

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Recuperando Una Especie Ancestral "Mortiño" Mediada Por Micorrizas
Nativas

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biología

(Biólogo)

Presentado por:

Yire Adonay Jara Alcivar

Rebeca Elizabeth Moreira Gómez

Tutor:

Milton Barcos Arias

Ph.D

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

El presente proyecto se lo dedicamos a Dios en primero lugar, por abrir nuestras puertas y respaldarnos en la medida de nuestro esfuerzo y dedicación. A nuestros padres, los esposos Jara-Alcivar y Moreira-Gómez quien además de apoyarnos han sido el soporte durante todos estos años e hicieron posible el cumplimiento de una meta de vida. Finalmente, a todos quienes nos quisieron ver triunfar y avanzar en la vida profesional, amigos y familiares, si se pudo.

AGRADECIMIENTO

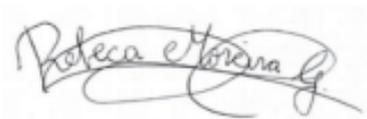
Agradecemos a nuestro tutor Milton Barcos por el conocimiento impartido y las directrices brindadas durante todo el proceso. Nuestro más sincero agradecimiento a Jaime Naranjo quien nos aportó conocimiento y guía durante todo el proceso titular; quien no solo nos ayudó con el conocimiento sino también con el apoyo moral y nos dio una perspectiva más amplia del mundo laboral.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me(nos) corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *(nombre de los participantes)* y doy(damos) mi(nuestro) consentimiento para que la ESPOC realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Yire Adonay Jara
Alcívar



Rebeca Elizabeth
Moreira Gómez

EVALUADORES

.....
Diego Arturo Gallardo Polit

PROFESOR DE LA MATERIA

.....
Ph.D. Milton Senen Barcos Arias

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El mortiño (*Vaccinium floribundum*) es una planta de los páramos andinos, arbustiva que crece de forma silvestre, ofreciendo múltiples beneficios tanto antioxidantes como nutricionales y culturales, ya que sus frutos son utilizados en nuestro país para la producción de la tradicional colada morada consumida en el día de los difuntos. Sin embargo, el cultivo de esta especie con fines comerciales se ha visto afectado por la dificultad que presenta la domesticación fuera de su área natural. Uno de los factores que influenciaría la tasa de supervivencia sería la interacción simbiótica que realiza con un grupo específico de hongos formadores de micorrizas ericoide de manera silvestre y que podría no estar considerándose al momento del cultivo. Así, el presente proyecto integrador busca evaluar un protocolo para la identificación de estructuras micorrízicas simbióticas, además del aislamiento de esporas pertenecientes a estos microorganismos y la aplicación de diferentes inóculos en esquejes vegetales. Para lo cual se recolectaron muestras de mortiño de diferentes localidades del país, y se procesaron haciendo uso de métodos como centrifugación, tamizaje de esporas y tinción de raíces. Se observó la presencia de hifas en el interior de la estructura radicular del mortiño, así como una gran diversidad de esporas en torno a su rizosfera. Se probaron 4 inóculos de esporas, pertenecientes a los sitios de muestreo, encontrando que el perteneciente a Sigchos arrojó una menor tasa de mortalidad en la fase de vivero, sugiriendo que la aplicación de este podría representar un progreso en el potencial de adaptación de esta especie.

Palabras Clave: Mortiño, porcentaje de micorrización, diversidad de esporas, inóculo, tasa de mortalidad.

ABSTRACT

The mortiño (Vaccinium floribundum) is a shrubby Andean moorland plant that grows wild, offering multiple antioxidant, nutritional and cultural benefits, since its fruits are used in our country for the production of the traditional colada morada consumed on All Souls' Day. However, the cultivation of this species for commercial purposes has been affected by the difficulty of domestication outside its natural area. One of the factors that would influence the survival rate would be the symbiotic interaction with a specific group of ericoid mycorrhiza-forming fungi in the wild, which may not be considered at the time of cultivation. Thus, the present integrative project seeks to evaluate a protocol for the identification of symbiotic mycorrhizal structures, in addition to the isolation of spores belonging to these microorganisms and the application of different inocula in plant cuttings. Samples of mulberry were collected from different localities of the country, and were processed using methods such as centrifugation, spore screening and root staining. The presence of hyphae in the interior of the root structure of the mortiño was observed, as well as a great diversity of spores around its rhizosphere. Four spore inocula were tested, belonging to the sampling sites, finding that the one belonging to Sigchos showed a lower mortality rate in the nursery stage, suggesting that the application of this inoculum could represent a progress in the adaptation potential of this species.

Key words: *Mortiño, mycorrhizal percentage, spore diversity, inoculum, mortality rate.*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	5
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA	VI
INDICE DE FIGURAS	VII
INDICE DE TABLAS	VIII
CAPITULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Descripción del problema	2
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos	2
1.3.1 Objetivo General.....	2
1.3.2 Objetivo Específico.....	3
1.4 Marco teórico	3
1.4.1 Descripción botánica del Mortiño y su distribución.....	3
1.4.2 Aplicaciones	4
1.4.3 Domesticación del mortiño.....	4
1.4.4 Biología de micorrizas	5
1.4.5 Micorrizas especializadas ericoides.....	6
1.4.6 Importancia de la micorrización	6
1.4.7 Métodos de propagación.....	7
CAPITULO 2	9
2. METODOLOGÍA	9
2.1 Área de Estudio	9
2.2 Colecta de muestras.....	11
2.3 Aislamiento y conteo de esporas.....	11
2.3.1 Materiales	11
2.3.2 Procedimiento	12
2.4 Evaluación de Colonización por Hongos Micorrízicos.....	13
2.4.1 Materiales.....	13
2.4.2 Procedimiento.....	13

2.5	Ensayo de aclimatación	14
2.5.1	Materiales	14
2.5.2	Inóculo concentrado de esporas.....	14
2.5.3	Preparación del sustrato	15
2.5.4	Diseño experimental.....	15
CAPITULO 3		17
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	17
3.1	Densidad de esporas.....	17
3.1.1	Sigchos.....	19
3.1.2	Pedregal.....	20
3.1.3	Iliniza norte	21
3.1.4	El Ángel	22
3.2	Porcentaje de micorrización.....	23
3.3	Resultado del ensayo.....	26
CAPITULO 4		29
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	29
4.1	Conclusiones	29
4.2	Recomendaciones	29
BIBLIOGRAFÍA		30

ABREVIATURAS

ESPOL Escuela Superior Politécnica del Litoral

HMA Hongos micorrízicos arbusculares

HME Hongos micorrízicos ericoides

SIMBOLOGÍA

Og	Óxido de grafeno
KOH	Óxido de potasio
HCl	Ácido clorhídrico
IBA	Ácido indol butírico
ml	Mililitro
pH	Potencial de Hidrógeno

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 2.1 Mapa localidad El Ángel elaborado en el programa ArcMap.....	9
Ilustración 2.2. Mapa localidad Iliniza norte elaborado en el programa ArcMap	10
Ilustración 2.3. Mapa localidad Pedregal elaborado en el programa ArcMap.....	10
Ilustración 2.4. Mapa localidad Sigchos elaborado en el programa ArcMap	11
Ilustración 2.5 Determinación de los 100 g de suelo para los cuatro lugares muestreados y observación en el estereoscopio de las esporas obtenidas.....	13
Ilustración 2.6 Sustrato preparado a partir de arena, turba y suelo de páramo estéril.	15
Ilustración 2.7 Puesta del diseño experimental: A Esquejes sumergido en 1 litro de solución de agua concentrada con IBA a 0.5 mg/ml, B diseño establecido en una cámara cerrada.....	16
Ilustración 2.8 Diagrama del Diseño Experimental empleado en este trabajo.	16
Ilustración 2.9 Visualización de las esporas de hongos formadores de micorrizas observadas en un estereoscopio.....	17
Ilustración 3 Total de esporas de hongos formadores de micorrizas.	18
Ilustración 3.1 Morfología de las esporas encontradas en Sigchos visualizadas con microscopía óptica a 100x.	19
Ilustración 3.2 Morfología de las esporas encontradas en Pedregal visualizadas con microscopía óptica a 100x (A, B, C, D) Y A 40X (E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, Ñ, O)	20
Ilustración 3.3 Morfología de las esporas encontradas en Iliniza norte visualizadas con microscopía óptica a 100x (A, B, C, D, E, M, N, Ñ, O) y a 40x (F, G, H, I, J, K, L)	21
Ilustración 3.4 Morfología de las esporas encontradas en El Ángel visualizadas con microscopía óptica a 100x	22
Ilustración 3.5 Promedio porcentual de micorrización por muestras 1 y 2 de los lugares Sigchos, Pedregal, Iliniza Norte y El Ángel.....	24
Ilustración 3.6 Micorrización total en porcentaje de los lugares muestreados Sigchos, Pedregal, Iliniza Norte, El Ángel.	25
Ilustración 3.7 Estructuras infectivas micorrícicas ericales: A, B hifas visibles en lente de 40x; C hifas y estructura en espiral semejante a un ovillo observado en lente 100x; D, F, G hifas y estructuras espirales observados en lente de 40x.	25
Ilustración 3.8 Marcaje que representa si la planta se encuentra viva o muerta. Determinado según el estado seco de la hoja y el desprendimiento de esta.....	26
Ilustración 3.9 Visualización de la tasa de supervivencia de los esquejes sometidos a tratamiento.	27
Ilustración 3.10 Porcentaje de prendimiento de los esquejes de mortío con esporas de las diferentes localidades.	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Taxonomía del mortíño.....	3
Tabla 3.1 Infección micorrízica y porcentaje de micorrización de replicas, promedios y total de los lugares muestreados Sigchos, Pedregal, Iliniza Norte y El Ángel.....	23

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador el mortiño (*Vaccinium floribundum*) es considerado una especie nativa, neotropical que crece en los Andes; el cual es empleado en la preparación de alimentos como mermeladas, bebidas y en ciertos postres durante las festividades del país (Luteyn, 2002). Es una planta arbustiva, conocida como una especie sagrada entre los nativos del lugar debido a las características medicinales que poseen los compuestos nutraceuticos de los cuales presentan propiedades antioxidantes (Coba Santamaría et al., 2012). Tanto las propiedades nutricionales como las medicinales han creado una situación contextual propicia para la producción comercial de dicha especie por lo que se han propuesto diferentes proyectos para lograr esta condición.

El suelo posee un sinnúmero de microorganismos que ejercen un rol esencial en las prácticas agrícolas, gracias al papel que desarrolla sobre la recuperación de suelos dañados y el ciclado de fertilizantes minerales (Aguilar-Ulloa et al., 2015). Los hongos representan más del 50% de la masa microbiana presente en el suelo, quienes además de participar en procesos de degradación, también le confieren humedad y estructura, por lo que previenen la remoción de las capas superficiales (Yang et al., 2016).

Existe un hongo específico ericoide que coloniza exclusivamente a las ericáceas, familia a la cual pertenece el mortiño (Yang et al., 2020). Estos hongos especializados se caracterizan por su estructura endomicorrízica distinguida por sus hifas intracelulares en espiral. Por otra parte, son considerados micorrizas obligadas por el éxito evolutivo que tuvieron al asociarse con las especies de la familia Ericaceae. La simbiosis entre hongo y planta permite que eco-fisiológicamente, exista la desintoxicación del suelo y la administración de nutrientes esenciales a la planta (Vohník, 2020).

Al determinar los beneficios que las micorrizas ericoides promueven en el mortiño, los diferentes problemas asociados a su adaptación a ser un cultivo comercial y el creciente interés en sus propiedades antioxidante se ha llevado a considerar, si el cultivo comercial del mortiño se está viendo afectado por la ausencia de estos hongos en su entorno de desarrollo. Por lo tanto, se requiere estandarizar protocolos de aislamiento y reproducción de micorrizas nativas del género *Vaccinium floribundum* (Mortiño) para su aplicación en los sistemas de propagación bajo condiciones controladas.

1.1 Descripción del problema

Vaccinium floribundum Kunth conocida como mortiño provee un fruto utilizado en la realización de la colada morada, una bebida característica del Día de los Difuntos en Ecuador. Además del uso comestible, se ha demostrado que los frutos poseen fuentes naturales de compuestos bioactivos como fenoles, flavonoides, antocianinas, entre otros, los que lo convierten en un poderoso antioxidante, dando un enfoque en lo medicinal, ya que, que estos compuestos ayudan a evitar el estrés oxidativo en las células (Alarcón-Barrera et al., 2018). Este tipo de información ha logrado captar la atención de producir el mortiño como cultivo, pero hasta donde se conoce esta especie no se ha domesticado de manera adecuada, dado que las bayas del mortiño silvestre se recolectan manualmente y se venden en las localidades aledañas (Vega-Polo et al., 2020).

Uno de los problemas para establecer la especie como un cultivo comercial se debe a su distribución limitada, dado que, está condicionada por factores altitudinales y climáticos; el mortiño es exclusivo de los páramos andinos por lo que su climatización suele ser difícil en las demás regiones (Cobo et al., 2018). Mientras que el siguiente problema se debe a la falta de protocolos de propagación eficaces, se han probado propagación mediante esquejes y semillas siendo la última la menos eficaz debido a su lento progreso y existencia de propágulos irregulares (Magnitskiy et al., 2011).

1.2 Justificación del problema

El mortiño es una planta con un valor cultural, alimenticio y medicinal, la importancia adquirida para su producción comercial y las diferentes dificultades en los métodos de propagación que se han mencionado. Provoca la inclinación hacia el uso de micorrizas especializadas que permitan el desarrollo y aclimatación óptimo de la especie en cuestión. Por lo que se hace necesario la evaluación de un protocolo que permita la propagación del mortiño mediada por especies de micorrizas ericoides.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Estandarizar protocolos de aislamiento y reproducción de micorrizas nativas del género *Vaccinium floribundum* Kunth (Mortiño) para su aplicación en los sistemas de propagación bajo condiciones controladas.

1.3.2 Objetivo Específico

- Aislar y caracterizar micorrizas específicas del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) proveniente de la región andina mediante técnicas de obtención de esporas e inoculación.
- Establecer un protocolo para la propagación masiva de las micorrizas nativas del mortiño para el mejoramiento de la producción comercial.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Descripción botánica del Mortiño y su distribución

El mortiño posee la siguiente taxonomía: (Ver tabla 1.1).

Tabla 1.1 Taxonomía del mortiño (Freire, 2004).

Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliidea
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Nombre científico	<i>Vaccinium floribundum</i> kunth

A su vez su descripción botánica se presenta como arbustos con ramificaciones, posee una altura de 2.5 m o menos según las condiciones, las hojas son pequeñas con bordes aserrado y nervación pinnada, el tamaño de las flores es menor a 1 cm, se presentan individualmente o en racimos, dentro de la flor, el cáliz puede ser articulado o no con el pedicelo, mientras que el fruto es parecido a una pequeña uvilla de hasta 8 mm de diámetro, con matices de color azul (Jorgensen et al., 1995).

Las especies de la familia Ericaceae suelen habitar entre 1000 a 3000 metros, en ecosistemas fríos y húmedos de bosques montanos. La mayoría de estas especies neotropicales suelen ser endémicas del lugar dado que crecen en habitas específicos por lo que el *Vaccinium floribundum* kunth es exclusiva de los Andes, además de considerarse nativa en Ecuador y Colombia (Cobo et al., 2016; Luteyn, 2002). En Ecuador, el mortiño se distribuye a lo largo de la sierra ecuatoriana, registrado mediante colectas en las 10 provincias andinas (Coba Santamaría et al., 2012).

1.4.2 Aplicaciones

El fruto de *Vaccinium* está despertando un gran interés debido a su capacidad de contrarrestar un sinnúmero de enfermedades neurodegenerativas afines a la edad y en especial el cáncer (Shukitt-Hale et al., 2008). Esto debido a su elevado contenido de antioxidantes, tales como las antocianinas que poseen efectos preventivos contra estos padecimientos (Neto, 2007). Estos denominados superfrutos poseen un complejo perfil flavonoide con múltiples aplicaciones en la industria farmacéutica, nutracéutica y alimentaria (Bagchi et al., 2006; Gómez Pinilla, 2008). Entre los componentes fenólicos que presentamos encontramos el ácido elálgico, el ácido gálico, las proantocianidinas, ácidos hidroxicinámicos y finalmente las antocianinas, todos estos encontrados en concentraciones relativamente altas (Määttä-Riihinen et al., 2004; Mi et al., 2005). Otro tipo de compuesto encontrado en la fruta de *Vaccinium* son los estilbenos, que además suelen encontrarse en uvas y vinos (Rimando et al., 2004).

Además, se han reportado aplicaciones en cuanto a nanotecnología, que es un área de gran valor en las ciencias aplicadas. Sintetizando un compuesto de plata grafeno, por medio del óxido de grafeno (GO) y la reducción de la plata haciendo uso del arándano del mortiño. El extracto del fruto se usó para reducir las hojas de óxido de grafeno, obtenidas por medio del grafito. Este material posee múltiples aplicaciones en la nanoeléctrica, nanomedicina, células solares entre otros, gracias a sus propiedades mecánicas, ópticas y biológicas (Vizueté et al., 2016).

1.4.3 Domesticación del mortiño

Entre los principales factores limitantes para propagar la siembra y producción a gran nivel, se suma el déficit de información acerca de su ecología con relación a las exigencias de sustrato, clima y rizosfera. Lo cual restringe la domesticación y falta de aprovechamiento de su potencial alimentario. Estudios como el de Racines y colaboradores en el 2016 encontraron que esto podría deberse a la presencia de plantas cercanas que le brindan un microclima beneficioso. La vegetación exuberante que crece a la par con el mortiño mantendría la temperatura más alta que la del ambiente, esto le ayudaría a protegerse de bajas temperaturas durante la noche y de los rayos solares durante el día. Es así como, el mortiño necesitaría temperaturas bajas pero superiores a las del medio ambiente para su óptimo crecimiento, además de una alta humedad relativa. Se sabe también que esta planta se desarrolla de mejor manera con

concentraciones altas de fósforo, hierro y cobre y concentraciones bajas de zinc, calcio y magnesio, parámetros que podrían jugar un papel esencial en su domesticación.

Otro factor importante que se debe considerar para incrementar el potencial de domesticación es el análisis de los microorganismos mostrados en el suelo y entender la dependencia del desarrollo de la planta en relación con este. En la actualidad se cuenta con evidencia de que la filtración de nutrientes, la detención de agua y la disminución de patógenos se ve influenciada en gran parte por los microorganismos benéficos que se encuentran en el sustrato, por lo cual es necesaria la identificación de dichos simbioses. Los estudios relacionados a la caracterización de estos organismos endófitos, encaminaría los esfuerzos por cultivar estas especies de plantas silvestres y mejorar la producción del fruto a nivel comercial. Otro aspecto por tomar en cuenta para el correcto establecimiento de un programa de domesticación es el estudio de la variabilidad genética de *Vaccinium floribundum* (Meléndez-Jácome et al., 2021).

1.4.4 Biología de micorrizas

Se denominan micorrizas a aquellos órganos compuestos definidos que se forman entre el tejido celular y las hifas de diversos hongos y que varían en composición y estructura dependiendo del huésped, el microorganismo y los factores ambientales. Las raíces brindan hábitats especializados de donde los hongos obtienen los recursos necesarios para el crecimiento, provenientes del flujo continuo de nutrientes, la pérdida de células senescentes y diversos productos del crecimiento y el metabolismo (Harley, 1968).

Es así como esta relación simbiótica parte de la estimulación del micelio, el cual se origina a partir de la germinación de la espora, y el crecimiento de las hifas, dando inicio al establecimiento de la estructura micorrízica que va a formar los propágulos. Es el micelio entonces el encargado de colonizar el córtex, previo reconocimiento mutuo mediado por metabolitos y exudados de la raíz. El apresorio se genera como resultado del desarrollo del micelio, produciendo un biotropismo positivo del mismo. Esto dará paso a las alteraciones morfológicas y estructurales tanto en los tejidos infectados, como en los componentes celulares del hongo, que finaliza con la integración de ambos organismos a nivel de procesos metabólicos, mediados por acción enzimática (Molina et al., 2005).

Por medio de este mecanismo, los hongos captan, y distribuyen aquellos micronutrientes encontrados en el suelo tales como: nitrógeno, fósforo y agua hacia el interior de la

planta, al mismo tiempo que esta le brinda al microorganismo azúcares simples necesarias para su desarrollo (Baeza-Guzmán et al., 2017; Comandini et al., 2012). Esto se podría deber en gran parte a la baja capacidad reductora que poseen las plantas pertenecientes a los géneros Ericaceae y Epacridaceae (Havill et al., 1974; Stewart et al., 1993), para obtener los iones nitratos, dependiendo así, en gran parte de la colonización micorrízica. Además, de que esta relación ha demostrado poseer capacidad saprofita, permitiendo así la competencia con los descomponedores, y como consecuencia la captación de nitrógeno y fósforo provenientes de los desechos orgánicos (Read, 1996).

1.4.5 Micorrizas especializadas ericoides

Dependiendo de la estructura micorrízica formada podemos encontrar tres grupos principales que son: ectomicorriza, ectendomicorrizas que abarcan a las micorrizas arbutoides y monotropoides; y por último las endomicorrizas, divididas en ericoides, orquidoides y arbusculares, distinguidas por presentar colonización intracelular del hongo (Read, 1996). La micorriza ericoide es una asociación entre aquellos individuos pertenecientes al orden Ericales y el hongo simbionte que coloniza a cada familia, entre las que se encuentran Ericaceae, principalmente en el hemisferio norte y Epacridaceae en el sur (Smith & Read, 1997). Ambas familias comparten micorrizas morfológicamente muy parecidas, en las que los endófitos fúngicos construyen hifas en forma de hélice en el interior de las células de la epidermis, con bajo desarrollo del micelio en torno a la raíz superficial (Chambers et al., 2000). Anteriormente se creía que las ericáceas silvestres eran colonizadas únicamente por *O. maius* (Hambleton et al., 1998).

Sin embargo, estudios posteriores como los de Perotto y colaboradores en el 1996, encontraron que aquellas ericáceas que crecen en lugares naturales pueden ser habitadas por diversos taxones de hongos endófitos, e incluso existirían especímenes capaces de formar micorrizas con ambas familias Ericaceae y Epacridaceae, debido a sus altas similitudes estructurales (Liu et al., 1998; Read, 1996). Este tipo de micorrizas prepondera en climas fríos y en suelos de latitudes altas (Camargo-Ricalde et al., 2012).

1.4.6 Importancia de la micorrización

A pesar de que se tiene muy poca información con respecto a las micorrizas ericoides, la interacción específica entre este hongo y las plantas de arándano ha demostrado ser una respuesta co-evolutiva exitosa (Scagel, 2005). Según Molina y colaboradores en el

2005, la presencia de micorrizas en plántulas con condiciones controladas favorece el crecimiento radicular en etapa de vivero, así como al enraizamiento en la propagación in vitro. Varios estudios, además, han reportado que esta relación simbiótica contribuye al desarrollo óptimo de la planta en etapa de vivero, además de reducir la demanda de nutrientes por fertilización complementaria (Koron & Gogala, 2000; Scagel, 2005). Según Starrett (2003) una inoculación en etapa de propagación es fundamental para potenciar el crecimiento radicular y desarrollo del tallo en plantas de arándano. Roveda y colaboradores en el 2007, por otra parte, mencionaron que utilizar micorrizas arbusculares favorecería la demanda de fotosintatos y que beneficiaría el crecimiento posterior a la siembra, debido a que la presencia de hongos estimula el aumento de biomasa a nivel radicular.

También se reportó un control más eficiente de enfermedades, además de la disminución de gastos por el uso de insecticidas y fungicidas, esto podría deberse a que las micorrizas crean una barrera física difícil de penetrar en el córtex de la raíz, aumentando así la resistencia a patógenos (Khanizadeh et al., 1995).

Por otra parte, Corredor (2003) y Barea (2003), han demostrado que esta relación simbiótica mejora varios procesos fisiológicos relacionados al intercambio iónico y CO₂, lo cual favorece la transpiración, la conductancia estomática y la optimización del agua. Esto facilitaría la adaptación a sustratos salinos y contrarrestaría el déficit de nutrientes inducido por presión iónica. Además de disipar los cambios hormonales como respuesta a este tipo de estrés.

El uso de hongos micorrízicos de forma controlada en viveros es actualmente un mecanismo necesario para la obtención de resultados positivos, para esto es necesaria la creación de un programa eficaz que haga uso de hongos competitivos, tanto en viveros como en el campo. El factor principal es establecer las cepas propicias provenientes del campo que colonizan de manera natural estas poblaciones de plantas, esto con el fin de que, al momento del traspaso a la etapa de campo, los hongos no sean desplazados por las especies nativas (Carrillo et al., 1992).

1.4.7 Métodos de propagación

La propagación vegetal es el mecanismo de reproducción asexual mediante el cual distintas partes de una planta pueden dar origen a la generación de una nueva a partir de una célula, tejido u órgano perteneciente a una planta madre. Estos métodos no

precisan de semillas y van desde los más sencillos como la reproducción por estacas, hasta los más complejos como la reproducción *in vitro*. Es así como diversas partes de una planta bajo condiciones controladas de luz, humedad, temperatura, etc.) son capaces de generar un individuo completo, esto gracia a la propiedad que poseen las plantas de des diferenciar sus tejidos maduros e iniciar nuevamente la actividad meristemática, multiplicándose y dando origen a los distintos órganos vegetativos, propiedad que se conoce como totipotencia (Espeland & Emam, 2011).

Entre los diversos métodos que existen de propagación encontramos los naturales, cuando se trata de estructuras propias de la planta que le brindan la capacidad de multiplicarse de manera asexual como (bulbos, rizomas, tubérculos, etc.) O artificiales cuando son generadas por actividad antrópica como la reproducción por esquejes, injertos, acodos y el cultivo *in vitro*. La propagación por esqueje consiste en la utilización de trozos de tallos, que al ser situados bajo condiciones ambientales adecuadas son capaces de generar plantas equivalentes a la planta madre, gracias a la inducción de raíces y el desarrollo de un brote vegetativo (Dong et al., 2019).

Proceso que va a depender de la especie y del periodo de crecimiento en el que esté la misma. Para esto se pueden utilizar brotes, que son puntas de crecimiento rápido producidas durante la primavera. Ramas tiernas, que son aquellas ramas verdes que se dan cuando el crecimiento apical se vuelve más lento; ramas semilignificadas, que son aquellas de tallos más gruesos y fuertes generados una vez que el crecimiento ha disminuido y finalmente ramas lignificadas que se toman durante la fase de latencia (Dong et al., 2019).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Área de Estudio

Se realizó, la recolección de cuatro muestras con dos respectivas replicas, los ejemplares comprendían plantas de mortiño con sus concernientes raíces y suelo, aledaño a la misma planta, la localización general comprende el Páramo de la Sierra ecuatoriana, distribución que sigue la especie. El primer muestreo (*Ver Ilustración 2.1*) fue a 3 475 metros de altitud en la Reserva Ecológica “El Ángel” proveniente del cantón Espejo provincia de Carchi con las siguientes coordenadas 0° 31’ 31.5” S y 78° 28’ 10.9” O.

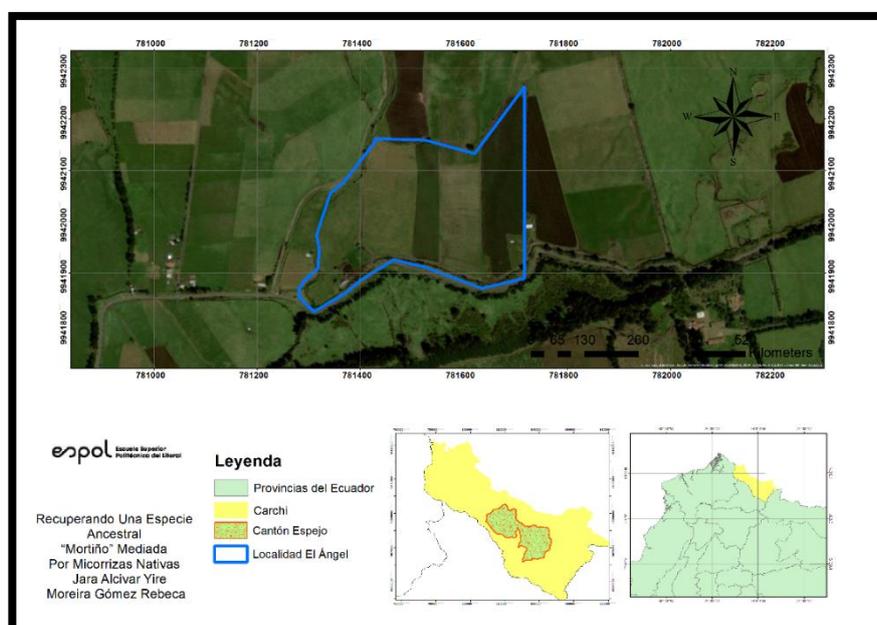


Ilustración 2.1 Mapa localidad El Ángel elaborado en el programa ArcMap.

El segundo muestreo (*Ver Ilustración 2.2*) se realizó en “Iliniza norte” ubicado en la provincia de Cotopaxi a 3800 metros de altura con las coordenadas 0° 37’ 38” S y 78° 41’ 4.8” O.

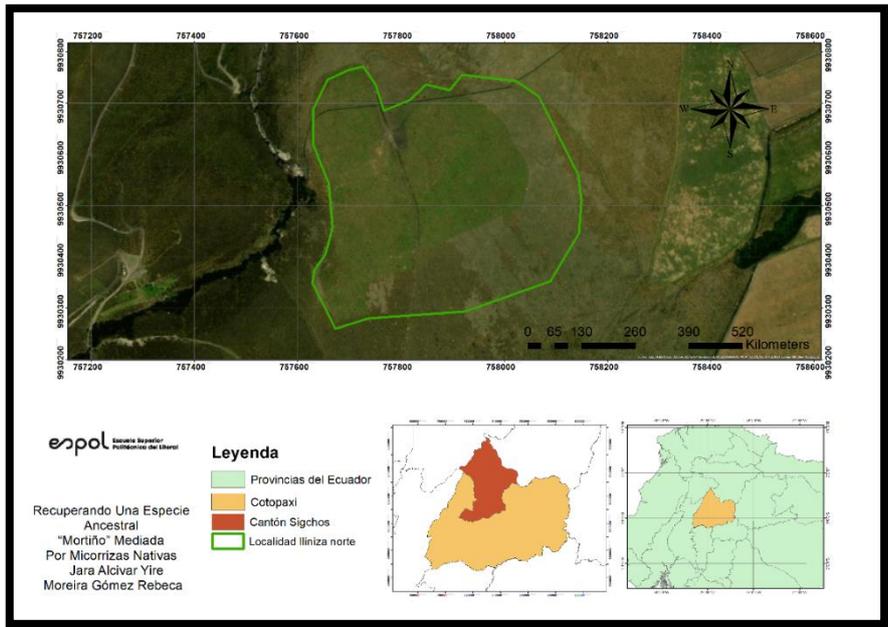


Ilustración 2.2. Mapa localidad Iliniza norte elaborado en el programa ArcMap

El tercer lugar de muestreo (Ver Ilustración 2.3) se ubicado en "Pedregal" en Machachi cantón Mejía provincia de Pichincha a 3 453 metros sobre el nivel del mar con coordenadas 0° 31' 32.2" S y 78° 28' 27.4" O.

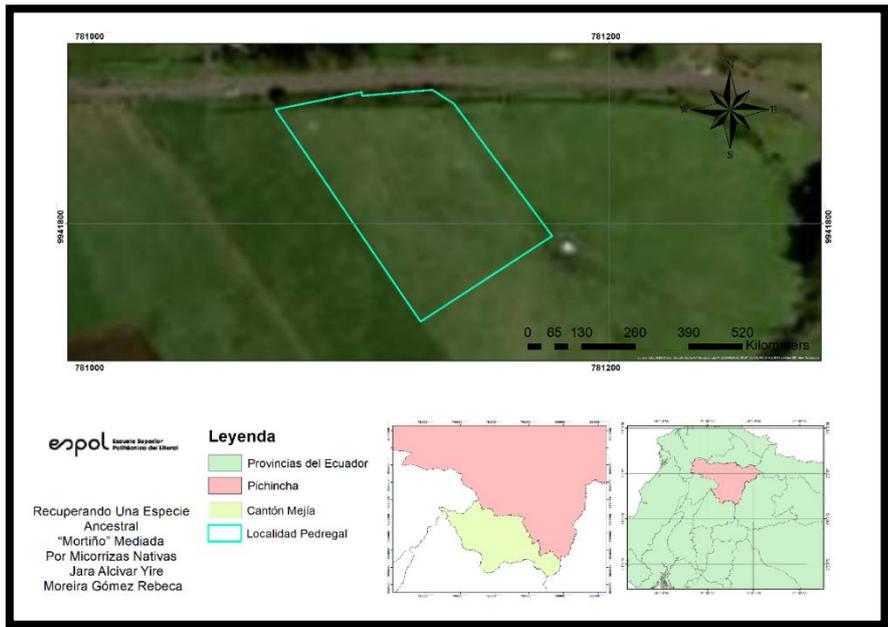


Ilustración 2.3. Mapa localidad Pedregal elaborado en el programa ArcMap

Por último, el cuarto lugar (*Ver Ilustración 2.4*) ubicado a 3 207 metros de altura en “Sigchos” cantón perteneciente a la provincia de Cotopaxi a coordenadas 0° 42’ 56.3” S y 78° 53’ 50.8” O.

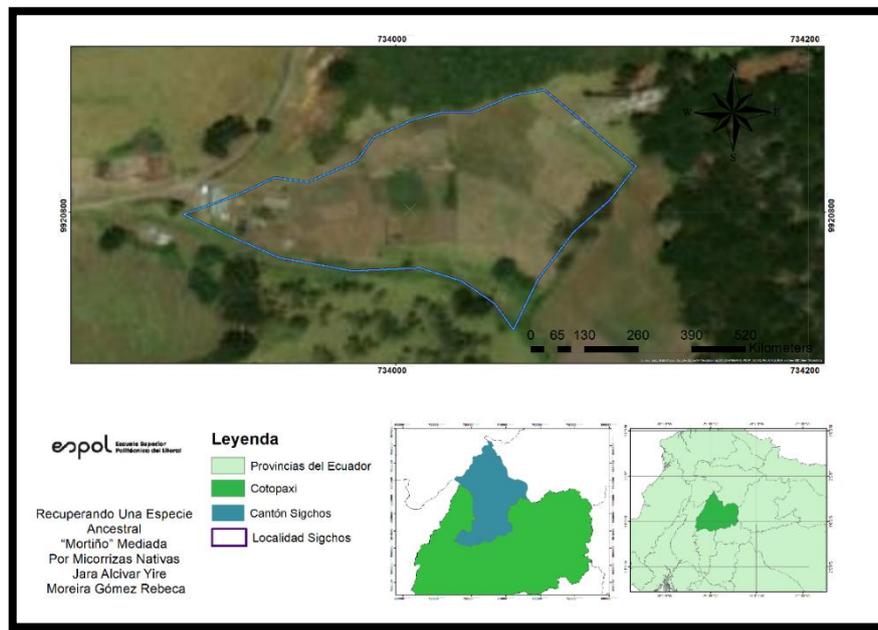


Ilustración 2.4. Mapa localidat Sigchos elaborado en el programa ArcMap

2.2 Colecta de muestras

Se recolectó muestras de suelo de 50 cm de profundidad aledaño a la planta de mortiño, evitando tomar suelo compartido con otras especies del alrededor. Mientras que se tomó muestras de raíces finas de la raíz principal del mortiño, en ciertos casos se tomó la especie total o parcialmente. Ambas tomas se reservaron en fundas ziploc rotuladas según el estudio a realizar.

2.3 Aislamiento y conteo de esporas

2.3.1 Materiales

- 4 vasos precipitados de 1000 ml.
- Varilla de vidrio
- Tamices de 710 μm , 250 μm , 106 μm , 45 μm y 40 μm de apertura
- Balanza analítica
- Tubos falcon de 50 ml

- Centrifuga
- Cajas Petri
- Estereoscopio
- Microscopio
- Solución de sacarosa al 72% y Tween 80

2.3.2 Procedimiento

El aislamiento y posterior conteo de esporas se realizó utilizando la técnica propuesta por Gerdemann & Nicolson en 1963 que consiste en un proceso de tamizaje para la obtención de partículas más pequeñas entre las que recogeremos las esporas. Se pesaron 100g de suelo de cada uno de los 4 lugares (El Ángel, Iliniza, Sigchos y Pedregal) (*Ver Ilustración 2.5, A*) colocándolos en bakerys, cada muestra se llenó de agua hasta completar 1 litro triturándola de forma mecánica con la espátula para disolver los agregados de suelo y conseguir una solución homogénea, posterior a esto se filtró usando los tamices apilados de apertura (710 μm , 250 μm , 106 μm , 45 μm y 40 μm) y se recogió en tubos falcon del sedimento que se obtuvo de los dos últimos tamices. Una vez precipitada la disolución se pesó y se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos, se descarta el agua sin retirar sedimento y se coloca una solución de sacarosa al 72% más Tween 80 hasta completar $\frac{1}{4}$ de los tubos.

Para el conteo de las esporas (*Ver Ilustración 2.5, B*), se vertió en 2 dosis el contenido de cada tubo falcon en cajas petri, con el fin de formar una película fina y mejorar la visualización. Debajo de la caja Petri se colocó un cuadrante circular dividido en 8 secciones y se contabilizaron las esporas presentes con la ayuda del microscopio estereoscopio y una iluminación (Aguilar-Ulloa et al., 2015).



Ilustración 2.5 A Determinación de los 100 g de suelo para los cuatro lugares muestreados. **B** Observación en el estereoscopio de las esporas obtenidas.

2.4 Evaluación de Colonización por Hongos Micorrízicos

2.4.1 Materiales

- Tubos de vidrio
- Autoclave
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Microscopio
- Solución de KOH
- Solución de peróxido de hidrogeno alcalino
- Solución de HCL al 1%
- Solución azul de tripano al 0.0005%
- Solución de lactoglicerol lactofenol

2.4.2 Procedimiento

De las muestras obtenidas en campo, se seleccionó las raíces que corresponda a la especie a estudiar, dado que muchas veces en campo es normal encontrar más especies cercanas a la estudiada. De estas se tomó las raíces más finas posibles debido a que aquí se hallan las estructuras definidas de los hongos. Posteriormente fue necesario clarificar las raíces con KOH al 10%, en donde se lavó, se colocó en tubos de vidros y agregó 20 ml de la solución ya dicha hasta cubrir las para luego situarlas en una autoclave

durante 15 a 20 minutos a 120°C a 15 libras de presión. Se retiró la solución de KOH, se lavó y se cubrió nuevamente las raíces, pero con peróxido de hidrogeno alcalino a temperatura ambiente hasta que aclarecieron (Bagyaraj et al., 2012).

El siguiente paso consistió en la tinción de dichas raíces, en donde se adicionó azul de tripano al 0.005%, para luego mandarlo nuevamente a la autoclave por 10 minutos. Una vez realiza la anterior acción se procedió a la realización de la evaluación micorrízica en donde se colocaron 10 trozos de raíces en un portaobjeto de forma paralela y dividido en dos grupos de 5 mediante el uso de dos cubreobjetos. Finalmente se presionaron las muestras con el fin de romper las paredes las raíces y que la observación de los hongos sea más detallada en el microscopio de esta manera se pudo determinar el porcentaje de colonización (Bagyaraj et al., 2012).

$$\% \text{ de micorrización} = \frac{\text{Número de campos observados} * 100}{\text{Total de campos}}$$

2.5 Ensayo de aclimatación

2.5.1 Materiales

- 4 vasos precipitados de 1000 ml.
- Varilla de vidrio
- Tamices de 710 µm, 250 µm, 106 µm, 45 µm y 40 µm de apertura
- Balanza analítica
- Tubos falcon de 50 ml
- Autoclave Systec V-150
- Suelo de Páramo
- Arena
- Turba
- Vasos térmicos de 180 ml
- Solución IBA al 0.5 mg/ml

2.5.2 Inóculo concentrado de esporas

Para la obtención de un concentrado, se realizó un tamizaje húmedo, el cual consistía en la toma de 100 g de suelo por cada una de las localidades. Posteriormente se agregó 1 litro de agua para la disolución del suelo, una vez disgregado, se dejó reposar durante media hora con el fin de que se asienten las partículas más grandes. Pasado el tiempo se tamizó hasta obtener sedimento de 40 y 45 µm, el cual se recolecto en tubos falcon en solución de 50 ml de agua. Por cada 100 g de suelo se obtuvo 100 ml de inóculo de esporas (Gerdemann & Nicolson, 1963).

2.5.3 Preparación del sustrato

Se recolectó 5 kg suelo del Páramo Andino (*Ver Ilustración 2.6*), el cual se esterilizó durante 2 horas por dos días mediante el uso de una autoclave Systec V-150 a 1 bar de presión y con un rango de temperatura de 70°C a 180°C. Para la preparación de la tierra madre, se mezcló arena, turba y páramo estéril en proporción 0.5:0.5:1.



Ilustración 2.6 Sustrato preparado a partir de arena, turba y suelo de páramo estéril.

2.5.4 Diseño experimental

Se realizó una mezcla con 500 g de tierra madre y 100 ml de solución de inóculo para cada uno de los lugares establecidos. Por lo cual se obtuvo cuatro tratamientos Pedregal, El Ángel, Sigchos e Iliniza con 6 réplicas respectivamente, así como uno tratamiento de control absoluto sin inóculo (control negativo) y otro control con hormona IBA (control positivo). Se tomaron esquejes de plantas de mortiño (*Ver Ilustración 2.7, A*) de aproximadamente 10 cm de largo y mediante técnica de inmersión, se lo sumergió en una solución 2 ml IBA (ácido indol butírico) en 1 litro de agua destilada a una concentración de 0.5 mg/ml por dos horas, antes del establecimiento en tierra (Castrillón et al., 2008).

Se rotuló y estableció 36 envases estériles para los tratamientos y controles (*Ver Ilustración 2.7, B*), con 80 g de sustrato, en el cual se colocó los esquejes, posterior a la inmersión en IBA realizado mediante el uso de bloques al azar para reducir el error experimental. Se mantiene un ambiente de humedad relativa en una cámara sellada y con la continua dispersión de agua y a baja temperatura.



Ilustración 2.9 Puesta del diseño experimental: A Esquejes sumergido en 1 litro de solución de agua concentrada con IBA a 0.5 mg/ml, B diseño establecido en una cámara cerrada.

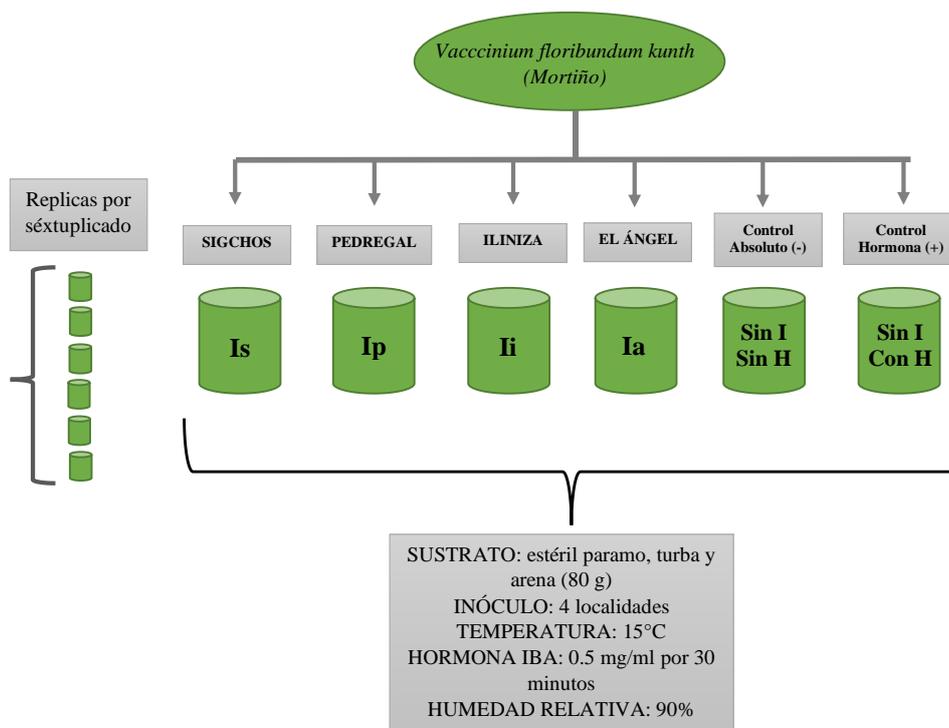


Ilustración 2.12 Diagrama del Diseño Experimental empleado en este trabajo.

CAPITULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Densidad de esporas

Una vez realizado el aislamiento y el conteo (*Ver Ilustración 2.9*) se presentan en los cuadros las esporas totales encontradas en 100 g de muestra de tierra de las diferentes localidades. Se realizaron 2 conteos por cada sitio. El total de esporas corresponde las dos fracciones donde se encontró un total de 1733 esporas en la localidad del El Ángel, 1056 en Pedregal, 1672 en Iliniza y 1437 en Sigchos. Resultados que se encuentran por encima de los obtenidos por Cardona y colaboradores en el 2005 quienes analizaron actinomicetos y HMA en diferentes ecosistemas fragmentados de Colombia, obtuvieron promedios de 1509 esporas en 100g de sustrato. Sin embargo, los resultados en este proyecto fueron menores a los reportados por León Velandia (2006) quien obtuvo una densidad de 8710 esporas en 100 g. Esto podría indicar que los factores bióticos y abióticos están correlacionados con el número de esporas de este género de hongo.



Ilustración 2.9. Visualización de las esporas de hongos formadores de micorrizas observadas en un estereoscopio.

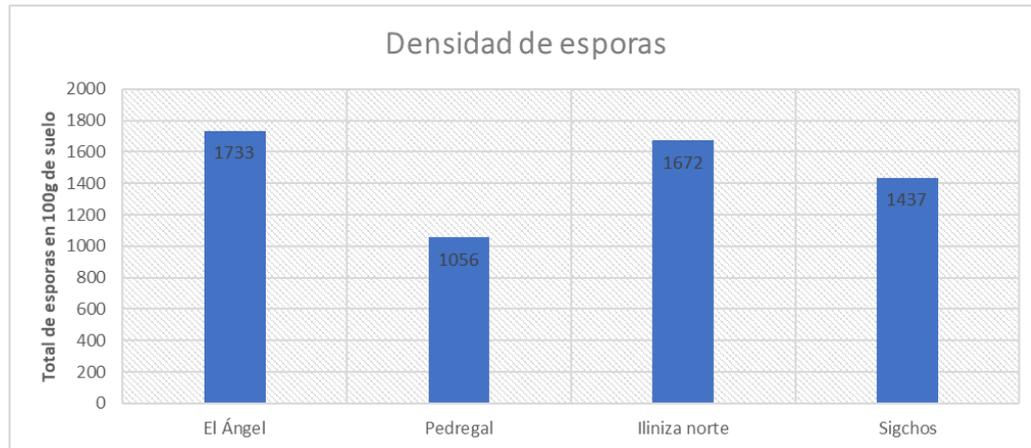


Ilustración 3. Totalidad de esporas de hongos formadores de micorrizas.

La abundancia de esporas (*Ver Ilustración 3*) responde a múltiples factores bióticos y abióticos que condicionan la reproducción de estos hongos, por ejemplo, Ramírez y colaboradores en 1997, sumado a Violi y colaboradores en el 2008 han documentado que la mayor producción se da en los periodos estacionales secos, ya que esto genera un estrés hídrico en la planta y por consiguiente al hongo, que responde aumentando producción de esporas.

Se visualizó una gran diversidad de esporas en torno a la rizosfera del mortiño, incluidas esporas de hongos micorrízicos arbusculares, esto podría deberse a que posiblemente alrededor del mortiño se encuentren otras plantas que estén siendo colonizadas por estos hongos, ya que se ha informado que la presencia de leguminosas usadas como cubierta vegetal, acrecienta la población originaria de hongos micorrízicos hasta 3 veces (Deguchi et al., 2007), afectando así de manera positiva a la riqueza y diversidad de especies. Otra posible razón sería que los HMA también podrían estar colonizando a estas plantas de la familia Ericaceae, sin embargo, esto no se ha corroborado de manera oficial hasta ahora. Se muestra a continuación la variedad de esporas encontradas en cada sitio de estudio.

3.1.1 Sigchos

Este sitio (*Ver Ilustración 3.1*) ocupó el tercer lugar de abundancia de esporas de los 4 lugares (*Ver Ilustración 3*) sin embargo, la abundancia no está relacionada con la diversidad, ya que existen especies que bajo cierta presión ambiental pueden esporular de manera abundante. Es decir, que una sola especie es capaz de aumentar la abundancia en el sustrato.

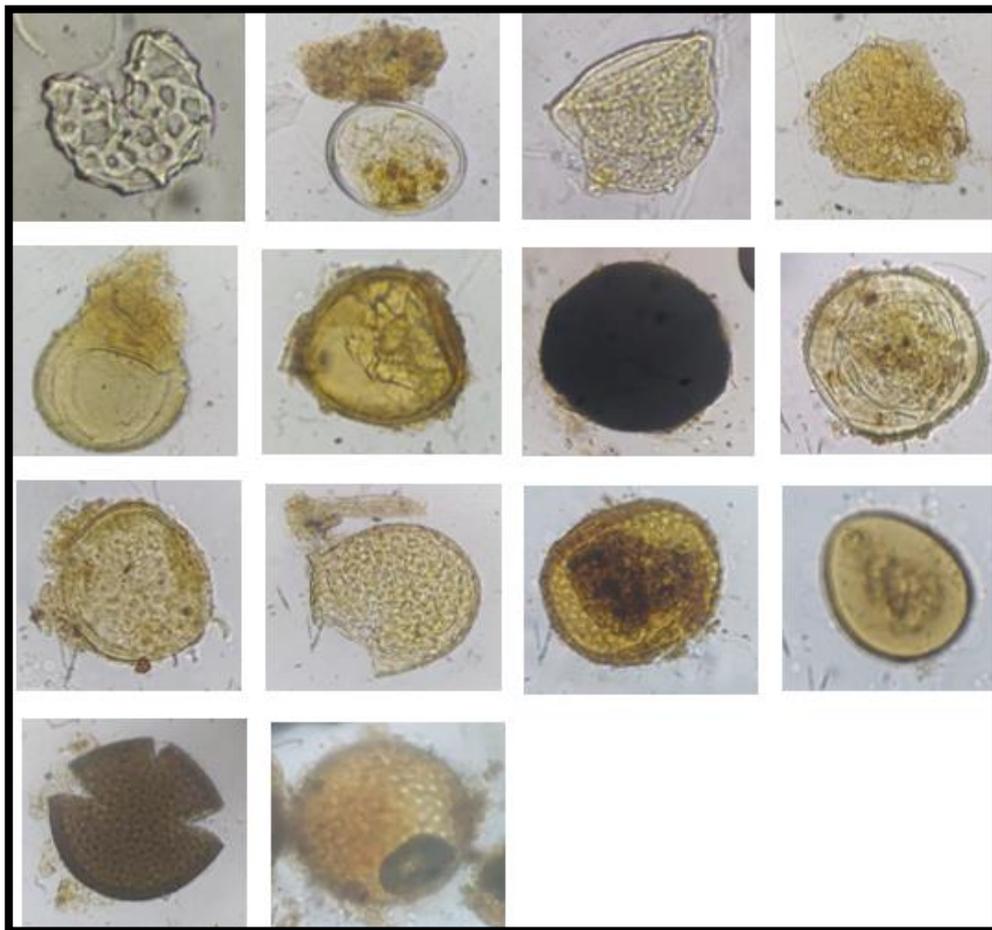


Ilustración 3.1. Morfología de las esporas encontradas en Sigchos visualizadas con microscopía óptica a 100x.

3.1.2 Pedregal

Este sitio (*Ver Ilustración 3.2*) ocupó el lugar más bajo en cuanto a abundancia con respecto a los demás sitios (*Ver Ilustración 3*). Sin embargo, se muestra una diversidad similar a los demás sitios y una predominancia de esporas pertenecientes al Género *Glomus* (O).

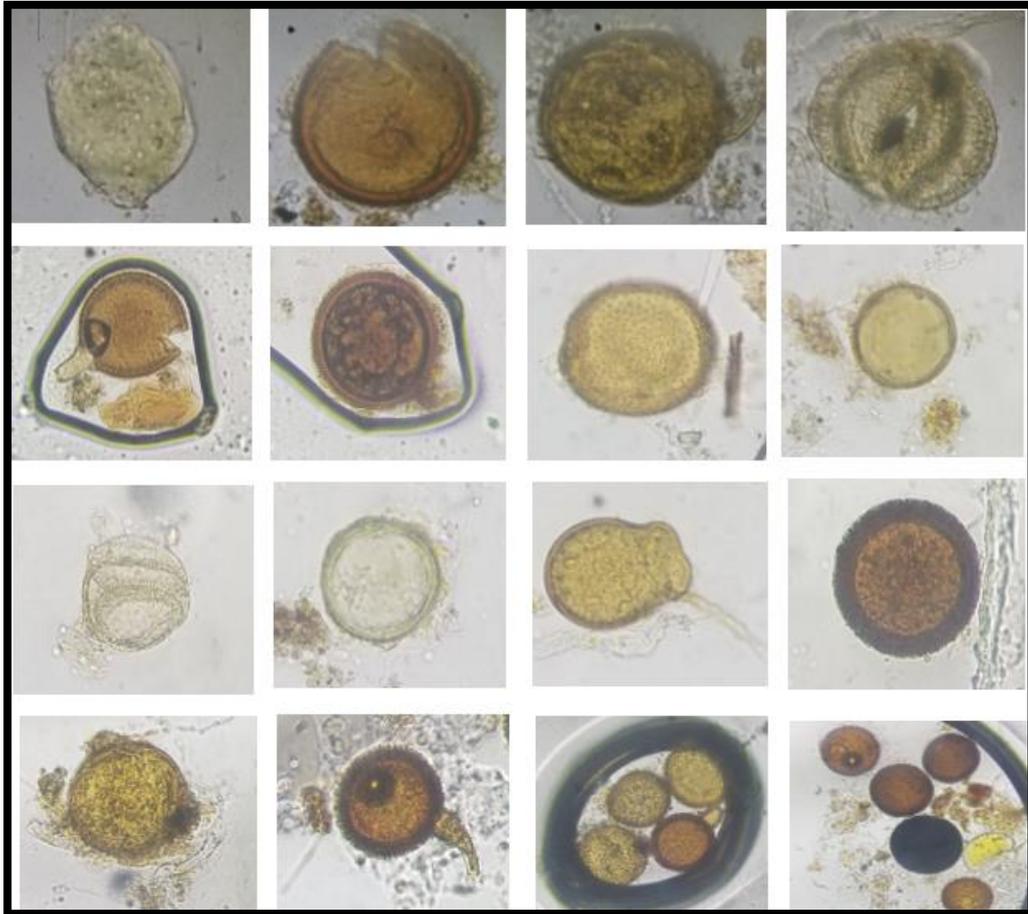


Ilustración 3.2. Morfología de las esporas encontradas en Pedregal visualizadas con microscopía óptica a 100x (A, B, C, D) Y A 40X (E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, Ñ, O)

3.1.3 Iliniza norte

Esta localidad (*Ver Ilustración 3.3*) ocupó el segundo lugar en abundancia con respecto a los demás sitios (*Ver Ilustración 3*). Presentó morfotipos con conexiones hifales más robustas, a diferencia de las encontradas en los demás sitios que poseían superficies más lisas.

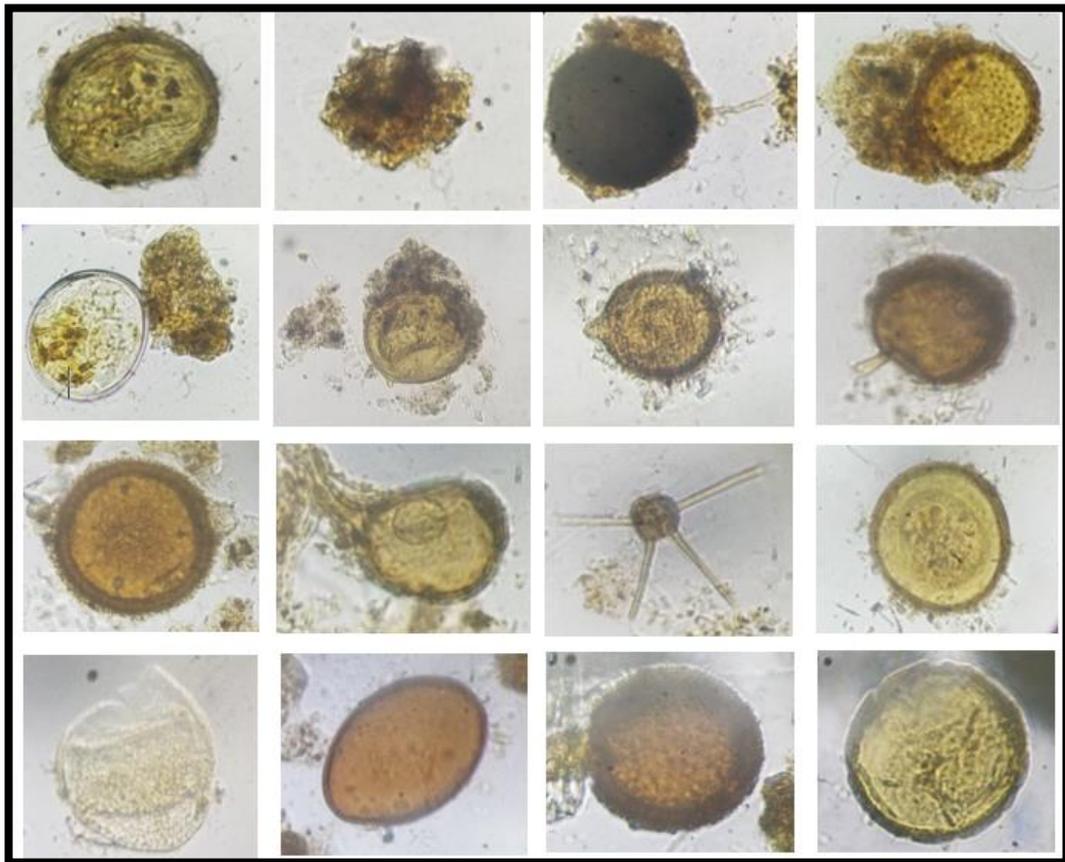


Ilustración 3.3. Morfología de las esporas encontradas en Iliniza norte visualizadas con microscopía óptica a 100x (A, B, C, D, E, M, N, Ñ, O) y a 40x (F, G, H, I, J, K, L)

3.1.4 El Ángel

Esta localidad (*Ver Ilustración 3.4*) ocupó el primer lugar en abundancia con respecto a los demás sitios (*Ver Ilustración 3*). Esto respalda la idea de que una mayor abundancia de esporas no implica necesariamente una mayor diversidad.

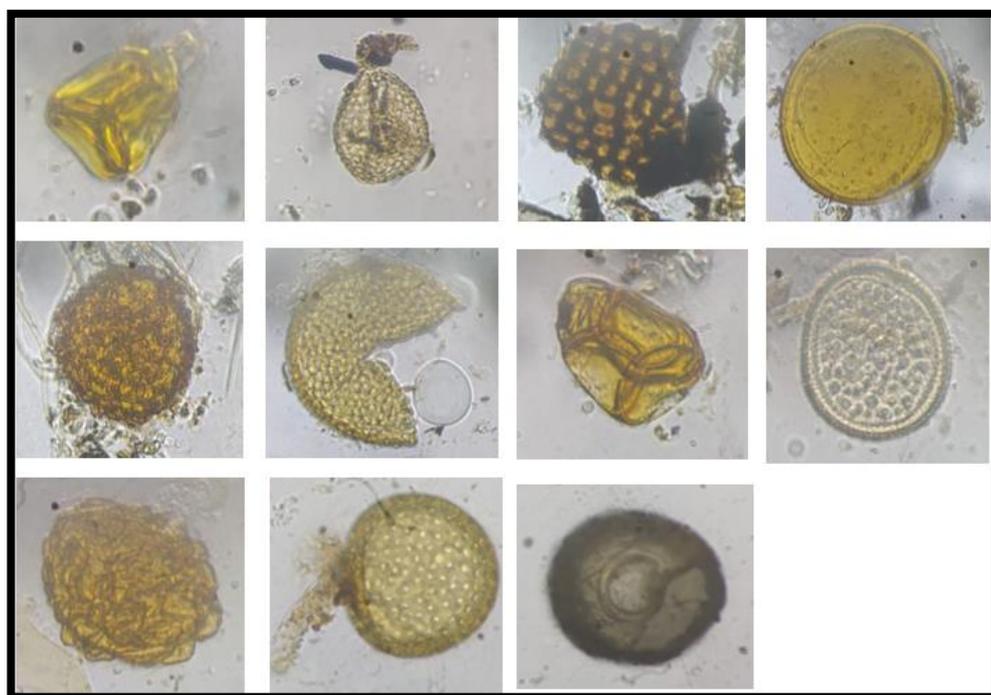


Ilustración 3.4. Morfología de las esporas encontradas en El Ángel visualizadas con microscopía óptica a 100x

La diversidad de hongos presentes en el sustrato representa un aspecto positivo, debido a que optimizan la actividad biológica del suelo, que además de protegerlo aportan al desarrollo de las plantas, aumentando así mismo el número de esporas adaptadas a diferentes condiciones edafoclimáticas. Por otro lado, esta riqueza puede verse afectada por prácticas agrícolas, tales como el establecimiento de monocultivos, la baja diversidad taxonómica y la siembra de variedades no mico-tróficas (Sasvári et al., 2011).

3.2 Porcentaje de micorrización

El porcentaje de micorrización (Ver tabla 3.1) presenta el valor de cada lugar encontrándose una diferencia significativa entre los lugares Sigchos y el Pedregal e incluso entre muestras.

Tabla 3.1 Infección micorrízica y porcentaje de micorrización de promedios y total de los lugares muestreados Sigchos, Pedregal, Iliniza Norte y El Ángel.

Lugar	Muestras	Promedio porcentual por tres replicas	Porcentaje de micorrización por lugar
Sigchos	1	59	61
	2	62	
Pedregal	1	13	22
	2	30	
Iliniza Norte	1	14	29
	2	43	
El Ángel	1	39	47
	2	56	

Posteriormente se ejemplifica un gráfico en donde se enseña una tendencia de micorrización por muestra 1 y 2 de los lugares estudiados en donde exhibe un aumento del 50% en la colonización de micorrizas entre muestras de un mismo lugar, siendo el caso más notable el de Pedregal e Iliniza Norte. En el caso de El Ángel manifiesta una misma tendencia, pero con un menor porcentaje de cambio y siendo Sigchos la única constante.

Es probable que entre lugares las condiciones tanto altitudinales como el ambiente en general haya afectado la colonización de dichas micorrizas y considerando que cerca de los lugares muestreados como en el caso de Iliniza y Pedregal ocurriera un incendio previamente a la toma de muestras. Según Bautista y colaboradores en el 2017 especularon que los factores ambientales, la composición o el uso del sustrato alteran la tasa de colonización y no solo se debe a la manifestación de las micorrizas adecuadas,

esto incluso explicaría la diferencia entre muestras si se considera las amplias distancias tomadas entre cada una.

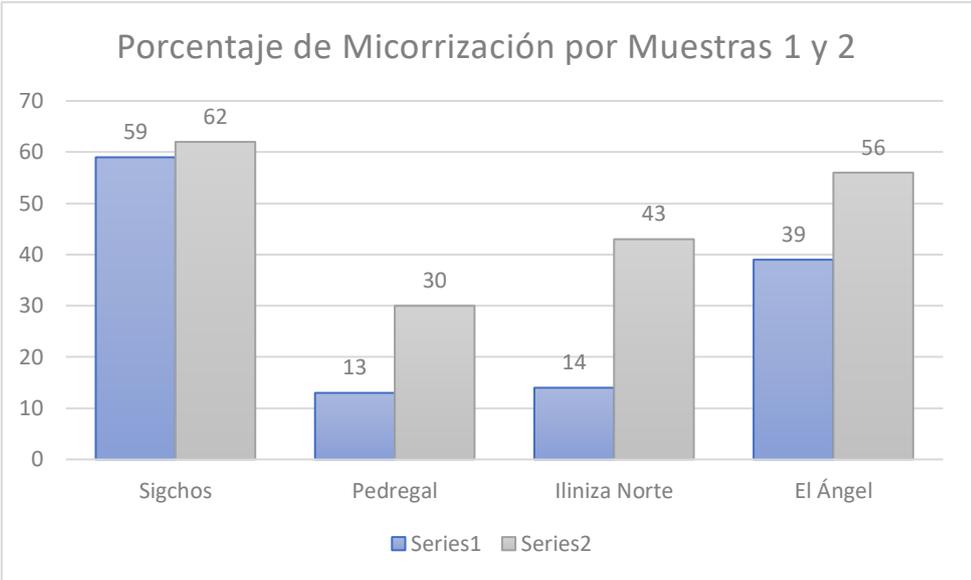


Ilustración 3.5 Promedio porcentual de micorrización por muestras 1 y 2 de los lugares Sigchos, Pedregal, Iliniza Norte y El Ángel.

Por otro lado, se presenta el porcentaje total de micorrización (*Ver Ilustración 3.5*) observándose que la localidad de Sigchos posee el valor más alto de micorrización con 61%, seguido de El Ángel con 47%, por otra parte, se evidencia una diferencia notable entre Iliniza Norte y Pedregal con 29% y 22% respectivamente.

Dos de los valores presentados se encuentra por debajo de un porcentaje establecido como óptimo (*Ver Ilustración 3.6*), Noboa y colaboradores en el 2018 reportaron promedios de micorrización del 60% a 90% mientras que Bautista y colaboradores en el 2017 presentaron valores del 40% encontrándose en este estudio porcentajes similares a los reportados por los investigadores.

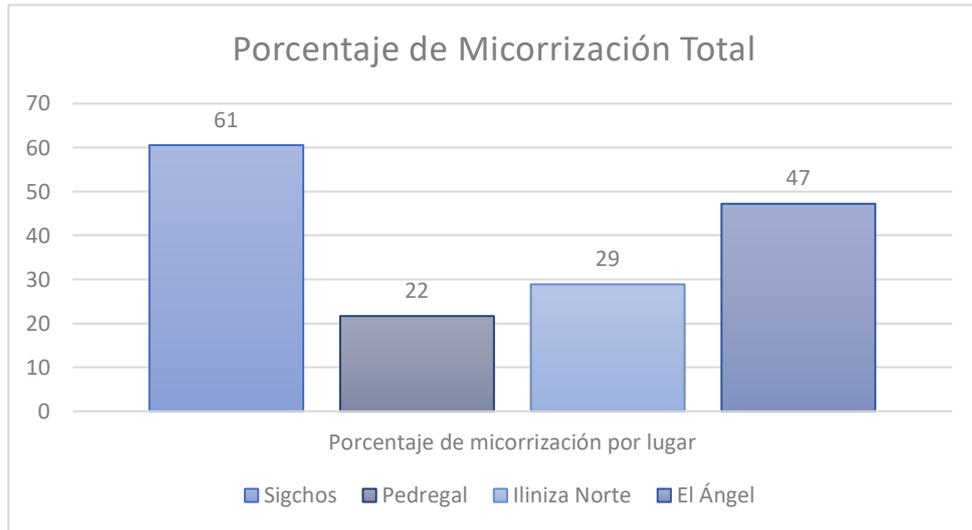


Ilustración 3.6 Micorrización total en porcentaje de los lugares muestreados Sigchos, Pedregal, Iliniza Norte, El Ángel.

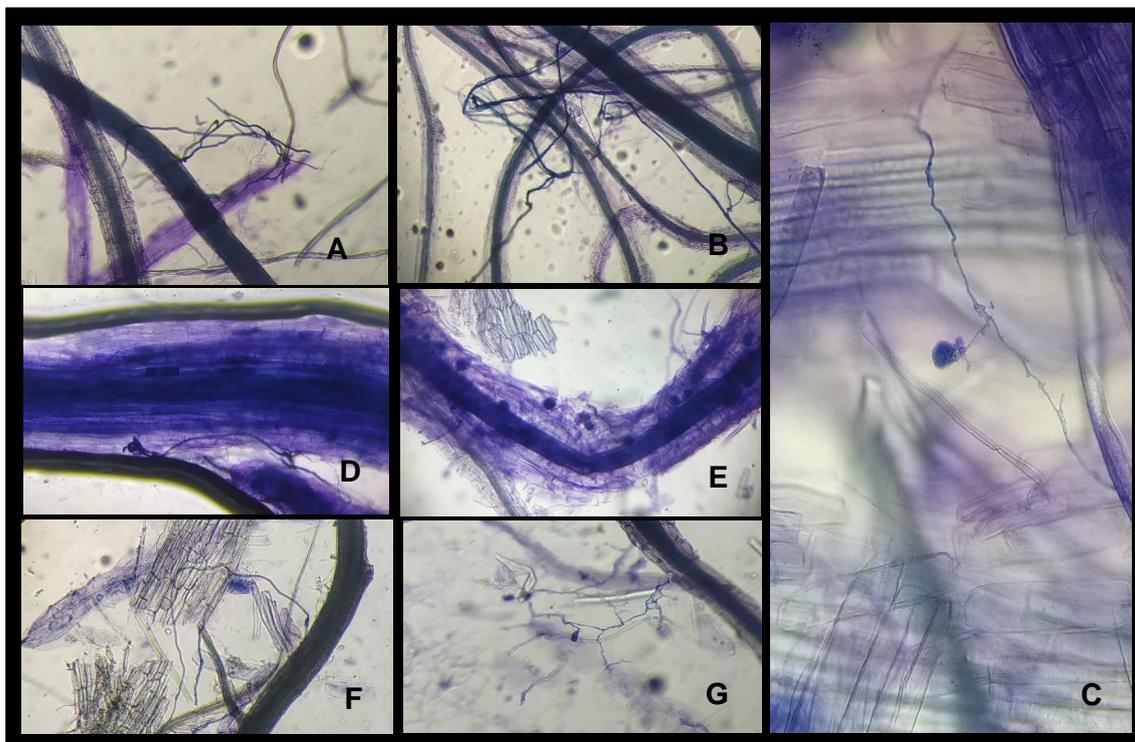


Ilustración 3.7 Estructuras infectivas micorrícicas ericales: A, B hifas visibles en lente de 40x; C hifas y estructura en espiral semejante a un ovillo observado en lente 100x; D, F, G hifas y estructuras espirales observados en lente de 40x.

Lo que caracteriza a una micorriza ericoide es su morfología simple dado que presentan finas espirales conformadas por sus hifas que se encuentra intracelularmente y de forma compacta en las células rizodérmicas (Vohník, 2020).

Se presenta una estructura espiral en forma de ovillo visiblemente debido a la destrucción de la raíz que la contenía. Mientras que las otras exhiben las hifas ectodérmicas alrededor de diferentes raíces (*Ver Ilustración 3.7*).

3.3 Resultado del ensayo

Debido a las características del experimento, los resultados se recolecto bajo una variable que se definió como marcaje, en el cual se estableció un criterio cualitativo si la planta se encontraba viva o muerta. Por lo que de esta manera se implantó el porcentaje de prendimiento con el fin de determinar el efecto de los tratamientos en los esquejes de mortiño (*Ver Ilustración 3.8*).



Ilustración 3.8. Marcaje que representa si la planta se encuentra viva o muerta. Determinado según el estado seco de la hoja y el desprendimiento de esta.

Los resultados se recolectaron a las 3 semanas de establecido el ensayo en condiciones controladas. Se comparan tratamientos de inóculos por cada localidad y controles respectivos. El tratamiento con la localidad Sigchos y el control hormona presentaron la mayor tasa de supervivencia con 4 y 3 esquejes de mortiño vivos respectivamente (Ver *Ilustración 3.9*)



Ilustración 3.9. Visualización de la tasa de supervivencia de los esquejes sometidos a tratamiento.

El porcentaje de prendimiento (*Ver Ilustración 3.10*) muestra que la localidad de Sigchos posee el 67% de prendimiento, seguido del control hormona con un 50%. Bautista y colaboradores en el 2017 obtuvieron una respuesta positiva en plantas *cv Biloxi* con inoculado esporas de *Gaultheria sp.*, mientras que Wei y colaboradores en el 2020 mencionan que *Oidiodendron maius* una cepa de micorriza promovió la formación de raíces en esquejes, deduciendo en este estudio la influencia significativa de las esporas formadoras de hongos micorrízicos.

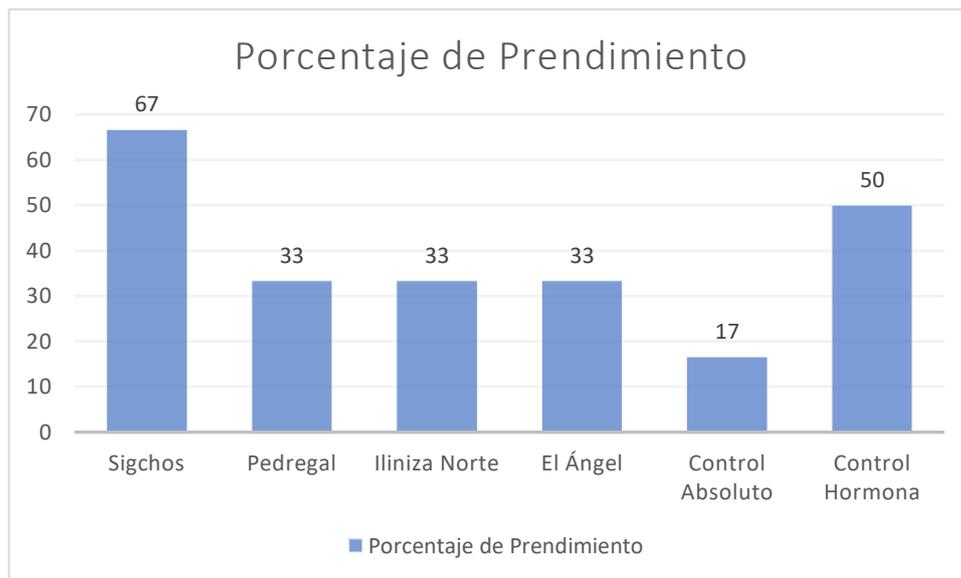


Ilustración 3.10. Porcentaje de prendimiento de los esquejes de mortiño con esporas de las diferentes localidades.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se evidenció la existencia de hongos micorrízicos en las raíces de mortiño de cuatro lugares diferentes de la sierra ecuatoriana, Sigchos, El Ángel, Pedregal e Iliniza Norte, en donde se determinó tanto su densidad de esporas, porcentaje de micorrización y estructura morfológica. Lo que llevó al hecho de que Sigchos es el que presenta mayor colonización a diferencia del resto de lugares muy probablemente se deba a las condiciones fisicoquímicas del suelo, componentes biológicos y factores ambientales diferentes entre los demás.
- El uso de un inóculo a base de esporas de micorrizas ericoides podría ser un importante recurso para la aclimatación del mortiño en vivero, por lo tanto, la estandarización de un protocolo de propagación resulta indispensable. Para este trabajo dicho diseño conllevó al 67% de prendimiento de esquejes de mortiño de la localidad Sigchos.

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda aumentar el número de replicas para disminuir el error porcentual de los esquejes.
- Se recomienda determinar adecuadamente la acción que ejerce la IBA sobre los esquejes de mortiño.
- Se recomienda determinar los factores diferenciales de los lugares que provocaron la disminución de colonización de las micorrizas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Ulloa, W., Arce-Acuña, P., Galiano-Murillo, F., & Torres-Cruz, T. J. (2015). Spore isolation and evaluation of inoculation methods in the production of mycorrhizae in trap crops.
- Alarcón-Barrera, K. S., Armijos-Montesinos, D. S., García-Tenesaca, M., Iturralde, G., Jaramilo-Vivanco, T., Granda-Albuja, M. G., Giampieri, F., & Alvarez-Suarez, J. M. (2018). Wild Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth) and Andean blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth) from the Highlands of Ecuador: Nutritional composition and protective effect on human dermal fibroblasts against cytotoxic oxidative damage. *Journal of Berry Research*, 8(3), 223–236. <https://doi.org/10.3233/JBR-180316>
- Baeza-Guzmán, Y., Medel-Ortiz, R., & Garibay-Orijel, R. (2017). Morphologic and genetic characterization of the ectomycorrhizal fungi associated to *Pinus hartwegii* forests from Cofre de Perote National Park, Veracruz. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.01.027>
- Bagchi, D., Roy, S., Patel, V., He, G., Khanna, S., Ojha, N., Phillips, C., Ghosh, S., Bagchi, M., & Sen, C. K. (2006). Safety and whole-body antioxidant potential of a novel anthocyanin-rich formulation of edible berries.
- Bagyaraj, D. J., Thilagar, G., Chauhan, H., & Ravi, J. E. (2012). Plant Growth Response of French Bean to Arbuscular Mycorrhizal Fungi Antimicrobial Activity View Project Plant Growth Response of French Bean to Arbuscular Mycorrhizal Fungi. In *J. Soil Biol. Ecol* (Vol. 32, Issue 2). <https://www.researchgate.net/publication/275824326>
- Barea, J. (2003). Las micorrizas arbusculares componente clave en la productividad y estabilidad de agroecosistemas. . . Departamento de Microbiología Del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental Del Zaidín, 50.
- Bautista, J. M., Posadas, L., Urbina, J., Larsen, J., & Segura, S. (2017). Colonization by mycorrhizae in the production of cranberry seedlings in nursery (*Vaccinium* spp.) cv Biloxi. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, 8(3), 695–703.
- Camargo-Ricalde, S., Montaña, N. M., de La Rosa-Mera, C. J., Adriana, S., & Arias, M. (2012). MICORRIZAS: UNA GRAN UNIÓN DEBAJO DEL SUELO. *Revista Digital Universitaria* 13, 1–19.

- Cardona, G. I., Arcos, A. L., & Murcia, U. G. (2005). Abundancia de actinomicetes y micorrizas arbusculares en paisajes fragmentados de la Amazonia colombiana. *Agronomía colombiana*, 23(2), 317–326.
- Carrillo, R., Godoy, R., & Peredo, H. (1992). Simbiosis micorrícica en comunidades boscosas del Valle Central en el sur de Chile. In *BOSQUE* (Vol. 13, Issue 2).
- Castrillón, J. C., Carvajal, E., Ligarreto, G., & Magnitskiy, S. (2008). El efecto de auxinas sobre el enraizamiento de las estacas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) en diferentes sustratos. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 16–22.
- Chambers, S. M., Liu, G., & Cairney, J. W. (2000). Its rDNA sequence comparison of ericoid mycorrhizal endophytes from *Woolisia pungens*. *Mycological Research*, 104(2), 168–174.
- Coba Santamaría, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M. F., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). LA GRANJA. *Revista de Ciencias de la Vida*. 16(2), 5–13. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476047400002>
- Cobo, M. M., Gutiérrez, B., & de Lourdes Torres, M. (2018). Regeneration of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) plants through axillary bud culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 54(1), 112–116. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9884-3>
- Cobo, M. M., Gutiérrez, B., Torres, A. F., & Torres, M. de L. (2016). Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Biochemical Systematics and Ecology*, 64, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.11.008>
- Comandini, O., Rinaldi, A., & Kuyper, T. (2012). *Mycorrhiza: occurrence in natural and restored environments* (M. Pagano, Ed.). Nova Science Publishers Hauppauge. https://www.researchgate.net/publication/52009591_Measuring_and_estimating_ectomycorrhizal_fungal_diversity_A_continuous_challenge#fullTextFileContent
- Corredor, G. (2003). Micorrizas arbusculares: Aplicación para el manejo sostenible de los agroecosistemas. *Programa Nacional De Recursos Biofísicos, Corpoica*, 12–17.

DEGUCHI, S., SHIMAZAKI, S., UOZUMI, S., TAWARAYA, K., KAWAMOTO, H., & TANAKA, O. (2007). White clover living mulch increases the yield of silage corn via arbuscular mycorrhizal fungus colonization. *Plant and Soil*, 291(1), 219–229.

Dong, B.-C., Alpert, P., & Yu, F.-H. (2019). Transgenerational effects of herbivory and soil nutrients transmitted via vegetative reproduction in the clonal plant *Alternanthera philoxeroides*. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*.

Espeland, E., & Emam, T. M. (2011). The value of structuring rarity: the seven types and links to reproductive ecology. *Biodiversity and Conservation*, 20(5), 963–985.

Freire, F. A. (2004). *Botánica sistemática ecuatoriana*. Missouri Botanical Garden, 209.

Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963a). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2), 235–244. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)

Gómez Pinilla, F. (2008). *Nature Reviews | Neuroscience*. www.nature.com/reviews/neuro

Hambleton, S., Egger, K. N., & Currah, R. S. (1998). Mycological Society of America The Genus *Oidiodendron*: Species Delimitation and Phylogenetic Relationships Based on Nuclear Ribosomal DNA Analysis. In *Source: Mycologia* (Vol. 90, Issue 5).

Harley, J. L. (1968). *Mycorrhiza*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781483227443500122?via%3Dihub>

Havill, D. C., Lee, J. A., & Stewart, G. R. (1974). NITRATE UTILIZATION BY SPECIES FROM ACIDIC AND CALCAREOUS SOILS. In *New Phytol* (Vol. 73).

Jorgensen, P. M. C., R. Ulloa, V., & Madsen, J. E. (1995). Biodiversity and Conservation of Neotropical Montane Forest. *The New York Botanical Garden* (S. P. Churchill, Ed.).

Khanizadeh, S., Hamel, C., Kianmehr, H., Buszard, D., & Smith, D. L. (1995). Effect of three vesicular-arbuscular mycorrhizae species and phosphorus on reproductive and vegetative growth of three strawberry cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 18(6), 1073–1079. <https://doi.org/10.1080/01904169509364963>

Koron, D., & Gogala, N. (2000). El uso de hongos micorrízicos en el cultivo de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. *Acta Hort*, 525, 101–106.

León Velandia, D. (2006). EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICORRIZAS ARBUSCULARES ASOCIADAS A YUCA (*Manihot esculenta* sp) EN DOS REGIONES DE LA AMAZONÍA COLOMBIANA.

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8323/tesis296.pdf?sequence=1>

Liu, G., Chambers, S. M., & Cairney, J. W. G. (1998). Molecular diversity of ericoid mycorrhizal endophytes isolated from *Woollsia pungens*. In *New Phytol* (Vol. 140).

Luteyn, J. L. (2002). Diversity, Adaptation, and Endemism in Neotropieal Ericaceae: Biogeographical Patterns in the Vaccinieae. In *The Botanical Review* (Vol. 68, Issue 1). [https://doi.org/10.1663/0006-8101\(2002\)068\[0055:daaein\]2.0.co](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2002)068[0055:daaein]2.0.co)

Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., Mattila, P. H., González-Paramás, A. M., & Törrönen, R. (2004). Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4477–4486. <https://doi.org/10.1021/jf049595y>

Magnitskiy, S., Ligarreto, G., & Lancheros, H. O. (2011). Rooting of two types of cuttings of fruit crops *Vaccinium floribundum* Kunth and *Disterigma alaternoides* (Kunth) Niedenzu (Ericaceae). In *Agronomía Colombiana* (Vol. 29, Issue 2).

Meléndez-Jácome, M. R., Flor-Romero, L. E., Sandoval-Pacheco, M. E., Vasquez-Castillo, W. A., & Racines-Oliva, M. A. (2021). *Vaccinium* spp.: Karyotypic and phylogenetic characteristics, nutritional composition, edaphoclimatic conditions, biotic factors and beneficial microorganisms in the rhizosphere. In *Scientia Agropecuaria* (Vol. 12, Issue 1, pp. 109–120). Universidad Nacional de Trujillo. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.013>

Mi, J. C., Howard, L. R., Prior, R. L., & Clark, J. R. (2005). Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(13), 2149–2158. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2209>

Molina, M., Mahecha, L., & Medina, M. (2005). Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18, 162–175.

- Neto, C. C. (2007). Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. In *Molecular Nutrition and Food Research* (Vol. 51, Issue 6, pp. 652–664). <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600279>
- Noboa, I. C., Moran, J. N., & Barcos-Arias, M. (2018). Presence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in representative species of the tropical dry forest of the Ecuadorian coast. *Revista Bionatura*, 3(1), 524–526. <https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.01.7>
- Perotto, S., Actis-perino, E., & Perugini Bonfante, J. P. (1996). Molecular diversity of fungi from ericoid mycorrhizal roots. In *Molecular Ecology* (Vol. 5).
- Racines Oliva, M. A., Hidalgo Verdezoto, M. R., & Vasquez Castillo, W. A. (2016). Oil palm View project Traceability of Methodology for moisture determination View project. *Agronomía Colombiana*, 34(1), S51–S53. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58296>
- Ramírez, M., J., Álvarez-Sánchez, P. G., & Sánchez-Gallen, I. (1997). Estudio de hongos micorrizógenos arbusculares bajo árboles remanentes en un pastizal tropical. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, 61, 15–20.
- Read, D. J. (1996). The Structure and Function of the Ericoid Mycorrhizal Root. In *Annals of Botany Company* (Vol. 77).
- Rimando, A. M., Kalt, W., Magee, J. B., Dewey, J., & Ballington, J. R. (2004). Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4713–4719. <https://doi.org/10.1021/jf040095e>
- Roveda, G., Cabra, L., Ramirez, M., & Peñaranda, A. (2007). Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la aclimatación y endurecimiento de microplántulas de mora (*Rubus glaucus*). *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8, 28–36.
- Sasvári, Z., Hornok, L., & Posta, K. (2011). The community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of maize grown in a 50-year monoculture. *Biology and Fertility of Soils*, 47, 167–176.
- Scagel, C. (2005). Inoculación con micorrizas ericoides. los hongos alteran el uso de fertilizantes de los cultivares de arándanos de arbusto alto. *Hort Science*, 40, 786–794.

Shukitt-Hale, B., Lau, F. C., & Josep, J. A. (2008). Berry fruit supplementation and the aging brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 636–641. <https://doi.org/10.1021/jf072505f>

Smith, S. E., & Read, D. J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. (Segunda).

Starrett, M. (2003). Initial shoot growth and development of micropropagated blueberry plants following inoculation with and ericoid mycorrhizal isolate. *Acta Horti*, 626, 191–197.

Stewart, G. R., Pate, J. S., & Unkovich, M. (1993.). Characteristics of inorganic nitrogen assimilation of plants in fire-prone Mediterranean-type vegetation (Vol. 993).

Vázquez, M. B., Amodeo, M. R., & Bianchinotti, M. v. (2016). Estimación de la biomasa fúngica en un suelo del sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina) con una tinción directa con blanco de calcoflúor. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(3), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.006>

Vega-Polo, P., Cobo, M. M., Argudo, A., Gutierrez, B., Rowntree, J., & de Lourdes Torres, M. (2020). Characterizing the genetic diversity of the Andean blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.) across the Ecuadorian Highlands. *PLoS ONE*, 15(12 December). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243420>

Violi, H. A., Barrientos-Priego A. F., Wright, S. G., Escamilla-Prado, E., Morton, J. B., Menge, J. A., & Lovatt, C. J. (2008). Disturbance changes arbuscular mycorrhizal fungal phenology and soil glomalin concentrations but not fungal spore composition in montane rainforest in Veracruz and Chiapas, Mexico. *Forest Ecology and Management*, 254, 276–290.

Vizueté, K. S., Kumar, B., Vaca, A. v., Debut, A., & Cumbal, L. (2016). Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) berry assisted green synthesis and photocatalytic performance of Silver–Graphene nanocomposite. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 329, 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.06.030>

Vohník, M. (2020). Ericoid mycorrhizal symbiosis: theoretical background and methods for its comprehensive investigation. In *Mycorrhiza* (Vol. 30, Issue 6, pp. 671–695). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00989-1>

Wei, X., Chen, J., Zhang, C., Liu, H., Zheng, X., & Mu, J. (2020). Ericoid mycorrhizal fungus enhances microcutting rooting of *Rhododendron fortunei* and subsequent growth. *Horticulture Research*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00361-6>

Yang, H., Zhao, X., Li, L., & Zhang, J. (2020). Detecting the colonization of ericoid mycorrhizal fungi in *Vaccinium uliginosum* using in situ polymerase chain reaction and green fluorescent protein. *Plant Methods*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00645-x>

Yang, Xueqing, Blagodatsky, Sergey, Lippe, Melvin, Liu, Feng, Hammond, J., Xu, Jianchu, Cadisch, Georg. (2016). Land-use change impact on time-averaged carbon balances: Rubber expansion and reforestation in a biosphere reserve, South-West China. *Forest Ecology and Management*, 372. Pages 149-163. ISSN 0378-1127, <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.04.009>.