichte der Deutsch Botanische Gesellschaft* 3: 128-145
- Garcia J, Ocampo J. (2002), Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis, *J.Exp. Bot.*, 53:1377-1386
- García-Garrido,J.M, Ocampo,J.A.(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. (1996). Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *The plant cell*. 8:1871 -1883
- Giovannetti M. (2000), Spore Germination and Pre-Symbiotic Micelial Growth. In: Kapulnik, Y., Douds D., Arbuscular mycorrhizas: Physiology and Function, Chapter 3. pp: 47 - 68.
- González M. (2002). Manual de Laboratorio de Técnicas de Micropropagación, Monografías de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid – España
- Gosling, P., A. Hodge, G. Goodlass & G.D. Bending. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems and Env*, 113: 17-35.
- Grattapaglia, D., Machado, M.A., (1990). Micropropagac_ão. In: Torres, A.C., Caldas, L.S. (Eds.), Técnicas e aplicac_ões da cultura de tecidos de plantas. ABCTP/Embrapa-CNPq, Brasília. 99–170p.
- Guerrero E. (1996). Micorrizas recurso biológico del suelo. Bogotá, Colombia: Fondo FEN Colombia.
- Halling, R.E. (2001). Ectomycorrhizae: co-evolution, significance and biogeography. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 88: 5-13
- Hamel C., (1996), Prospects and problems pertaining to the manage-ment of arbuscular mycorrhizae in agriculture. *Agric. Ecos. Env.* 60:197-210.
- Harley, J. & Smith, E. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press Inc., London, UK.
- Harrison, M.J, and Dixon, R.A. (2005). Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant Microbe Interact.* 6: 643–654
- 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.
- Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H.1998. Nuclear DNA contents of 11 fungal species in Glomales. *Genome*41,422–429
- Invam (International Culture Collection of Arbuscular & Vesicular- Arbuscular Mycorrhizal Fungi), (2011), <http://invam.caf.wvu.edu/methods/cultures/GINCO.pdf>
- 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.
- JIMÉNEZ E. 1998. Generalidades del cultivo in vitro. Propagación y mejoramiento genética de plantas por Biotecnología. Volumen I. Cuba. pp. 13 – 55
- 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 Hortic*. Vol 116:227-239.
- Koffi, M.Ch., Enrique de la Providencia, I., Elsen, A., Declerck, S. (2009). Development of an *in vitro* culture system adapted to banana mycorrhization. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (12): 2750-2756.
- Kozai, T.; Kubota, Ch. y Jeong, B. R. (1997). Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, vol. 51, p. 49-56.
- Leon 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
- López O., C. R. (1990). Evaluación de micorriza y su relación con el crecimiento en plantaciones de *Pinus caribea* var. *honduresis* en “La Sabana”, Oaxaca. Tesis profesional. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 136 p.
- 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.
- Morton, Joseph *et al.*, (1996). Morphological basis for glomalean taxonomy. EN: Classification and identification of arbuscular micorrhizal fungi, INVAN, First ICOM Workshop (august 1 – 4). P.16.
- Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
- Nakano, A., T. Kazushi & M. Kimura. (2001). Effect of host shoot clipping on carbon and nitrogen sources for arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorriza* 10(6): 287-293.
- Nieto, M. (2000). Remedios para el imperio: Historia Natural y la apropiación del nuevo mundo. ICAH. Pág. 184-232.
- Nogales García, Amaia Miren. (2006). Estudio de la interacción entre el Hongo Formador de Micorrizas Arbusculares *Glomus intraradices* Schenck y Smith y el hongo patógeno *Armillaria mellea* (Vahl:fr) P. Kuhn en Vid. Tesis Doctoral.
- Peterson, R.L. and M.L. Farquhar. (1994). Mycorrhizas integrated development between roots and fungi. *Mycologia* 86 (3): 311-32
- Phillps J. and 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 publisher, Berlin, pp 3 -34.
- 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.
- 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 agronómico. (Tesis de Grado). Valledupar, Colombia.
- Rodrigues Y., Del Anoval B., Fernandez F., Rodriguez P., (2004). Estudio comparativo del comportamiento de seis cepas de hongos micorrízicos arbusculares en la interacción en el tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Ecología aplicada* 3:162-171.
- Roveda, G., Cabra, L., Ramírez, 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.E. & P.B. Tinker. (1971). Mechanism of absorption of phosphate from soil by *Endogone* mycorrhizas. *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. *Mycorrhiza*. Vol 5:153-156.
- Schüßler, A. & Walker C. (2010). *The Glomeromycota. A species list with new families and new genera*. Gloucester, Inglaterra.
- Schüßler A, Schwarzott D, Gerig H, Walker C. (2001). Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycological Research*. Vol 105, pp. 5-15
- Selosse M, Le Tacon F. (1998). The land flora: a holotroph fungus partnership, *Tree*, 13 (1): 15-20
- 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.
- Sieverding E. (1991) .*Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems*, Academic Press, Great Britain 605pp.

- Sieverding, Edwal et al. (1998). La investigación sobre Micorrizas en Colombia. Curso Nacional sobre Micorrizas. Palmira, memorias, Universidad Nacional de Colombia. Citado por Peroza
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R.C., Lalonde M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincident with vascular land plants. *Nature*, 363: 67-69
- Siqueira J., Cameiro M., Curi N., Rosado S., Davide. (1988). Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to successional groups in Southeastern Brazil. *Forest Ecology and Management*, 107:241-252
- Siqueira J. (1994). Micorrizas. In: Araújo, R.S., Hungaria, M. (Eds.), *Microrganismos de importancia agrícola*. Embrapa-CNPAP, 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 publisher, London. 605 pp.
- Smith, E; Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Third edition. Elsevier.
- Solis G, Cardenas F, (2009). Efecto de los hongos micorrizógenos arbusculares (*glomus fasciculatum*) en el crecimiento y desarrollo del cultivo de tomate de mesa (*solanum lycopersicum*) variedades alambra y fortuna en la zona urcuquí provincia de imbabura. Tesis Doctoral.
- Sylvia, David M. (1999). *Mycorrhizal symbioses*. En: Sylvia, D; Fuitmann, J; Hartel, P. & Zuberer, D. *Principles and application of soil microbiology*. Prentice Hall: New Jersey, p.410.
- 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
- Tapia, J. (2013) Estudio de factibilidad para la producción orgánica y comercialización de Quina (*Cinchona officinalis*) en el cantón Loja. (Tesis de grado). Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador.
- Taylor, N.T., Remy, W., Hass, H., and Krep, H. (1995). Fossil arbuscular Mycorrhizae from early Devonian. *Mycologia*, 87, 560-573.
- Tayz & Zeiger, (<http://5e.plantphys.net/contents.php>)
- Tepfer D. (1989), RFLP-DNA from *Agrobacterium rhizogenes*: a source of genes having applications in rhizosphere biology and plant development, ecology and evolution. In: Koussoff T., Nester E., (eds), *Plant microbe interactions: Molecular and genetic perspectives*. McGraw-Hill, New York, pp 294–342
- Tisdall, J. M. Smith. S. E., y Rengasamy, P. (1997). Aggregation of soil by fungal Hyphae., *Aust. J. Soil.* 159:115-121.

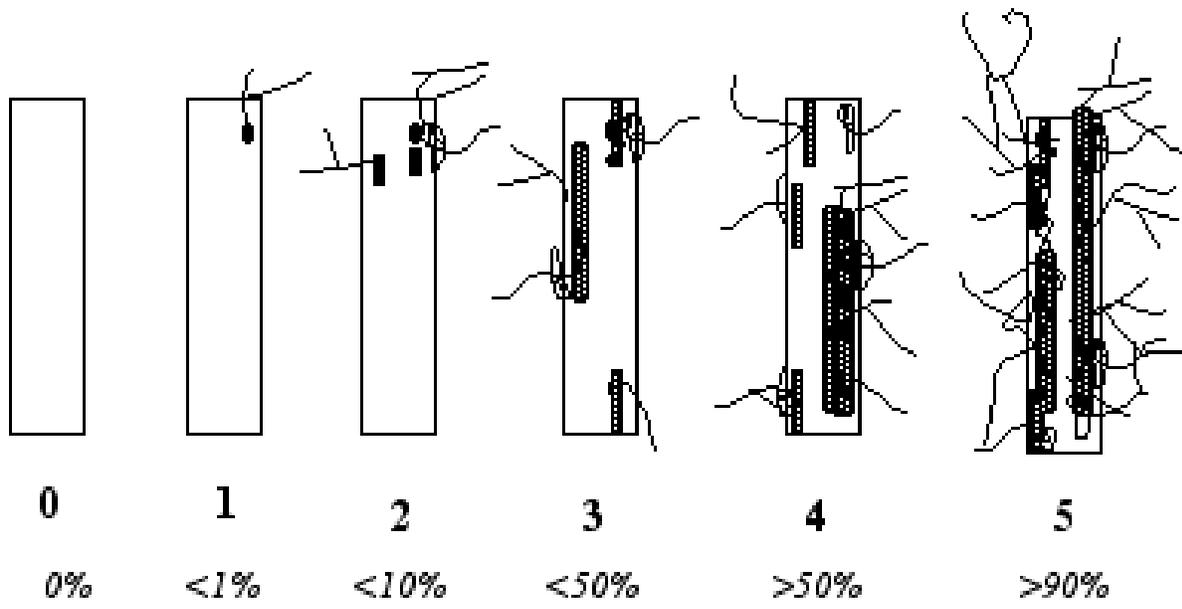
- Trouvelot, A., Kough, J., Gianinazzi, V. (1986). Mesure du taux de mycorrhization va d'un systeme radicaire. Recherche de method s d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi V and Gianinazzi S. (eds.). Physiological and genetical aspects of mycorrhizae (pp. 217-221). Paris: Inra press.
- 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.
- 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.
- Voets, L., Dupre de Boulois, H., Renard, L., Strullu, Désire-Georges., Declerck, S. (2005). Development of an autotrophic culture system for the *in vitro* mycorrhization of potato plantlets. FEMS Microbiology Letters. Vol 248 : 111–118.
- Voets L, de la Providencia IE, Fernandez K, IJdo M, Cranenbrouck S, Declerck S. (2009). Extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi allows fast colonization of seedlings under in vitro conditions. Mycorrhiza 19:346–356
- 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.

ANEXOS

ANEXO 1.- MODIFICACIÓN DEL MÉTODO DE PHILLIPS Y HAYMAN, (1970) 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 Polivinyll-lactoglycerol.
7. Evaluar en el microscopio.

**SCORING MYCORRHIZAL COLONIZATION
IN CLASSES FROM 0 TO 5**



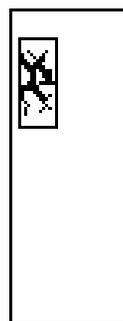
SCORING ARBUSCULE ABUNDANCE

None : A0

Few arbuscules : A1

Frequent : A2

Abundant : A3



A1



A2



A3

