



ACTIVO FIJO 148526

Evaluación de la presencia de Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) en finca del trópico húmedo, Pallatanga – Ecuador.

EMY ANDREA MOINA QUIMI

FACULTAD CIENCIAS DE LA VIDA
ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales
Centro de Información Bibliotecaria

No. DE INVENTARIO: D-76552
VALOR: 4,00
CLASIFICACIÓN: 632.4/MOT
FECHA DE INGRESO: 31/10/2017
PROCEDENCIA:
S... CIADO POR:

D-76552

Evaluación de la presencia de Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) en finca del trópico húmedo, Pallatanga – Ecuador.

Emy Andrea Moína Quimí ^a & Milton Senen Barcos Arias^{ab}

^a Facultad de Ciencias de la Vida, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Km. 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador
emoína@espol.edu.ec

^b Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Km. 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador
mbarcos@espol.edu.ec

Resumen. En la finca "Martha Samaniego"- ubicada en el cantón Pallatanga, se constató la presencia de Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMAs) en varias plantaciones nativas del sitio, detectando la mayor cantidad de esporulación y micorrización en las plantaciones de Banano (*Musa sp.*) y Niguito (*Muntingia calabura*). El porcentaje de humedad en las muestras de suelo estudiadas, oscilan entre 32% al 36%, y el pH del suelo promedio es de 5.0. El porcentaje de micorrización nativa en las plantaciones de interés, estuvo entre 53% para banano y 33% en niguito. Las especies de HMAs identificadas en ambas plantaciones, pertenecen en su mayoría a los géneros *Acaulospora*, *Diversispora* y *Glomus*. Se aislaron consorcio de esporas viables en banano y niguito, las mismas que fueron inoculadas en el cultivo trampa maíz (*Zea mays*), usando como sustrato una mezcla en proporciones 50/50 de arena y suelo. Se determinó un aumento en el porcentaje de colonización de ambos consorcios en los cultivos trampas, en comparación al porcentaje nativo de los mismos. La versatilidad de estos hongos para adaptarse a la mayoría de plantaciones terrestres, muestran el potencial que tienen para ser utilizados como biofertilizantes en sistemas agrícolas, como soporte en la conservación de ecosistemas en riesgo y en sistemas fitorremediadores.

Palabras Clave: Hongos Micorrícicos Arbusculares, cultivo trampa, micorrización.

Abstract. On the farm "Martha Samaniego"- located in the canton Pallatanga Pallatanga, the presence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) in various native plantings site is determined by detecting the greatest amount of mycorrhizal sporulation and Banana plantations (*Musa sp.*) and Niguito (*Muntingia calabura*). The moisture in the soil samples tested, ranging from 32% to 36%, and the average ground pH is 5.0. The percentage of native mycorrhizal interest in plantations, was between 53% and 33% for bananas in niguito. HMAS species identified in both plantations, mostly belong to the genera *Acaulospora*, *diversispora* and *Glomus*. Consortium of viable spores in banana and niguito were isolated, the same that were inoculated in the trap plants maize (*Zea mays*), using as substrate a mixture in 50/50 proportions of sand and soil. An increase in the percentage of colonization of both consortia trap crops compared to native percentage thereof is determined. The versatility of these fungi to adapt to most terrestrial plantations, demonstrate their potential to be used as bio-fertilizers in farming systems to support the conservation of ecosystems at risk and phytoremediators systems.

1. Introducción.

El desarrollo del sector agrícola como sector económico primario, es evidente en el Ecuador. En el 2014 se reportó un promedio de 7,33% del Producto Interno Bruto¹ (PIB), lo que conlleva a realzar su importancia a nivel económico y nutricional, sin embargo el desgaste ecológico y ambiental que ocasiona debe ser controlado, puesto que la mayoría de los sistemas agrícolas son poco sustentables y sostenibles.

Los agroecosistemas convencionales ocasionan graves impactos ambientales, debido a la deforestación, erosión de los sitios nativos, uso excesivo de agroquímicos para el control de plagas, enfermedades y el uso de fertilizantes químicos que alteran el ciclo normal del nitrógeno y de otros elementos [1]. Para contrarrestar el impacto negativo de los agroecosistemas convencionales sin afectar la producción, se ha propuesto la implementación de una agricultura ecológica, sustentable y sostenible que tiene como fin optimizar el rendimiento de la producción y disminuir el impacto nocivo al ambiente.

Una de las estrategias aplicada en la agricultura ecológica, expone el uso de microorganismos benéficos propios del sitio como inoculantes microbianos, obteniendo notorias mejorías en la calidad y producción del cultivo, y asegurando la conservación de los recursos naturales nativos del lugar². Actualmente, la alternativa de emplear microorganismos propios del suelo en la elaboración de biofertilizantes, se ha venido desarrollando, destacándose el uso de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)[2] [3], quienes al formar simbiosis con las plantas, les permite utilizar eficientemente los nutrientes del suelo, reduciendo el uso excesivo de fertilizantes químico, y por ende la contaminación que provocan[4], a su vez esta relación positiva con los HMA les brinda ventaja sobre otras planta no hospedadoras[5].

En los últimos años, se ha comprobado los beneficios que proveen los HMA frente a la salud y el desarrollo de cultivos con importancia agrícola, hortícola y forestal [6], esto se debe a la simbiosis efectiva que realizan con aproximadamente el 80 % de las plantas habitantes en ecosistemas terrestres[7], [8]. Los efectos provocados en las plantas, complementan y favorecen al sistema radicular, puesto a que se presenta un incremento en la absorción de agua y nutrientes provenientes del suelo, también aumenta la tolerancia ante el estrés biótico y abióticos [7], y mejora la calidad de suelos erosionados [6], [9]. Una vez que se haya dado la infección por los HMA, estos producen red de hifas que se extienden tanto al interior de las raíces, como al exterior de las mismas, abarcando la mayor superficie del sector, dándole mayor resistencia a metales tóxicos, alta salinidad, niveles variantes de temperatura y un pH desfavorables para los suelos, y además beneficia a las plantas al aumentar la captación de iones poco móviles de manera considerable. La baja cantidad de iones de fósforo es un limitante para el desarrollo vegetal eficiente [10].

¹Banco Central del Ecuador - www.bce.fin.ec

²FUNDASES - http://www.fundases.com/userfiles/file/MicroorG_Benef_Efect.pdf

Los HMAs muestran un crecimiento intracelular e intercelular en la zona cortical del sistema radical, conformando dos estructuras internas fúngicas denominadas arbuscúlos y vesículas, estructuras propias de estos hongos [2], [11], capaces de translocar gránulos de polifosfato a las zonas de mayor requerimiento de fósforo [12]. Los arbuscúlos se forman por la división dicotómica de hifas, estos llegan a ser invaginados por la membrana plasmática, incrementando la disposición e intercambio de nutrientes entre las plantas y los HMAs, entre tanto las vesículas se forman en la porción terminal de las hifas, y almacenan reservas frente a las posibles limitaciones de adquirir la energía necesaria para su propio crecimiento [6], [13]. Se considera que los HMA son simbioses obligados puesto a que la reproducción de los mismos depende de la correlación con las plantas hospedadoras, de tal manera que completan su ciclo de vida asociados a las raíces hospedadoras [2]. Hay tres tipos de hifas externas presentes en los HMA: las hifas infectivas, encargadas de suscitar los puntos de colonización de diversas raíces; también se encuentran las hifas absorbentes, quienes se extienden por los suelos para la absorción de nutrientes; y por último están las hifas fértiles, colocadas en la superficie de las esporas [6].

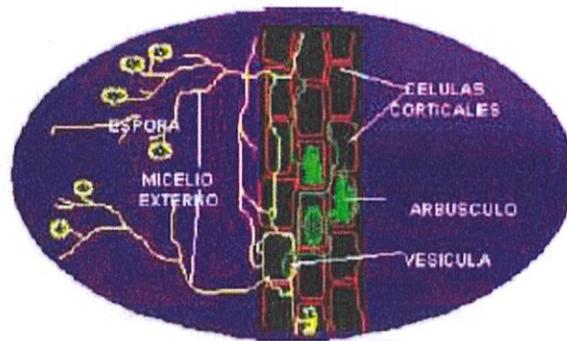


Imagen 1.-Estructura morfológica de Hongos Micorrízicos Arbusculares relacionados simbióticamente a raíces vegetales [14].

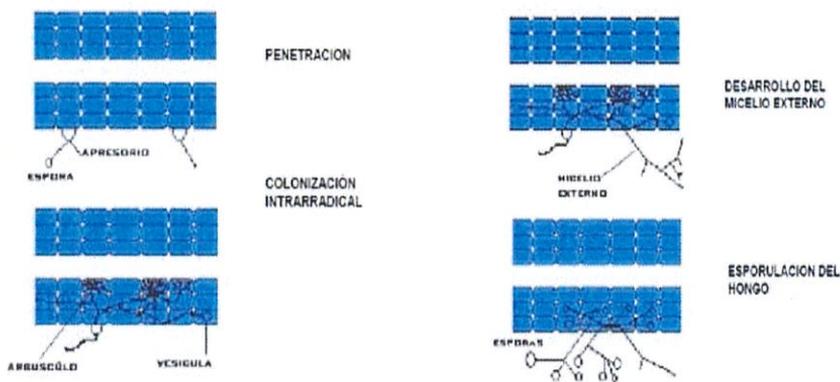


Imagen 2.- Infección en raíces de plantaciones por HMAs [26].

No hay un único hábitat propicio para los HMAs debido a que ellos se encuentra ampliamente distribuidos en ambientes terrestres, y gran parte de las raíces de Angiospermas, Gimnospermas, Pteridofitas y Briofitas son simbiontes obligados o facultativos con los HMAs [15]. Asimismo los HMAs no tienen especificidad exclusiva con un tipo de planta hospedadora determinada[7], sin embargo es evidente el efecto positivo que tienen los HMA sobre ciertas vegetaciones hospedadoras específicas [16], [17]. Por lo tanto se presume la existencia de diversos HMAs en las zonas del trópico húmedo del Ecuador, teniendo el conocimiento de la gran biodiversidad de flora y fauna propias del sitio.

Con estos antecedentes, el presente estudio tiene como objetivo aislar e identificar a nivel morfológico la presencia de HMAs nativos del trópico húmedo de Pallatanga - Ecuador. El sitio de estudio seleccionado fue la finca "Martha Samaniego", la misma que se encuentra inactiva por aproximadamente más de 10 años y escasa influencia antropogénica, esto supone la restauración de la microbiota nativa de la zona. Con esta investigación se establece una línea base, de tal manera que en futuras investigaciones se pueda analizar la efectividad de los mismos, en cultivos comerciales y de importancia económica, como biofertilizantes para una agricultura ecológica sostenible y sustentable.

2. Materiales y Métodos

Análisis de la zona de estudio.

Se recolectó muestras de suelo, en la finca "Martha Samaniego", ubicada en el sector del trópico húmedo aledaña al cantón Pallatanga de la provincia de Chimborazo, en los puntos 02°09'26" S y 079°03'45" W a 523 m sobre el nivel del mar. Las muestras provienen de una profundidad aproximada de 15 a 20 cm y a una distancia de 5 cm de las raíces principales pertenecientes a plantaciones relevantes del sitio. Se recolectó por cada muestra aproximadamente 1 kilogramo de suelo y raicillas, posteriormente fueron almacenadas en bolsas Ziploc a 10°C en el cuarto frío de los laboratorio del CIBE - ESPOL.

El porcentaje de humedad del suelo fue calculado al separar 10 gramos (peso fresco) de suelo de diversas plantaciones presentes de la zona, y secados en horno a 72°C por 72 horas consecutivas [18], luego se volvió a pesar en balanza eléctrica para obtener un nuevo peso (peso seco), la diferencia de ambos peso, multiplicado por 100 dio el porcentaje de humedad.

Se calculó el pH promedio del suelo, extrayendo aproximadamente 500 gr de las plantaciones muestreadas, se utilizó exclusivamente un pH-metro de suelo, modelo kelway soil tester, con un rango pH de 3.5 a 8.0, el mismo fue incrustado a 10 cm de profundidad.

Aislamiento y conteo de esporas de Hongos Micorrízicos Arbusculares.

Las esporas procedentes de las plantaciones fueron aisladas por el método de "Extracción por gradiente de densidad", propuesto por Furlan, Bartschii y Fortin [19], con ciertas modificaciones debido a la gran cantidad de materia orgánica del suelo, protocolo que será brevemente descrito a continuación:

El método de extracción por gradiente de densidad, tiene como base la metodología de “Cribado y decantación” propuesta por Gerdemann y Nicolson [20]. Se inició con la separación de aproximadamente 50 gr de suelo, pesados en balanza electrónica; los 50 gr de suelo fueron colocados en un vaso de precipitación de 1000 ml, y se adicionó aproximadamente 800 ml de agua de grifo; continuó el proceso agitando alrededor de 30 segundos, hasta obtener la disolución total del suelo y se dejó precipitar por aproximadamente 1 minuto; se vació el agua del recipiente sobre los tamices con malla de 250 μm y 45 μm respectivamente, sin dejar pasar el sedimento que estaba precipitado. Este proceso se repitió las veces necesarias, hasta obtener partículas en suspensión lo más claras posibles; el material colectado en el tamiz de 45 μm , fue transferido a tubo falcón de 50 ml.

Según Furlan, el material recolectado, no debe sobrepasar $\frac{1}{4}$ del tubo centrifuga, en este caso se vertió de 10 a 15 ml de muestras en los tubos falcón de 50 ml, los $\frac{3}{4}$ restantes del tubo se llenaron con agua potable y se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm; al salir de la centrifuga, se eliminó el sobrenadante de los tubos y se adicionó aproximadamente de 10 a 15 ml, de una solución de sacarosa y tween 20, al 72% y 2.8 %. Para una solución de 1000 ml se utiliza 21,4 gr de tween 20 y en caso de utilizar tween 80 se cola 20 gr; los tubos fueron colocados una vez más en la centrifuga por 5 minutos a 2000 rpm [19]. La solución resultante de la última centrifugación, fue puesta en nuevos tubos previamente etiquetados. Se observó en el estero microscopio agregando alrededor de 5 ml de resultante con 5 ml de agua potable. Las esporas que se encontraron flotando fueron extraídas con pipetas pasteur de 2 ml.

Fijación semipermanente de esporas en placas portaobjetos.

Previo a la identificación morfológica, las esporas se fijaron en placas portaobjetos, tomando como base la metodología propuesta por Koske y Tessier [21], que utiliza la solución de Melzer y PVLG para elaborar montajes semipermanentes de las esporas.

La solución de Melzer empleada, está compuesta de 100 ml de agua destilada, 100 gr de hidrato de cloral, 1.5 gr de yodo y 5 gr de yoduro de potasio, la solución debe ser agitada hasta conseguir una mezcla homogénea. El PVLG está compuesto por alcohol polivinílico, agua destilada, ácido láctico y glicerol, se recomienda prepara la solución de PVLG por partes, se homogenizó en un recipiente 10 ml de glicerol con 100 ml de ácido láctico hasta obtener una solución acuosa; en un recipiente oscuro se colocó 100 ml de agua destila tibia, y 12 gr de alcohol polivinílico (PVOH), se calentó en baño maría a 150 °C por 9 horas, luego se vacía el ácido láctico y glicerol en el PVOH caliente y se deja reposar por una noche en la estufa a 85 °C.

Identificación morfológica de Hongos Micorrícicos Arbusculares.

La identificación morfológica de esporas HMAs, se basó en características notables, como el color y tamaño de la espora, la textura y grosor de las capas, y la reacción de las mismas en reactivo de MELZER, estas características son normalmente visibles en microscopio compuesto binocular y estereoscopio.

Para identificar morfológicamente las esporas previamente extraídas, estas fueron colocadas en cajas Petri y se agruparon entre 10 y 15 esporas según color y tamaño, de tal manera que en cada grupo existan mínimo dos variedades de HMA. Se situó en el lado derecho del portaobjeto una gota de PVLG, encima de ésta se colocó el grupo de esporas que se encontraban en mejores condiciones. Las esporas que no estuvieron en óptimas condiciones, fueron colocadas en portaobjetos, los cuales tendrían una gota de PVLG más reactivo de MELZER, se dejó reposar las esporas con PVLG y PVLG + MELZER por 3 minutos para aumentar la viscosidad, luego se colocó el cubreobjetos, dejando la menor cantidad de burbujas de aire [21]. Bajo el estereomicroscopio, se suministró una ligera presión con la aguja enmangada sobre el cubreobjetos, para aplastar las esporas y observar las estructuras de mayor importancia para la identificación.

Se recomienda colocar las placas en la incubadora a 65°C por 24 horas, para la eliminación de residuos y reducción de burbujas de aire presentes. Las placas con esporas son inspeccionadas en el microscopio óptico compuesto, bajo los lentes de 10X, 40X y 100X, con el fin de examinar las capas y paredes de la espora.

Tinción de raíces infectadas con HMAs.

Para conocer el porcentaje de micorrización en las plantaciones nativas del sitio muestreado, se procedió a extraer las raicillas más finas, y cercanas a las raíces principales, a un máximo de 15 cm de profundidad, las cuales fueron lavadas y tratadas para una clarificación óptima y una posterior tinción con azul de tripano al 0,05%, basándose en las técnicas propuestas por Phillips y Hayman [22], con ciertas modificaciones adaptadas exclusivamente a las raicillas obtenidas, con el fin de mejorar su eficacia. La descripción resumida de las técnicas de clarificación y tinción es:

Las raicillas extraídas, pasaron por el primer proceso de lavado, donde éstas son colocadas en una cernidora o un colador de plástico y se vertió constantemente agua de grifo hasta dejarlas con la menor cantidad de tierra. Se distribuyeron en frascos de vidrio de 10 ml, teniendo en cuenta de no sobrepasar la mitad de los frascos. El hidróxido de potasio (KOH) al 10% fue colocado en los frascos, hasta cubrir por completo las raicillas, proceso que sirve para aclarar por completo a éstas, los frascos con KOH fueron expuestos por 15 minutos en el autoclave a 121°C. Para eliminar el exceso de KOH se lavó un mínimo de 3 veces cada muestra, en caso de que las raicillas no se encontraron totalmente clarificadas, se procedió adicionar peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 4%, por aproximadamente 10 minutos, luego se eliminó el excedente enjuagando 3 veces cada muestra. La acidificación de las raicillas es necesaria para la fijación del colorante en los HMAs presentes en las células corticales, y por ello se utilizó ácido clorhídrico (HCl) al 1% por 4 minutos, transcurrido este tiempo se elimina el HCl y no se enjuagan las raicillas. Después se adiciona la solución de azul de tripano al 0,05% hasta cubrir las raicillas por 10 minutos a 121°C en autoclave.

Determinación del porcentaje de micorrización en plantaciones nativas.

El cálculo del porcentaje de micorrización en las plantaciones de banano y niguito se determinó según la fórmula propuesta por McGonigle [23], disponiendo las raicillas previamente teñidas en placas de porta objetos. Aproximadamente se colocaron 10 raicillas de 2 cm en cada porta objetos y se agregó una gota de acetoglicerol antes colocar el cubre objetos.

Las raicillas fueron observadas en un microscopio compuesto binocular usando el lente de 20 X, y se examinó una por una para detectar la presencia de hifas, vesículas y arbuscúlos y de esta manera determinar la micorrización en cada plantación.

Inoculación en cultivos trampa.-

Los HMAs, para su multiplicación, fueron inoculados en cultivos trampa[24], de los cuales se tiene información, como es el caso del maíz (*Zea mays*), que es una excelente gramínea para lograr multiplicar a los HMAs en abundancia. El inóculo usado para la multiplicación de los HMAs fue obtenido de las plantaciones de banano y niguito por poseer mayor cantidad de esporas, se tomó 10 muestras de suelo rizosférico de aproximadamente 1 Kg, éstas fueron homogenizadas para tener una muestra compuesta y después se la tamizó para manejar un mismo tamaño de partícula. El sustrato utilizado para los cultivos trampas, está compuesto de suelo arenoso y suelo limoso en una proporción de 50/50 [25]. Este fue previamente esterilizado por 3 días consecutivos en autoclave a 121°C por una hora.

En fundas plásticas, se colocó la tierra estéril y 20 gramos de inóculos por unidad, sembrando 3 semillas esterilizadas de maíz por maceta. El proceso de multiplicación se realizó para los dos consorcios de HMA obtenidos de las plantaciones de banano y de niguito por dos meses consecutivos.

3. Resultados

Análisis de la zona de estudio.

El porcentaje de humedad retenida en el suelo de las plantaciones estudiadas, varía entre 32% y 56% (Tabla 1), indicando un porcentaje de humedad promedio en la zona de estudio del 41%.

En cuanto al pH del suelo, presento un valor promedio de 5.0, valor aproximado que coincide con el reportado por otros investigadores en estudios similares.

Plantaciones	Porcentaje de Humedad
Banano	35,68
Bromelia	56,67
Café	39,96
Fernán Sánchez	42,25
Guarumo	35,90
Niguito	32,08
Papaya	41,09
Pilchi	45,45

Tabla 1.- Porcentaje de humedad de las respectivas plantaciones de la finca “Martha Samaniego”.

Aislamiento y conteo de esporas de Hongos Micorrízicos Arbusculares.

En las muestras de suelo rizosférico de las ocho plantaciones analizadas, fue posible encontrar la presencias de esporas HMAs en seis plantaciones, estando solo ausentes en las muestras de bromelia y pilchi (Tabla 2).

Plantación	Presencia	Ausencia
Banano	X	-----
Bromelia	-----	X
Café	X	-----
Fernán Sánchez	X	-----
Guarumo	X	-----
Niguito	X	-----
Papaya	X	-----
Pilchi	-----	X

Tabla 2.- Presencia y/o ausencia de esporas HMAs en las plantaciones de la zona de estudio

En el gráfico 1 se presenta el número de esporas por gramo de suelo rizosférico de los dos cultivos seleccionados, observando que las interacciones constituidas por los consorcios de HMAs en banano y niguito, no difieren en sus valores. Tanto en banano como en niguito se encontró una relación de 1:1 de esporas por gramos de suelo. Cabe mencionar que ambas plantaciones se encuentran cercanas dentro de la misma zona de estudio y están expuestas a las mismas condiciones climáticas.

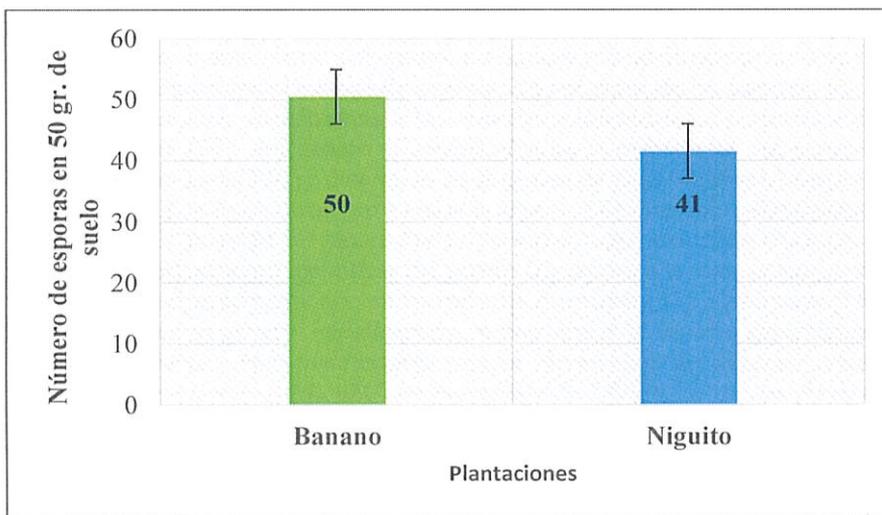


Gráfico 1.- Promedio de número de esporas HMAs en 50 gr de suelo de plantaciones banano (*Musa sp.*) y niguito (*Muntingia calabura*)

Identificación morfológica de HMAs.

En la tabla 3 y 4 se presentan la identificación de los consorcios de HMA que estaban presente en la rizósfera de los cultivos de banano y niguito.

ESPORAS HMAs EN PLANTACIONES DE BANANO (C.Bn)					
Género	Especie	Imagen	Género	Especie	Imagen
<i>Acaulospora</i>	<i>colliculosa</i>		<i>Entrophospora</i>	<i>infrequens</i>	
<i>Acaulospora</i>	<i>scrobiculata</i>		<i>Funneliformis</i>	<i>geosporum</i>	
<i>Acaulospora</i>	<i>spinosa</i>		<i>Gigaspora</i>	<i>margarita</i>	
<i>Claroideoglossum</i>	<i>etunicatum</i>		<i>Glomus</i>	<i>bistratum</i>	
<i>Claroideoglossum</i>	<i>luteum</i>		<i>Glomus</i>	<i>gibbosum</i>	
<i>Diversispora</i>	sp.		<i>Glomus</i>	sp.	
<i>Diversispora</i>	<i>trimurales</i>		<i>Scutellospora</i>	<i>spinosissima</i>	

Tabla 3.- Diversas especies de HMAs presentes en el suelo de plantaciones de banano (*Musa sp.*).

Las esporas detectadas en el consorcio de banano (C.Bn), fueron clasificadas en los siguientes géneros: Acaulospora, Claroideoglobus, Diversispora, Entrophospora, Funneliformis, Gigaspora, Glomus y Scutellospora. Se llegó a identificar tentativamente a nivel de especie, a gran parte de las esporas. En el género *Acaulospora* encontramos a las especies *colliculosa* [27], *scrobiculata* [28] y *spinosa* [29]; del género *Claroideoglobus*, corroboramos las especies *etunicatum* y *luteum* [30]; se determinó en el género de *Diversispora* a la especie *trimurales* [31]; se logró distinguir a una sola especie *Entrophospora* denominada *infrequens* [32]; también del género *Funneliformis* se logró identificar a la especie *geosporum* [33]; se logró identificar del género *Gigaspora* a la especie *margarita* [34]; en *Glomus* se identificaron en las especies *bistratum* [35] y *gibbosum* [36]; y finalmente en el género *Scutellospora*, se encontró a la especie *spinosissima* [37]. Los géneros que manifestaron mayor diversidad de especie fueron *Acaulospora* y *Glomus*, cada uno con porcentaje de 21%, y los menos diversos fueron los géneros *Entrophospora*, *Funneliformis*, *Gigaspora* y *Scutellospora* con un 7 % cada uno.

ESPORAS HMAs EN PLANTACIONES DE NIGUITO (C.Ng)					
Género	Especie	Imagen	Género	Especie	Imagen
<i>Acaulospora</i>	<i>colliculosa</i>		<i>Glomus</i>	<i>corymbiforme</i>	
<i>Diversispora</i>	<i>Clara</i>		<i>Racocetra</i>	<i>fulgida</i>	
<i>Diversispora</i>	sp.		<i>Redeckera</i>	sp.	
<i>Diversispora</i>	<i>tortuosa</i>		<i>Scutellospora</i>	<i>nodosa</i>	
<i>Glomus</i>	<i>bistratum</i>				

Tabla 4.- Diversas especies de HMAs presentes en el suelo de plantaciones de niguito (*Muntingia calabura*).

Las esporas detectadas en el consorcio de niguito (C.Ng), fueron clasificadas dentro de los géneros y especies que a continuación se mencionan: *Acaulospora colliculosa* [27]; se determinó dos especie del género *Diversispora*, *clara* [38] y *tortuosa* [39]; del género *Glomus* se identificaron a *bistratum* [35] y *corymbiforme* [40]; la especie *fulgida* [41] del género *Racocetra*; y en *Scutellospora* se determinó a la especie *nodosa* [42]. El género *Diversispora* tiene mayor porcentaje de diversidad presentando 33%, y los menos diversos son los géneros *Acaulospora*, *Racocetra*, *Redeckera* y *Scutellospora* con un porcentaje de 11% cada uno.

Determinación del porcentaje de micorrización en plantaciones nativas de banano y niguito.

Alrededor de 13 especímenes correspondiente a cada plantación estudiada, fueron utilizados para determinar el porcentaje de micorrización nativa en banano y niguito.

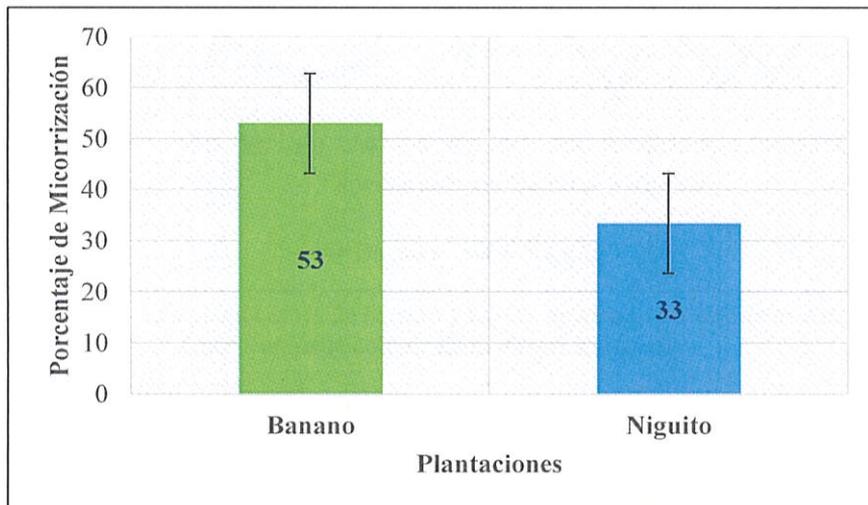


Gráfico 2.- Presenta el porcentaje de micorrización promedio de las plantaciones de banano (*Musa sp.*) y niguito (*Muntingia calabura*).

En el gráfico 2 se presenta el porcentaje nativo de micorrización de las dos especies estudiadas. Este porcentaje fue obtenido al observarse las estructuras de hifas, vesículas y arbuscúlos en las raicillas teñidas de las dos especies estudiadas. En las plantaciones de banano se encontró mayor porcentajes de colonización, alcanzado un valor de 53%, y niguito obtuvo un 33% (Gráfico 2).

Aunque el gráfico 2 solo menciona el promedio general de colonización en ambas plantaciones, se encontraron algunos especímenes que alcanzaron un porcentaje de colonización mayor como se muestra en el Gráfico 3. En especímenes de banano se hallaron hasta un 93% de micorrización y en niguito hasta un 60%. En ambas plantaciones se lograron distinguir al menos dos de las tres estructuras anteriormente mencionadas con frecuencia, y en este estudio se consideró solo la presencia de una de las estructuras como infección a las raíces.

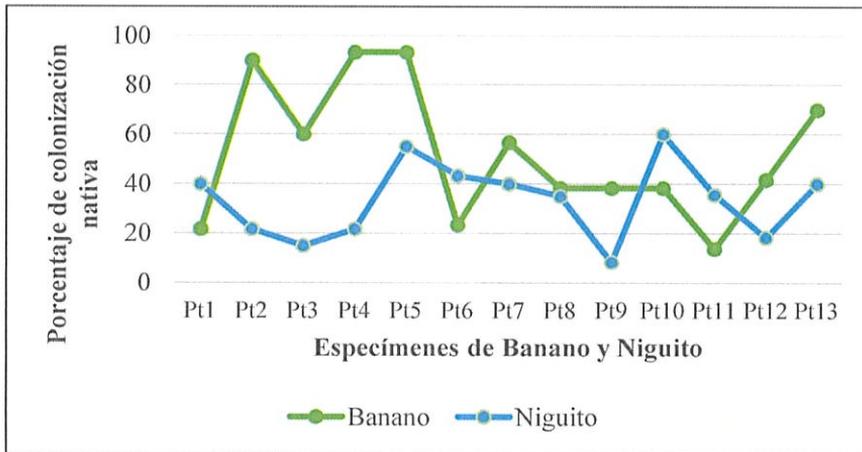


Gráfico 3.- Las plantaciones de banano y niguito muestran especímenes con un porcentaje de colonización mayor a la media.

Inoculación en cultivos trampa.

Al mes de haber infectado el cultivo trampa con los dos consorcios de HMA, se pudo observar que el C.Bn presentó una baja tasa de infección alcanzando solo un 30 %. Mientras que el C.Ng, presentó una mayor infección del cultivo de maíz logrando un porcentaje de colonización del 70%. En el segundo mes, las tasas de micorrización para ambos consorcios aumentaron de forma considerable, llegando a un 80% para C.Bn y 85% para C.Ng (Gráfico 4).

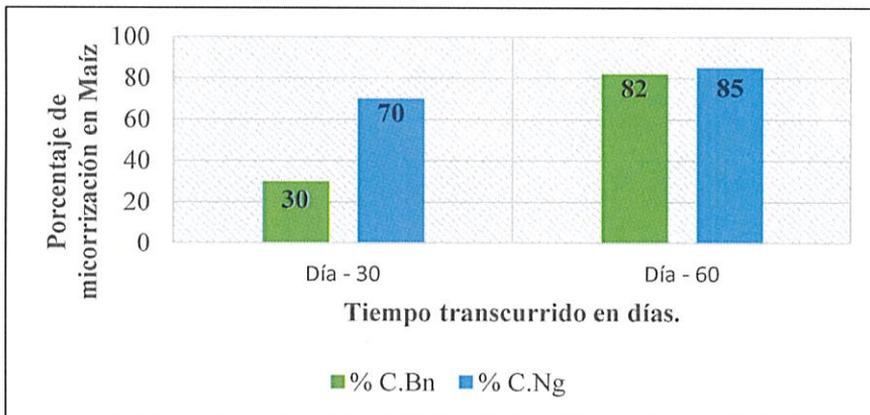
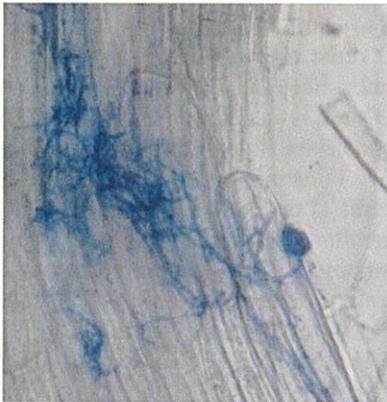


Gráfico 4.- Porcentaje de micorrización de los inóculos C.Bn y C.Ng en cultivos trampa de maíz (Zea mays) después de dos meses de inoculación.

Se aplicaron condiciones de estrés en los dos meses de tratamiento, con el fin de multiplicar con mayor rapidez las esporas inoculadas. Luego de los dos meses ambos consorcios tienen una similar tasa de colonización, y los cultivos trampa presentan un desarrollo similar en su sistema radicular, tamaño y comportamiento en general. Se pudo evidenciar las estructuras de hifas, vesículas y arbuscúlos en ambos tratamientos, y con mayor frecuencia y abundancia después del primer mes (Imagen 3 y 4).



C.Bn en Maíz (*Zea mays*)



C.Ng en Maíz (*Zea mays*)

Imagen 3.- Colonización de C.Bn y C.Ng al mes de inoculación.

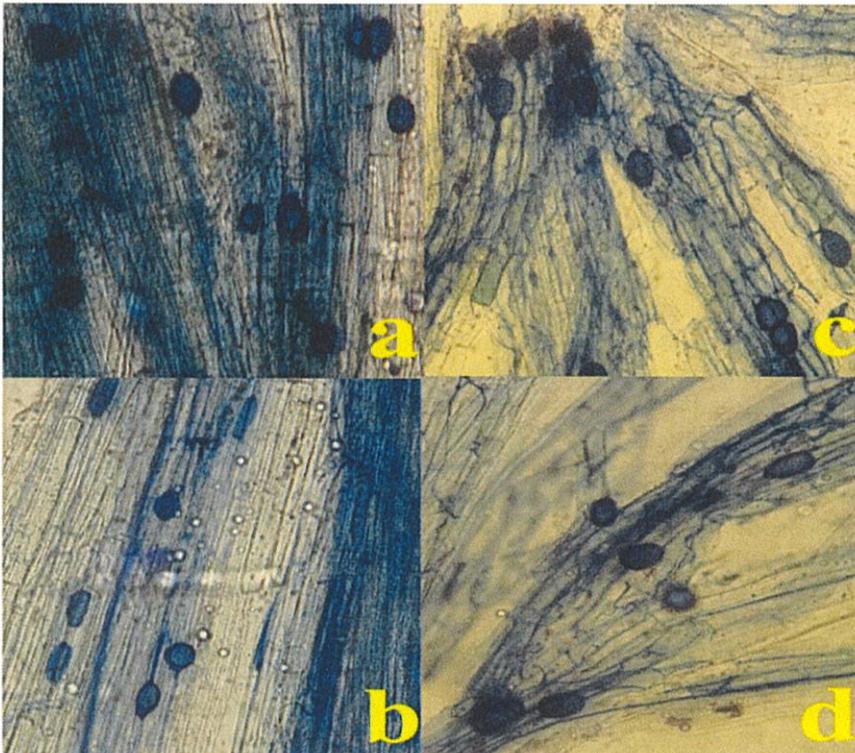


Imagen 4.- Colonización de HMA en raíces del cultivo trampa (*Zea mays*). Las figuras a y b muestran la colonización del C.Bn y las figuras c y d, la colonización de C.Ng al segundo mes de inoculación.

4. Discusión.

Ecuador y Colombia comparte similares condiciones climáticas, diversidad faunística y forestal, por lo tanto el presente estudio tuvo como referencias a investigaciones de HMAs realizados en Colombia, también se tomó como fuente de referencia y comparación a un estudio sobre HMAs efectuado en cultivos y plantaciones nativas en Santa Elena - Ecuador.

Las plantaciones de banano (*Musa sp.*) y niguito (*Muntingia calabura*) están mayormente distribuidas en la finca "Martha Samaniego", ambas plantaciones presentaron un porcentaje de micorrización nativo superior al 40%, y una gran densidad de esporas en comparación a las otras plantaciones del sitio, razón por la cual éstas plantaciones fueron de interés para el desarrollo del estudio.

En las plantaciones de interés, banano y niguito, el promedio de humedad retenida en el suelo fluctúa entre el 32% y 36 % (tabla 1), promedio muy cercano al que muestra el estudio realizado en Colombia, por Posada et al. [43]. La influencia de la humedad retenida en el suelo sobre la proliferación de las HMAs ha sido un tema de discusión por varios investigadores, algunos aseveran que existe una disminución en la densidad o cantidad de esporas, mientras que otros manifiestan que hay un aumento de la misma, así mismo hay otros que sostienen que no se presentan cambios relevantes [44] [45] [46]. Las muestras obtenidas del suelo de banano y niguito presentaron un porcentaje de humedad similar, quienes exhibieron una mayor densidad de esporas que otras plantaciones de la zona con porcentajes de humedad cercanos, solo las plantaciones de bromelia no cumplieron ésta condición. Al igual que el estudio en Colombia antes mencionado, se asume que el porcentaje de humedad no influye en la densidad de esporas y colonización nativa de HMAs [43]. El pH promedio determinado en los suelos de todas las plantaciones es de 5, y no se observó influencia relevante de éste factor sobre los HMAs nativos, descartándolo como factor limitante para el efecto de este estudio.

En banano y niguito se determinó un promedio de 50 y 41 esporas por cada 50 gramos (Gráfico 1), estableciendo una relación 1:1 de espora por gramo. El estudio de HMAs llevado a cabo en cultivos de Santa Elena por Tejena [47], determina proporciones de 2:1 teniendo un promedio 174 esporas en 100 gramos de suelo. Se atribuye la diferencia de densidad de esporas entre Pallatanga y Santa Elena, a las diferentes condiciones climáticas que están expuestas, siendo Santa Elena un sitio árido y con factores ambientales muy limitantes, es bien conocido que estos límites propician la multiplicación masiva de los HMAs como parte de la adaptación de las plantas a este tipo de ambientes [47].

La diversidad de HMAs presente en Pallatanga, fue clasificada en los géneros Acaulospora, Claroideoglomus, Diversispora, Entrophospora, Funneliformis, Gigaspora, Glomus, Racocetra, Redeckera y Scutellospora (Tablas 3 y 4), entre ambas plantaciones, indicando una leve superioridad en diversidad comparado a los géneros identificados en Santa Elena (Acaulospora, Archaespora, Gigaspora, Glomus, Paraglomus, Scutellospora) [47]. Cabe recalcar que en ambos sitios, se observó una gran diversidad de HMAs y es necesario prevenir la pérdida de ésta diversificación, ya que el efecto de estos microhongos en plantaciones y cultivos es muy beneficioso, y a futuro puede potenciarse su uso en el sector agrícola o mantener en equilibrio ecosistemas en riesgo [47].

El porcentaje de micorrización promedio en banano y niguito nativo es de 53% y 33,4% respectivamente (Gráfico 2), que comparado al estudio realizado en

Santa Elena, es similar [47]. La similitud de colonización entre estos dos estudios, puede tener como base el hecho de que en la finca “Martha Samaniego” que estuvo activa hace más de 10 años, se cultivó banano y café como cultivos comerciales principales antes de ser abandonada, y en Santa Elena están actualmente cultivos de plátano, ambas plantaciones tuvieron que adaptarse a un área determinado y establecieron relaciones simbióticas con los HMAs para adecuarse al cambio; se asume que el porcentaje de micorrización en el banano de Pallatanga es ligeramente superior al de Santa Elena, porque la zona de Pallatanga lleva recuperándose en los últimos años sin intervención antropogénica. Se debe traer a colisión el hecho de que hubo especímenes que mostraron un superior porcentaje de colonización, alcanzando un 93% en banano y 60% en niguito (Gráfico 3), esto puede darse debido a la adaptación propia y eficacia simbiótica de los consorcios de HMAs presentes con este tipo de plantaciones.

En los ensayos de infección de HMAs en cultivos trampa se utilizó un sustrato compuesto de arena y suelo en proporciones de 50/50, la misma relación fue utilizada por Usuga et. al [25], dando en ambos estudios resultados similares en cuanto a la multiplicación de HMAs. El sustrato sólido de arena y suelo facilita la aireación del mismo [48]. El cultivo trampa escogido fue el maíz (*Zea mays*), gramínea de ciclo corto que disminuye el riesgo de confundir patógenos con HMAs semejantes en forma y tamaño[49] [50].

Desde el primer mes de ensayo en cultivos trampas, se determinó un aumento en el porcentaje de micorrización por parte del C.Ng, el cual alcanzó un promedio de 70% (Gráfico 4), sin embargo el C.Bn tuvo una baja tasa de colonización en comparación a su micorrización nativa, obteniendo a penas un promedio del 30% de infección. Se asume que el consorcio de banano demora cierto tiempo en adecuarse a los cultivos de maíz, ya que en el segundo mes, los HMAs en banano prácticamente alcanza un 80% al igual que C.Ng que obtuvo un 85% de colonización en las raíces del maíz. Para concluir, ambos consorcios aumentaron su producción al ser sometidos a condiciones de estrés, desarrollándose de mejor manera que en los ambiente nativos.

5. Conclusión.

Para dar por finalizado el actual estudio en las zonas del trópico húmedo Pallatanga, se deja establecido una línea base en la finca “Martha Samaniego”, donde se determinó la presencia de HMAs en las plantaciones que ahí progresan. Se encontró una gran variedad de especies HMAs que seguramente ayudan en el desarrollo del entorno natural del propio ecosistema. El porcentaje de colonización nativa en raíces muestra la capacidad natural que tienen de realizar simbiosis, y en caso de utilizar a estos microorganismo como partes de un biofertilizante, estos puedan disminuir el riesgo de emisión de contaminantes al ambiente. Se pudo comprobar que al utilizar pequeñas cantidades de suelo micorrizado como inóculos, éstos sí llegan a infectar a cultivos trampa para lograr reproducir HMAs en masa. Lo antes mencionado da cabida a futuras investigaciones que tengan como objetivo aislar a estos consorcios naturales de esporas HMAs y multiplicarlos masivamente, ya sea para darle uso en agroecosistemas ecológicos, o utilizarlos dentro de sistemas fitorremediadores, debido a la propiedades que poseen de captar metales pesados, propiedades que no fueron profundamente detalladas en este estudio.

6. Bibliografía

- [1] R. Goodland, "Environmental sustainability in agriculture: Diet matters," *Ecological Economics*, vol. 23, no. 3. pp. 189–200, 1997.
- [2] C. Tufiño, "Efecto de la interacción de Hongos Micorrizicos Arbusculares (HMA) y la fertilización, sobre el crecimiento y desarrollo de plantas micropropagadas de banano (*Musa paradisiaca*) durante la fase de aclimatación," Escuela Politecnica del Ejercito, 2011.
- [3] H. López - Moctezuma, R. Ferrera-Cerrato, J. Farias - Larios, S. Aguilar - Espinosa, M. del R. F. Bello, and J. G. López - Aguirre, "MICORRIZA ARBUSCULAR, Bacillus Y SUSTRATO ENRIQUECIDO CON Arbuscular Mycorrhizae, Bacillus and Substrate Enriched with Vermicompost on the Development," *TERRA Latinoam.*, vol. 23, p. 524, 2005.
- [4] G. Cuenca, A. Cáceres, G. Oirdobro, Z. Hasmy, and C. Urdaneta, "Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en areas tropicales," *Interciencia*, vol. 32, no. 1, pp. 23–29, 2007.
- [5] E. Blanco, F. Salas, "Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigacionrealizada en costa rica.," *Agron. Costarric.*, vol. 21, no. 1, pp. 55–67, 1997.
- [6] S. E. Barrer, "El Uso De Hongos Micorrizicos Arbusculares Como Una Alternativa Para La Agricultura," *Fac. ciencias Agropecu.*, vol. 7, no. 1, pp. 124–132, 2009.
- [7] S. E. Smith and D. J. Read, *Mycorrhizal Symbiosis*. Elsevier, 1997.
- [8] H. Vierheilig, "Regulatory mechanisms during the plant – arbuscular mycorrhizal fungus interaction," *Can. J. Bot.*, vol. 82, no. 8, pp. 1166–1176, 2004.
- [9] J. M. Barea, M. J. Pozo, R. Azcón, and C. Azcón-Aguilar, "Microbial co-operation in the rhizosphere," *J. Exp. Bot.*, vol. 56, no. 417, pp. 1761–1778, 2005.
- [10] L. S. Bagyaraj, Joseph D; Stürmer, "Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)," in *Manual de Biología de Suelos Tropicales*, 2012, pp. 217–242.
- [11] O. Quilambo, "The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis," *African J. Biotechnol.*, vol. 2, no. December, pp. 539–546, 2003.
- [12] A. Alarcón and R. Ferrera-Cerrato, "MANEJO DE LA MICORRIZA ARBUSCULAR EN SISTEMAS DE PROPAGACION DE PLANTAS

FRUTICOLAS," *TERRA Latinoam.*, vol. 17, p. 180, 1999.

- [13] S. J. Barker, D. Tagu, G. Delp, P. Science, W. Campus, and G. Osmond, "Regulation of Root and Fungal Morphogenesis in Mycorrhizal Symbioses 1," *Plant Physiol*, vol. 116, pp. 1201–1207, 1998.
- [14] J. M. Barea, C. Azcón-Aguilar, R. Azcon, A. C. Gange, and V. K. Brown, "Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems," in *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*, 2002, pp. 65–77.
- [15] L. Hernández-cuevas, S. C. Argüero, P. G. Chávez, M. Antonio, R. Romero, and I. S. Gallén, "HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES," in *HONGOS MICORRIZÓGENOS DEL PEDREGAL DE SAN ÁNGEL*, 2003, p. 16.
- [16] R. Streitwolf-engel, T. Boller, A. Wiemken, and I. R. Sanders, "Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity," *Nature*, vol. 74, no. 1994, pp. 69–72, 1998.
- [17] M. G. a Van Der Heijden, T. Boller, A. Wiemken, and I. R. Sanders, "Different Arbuscular Mycorrhizal Fungal Species Are Potential Determinants of Plant Community Structure," *Ecol. Soc. Americas*, vol. 79, no. 6, pp. 2082–2091, 1998.
- [18] R. Posada, "PRESENCIA DE PROPÁGULOS DE HONGOS DE MICORRIZA ARBUSCULAR EN MUESTRAS DE HOJARASCA ALREDEDOR DE DOS ESPECIES ARBÓREAS EN UN BOSQUE HÚMEDO TROPICAL," *Acta Biológica Colomb.*, vol. 6, no. 1, pp. 47–55, 2001.
- [19] V. Furlan, H. Bartschi, and J.-A. Fortin, "Media for density gradient extraction of endomycorrhizal spores," *Trans. Br. Mycol. Soc.*, vol. 75, no. 2, pp. 336–338, Jan. 1980.
- [20] J. W. Gerdemann and T. H. Nicolson, "Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting," *Trans. Br. Mycol. Soc.*, vol. 46, no. 2, pp. 235–244, Jun. 1963.
- [21] R. E. Koske and B. Tessier, "A Convenient, Permanent Slide Mounting Medium," *Mycol. Soc. Am. Newsl.*, vol. 34, no. 2, p. 59, 1983.
- [22] J. M. Phillips and D. S. Hayman, "Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection," *Trans. Br. Mycol. Soc.*, vol. 55, no. 1, pp. 158–161, Aug. 1970.
- [23] T. P. McGonigle, M. H. Miller, D. G. Evans, G. L. Fairchild, and J. a. Swan, "A new method which gives an objective measure of colonization

of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi," *New Phytol.*, vol. 115, no. 3, pp. 495–501, 1990.

- [24] N. Brundrett Mark, Bougher, B. Dell, and T. Grove, "Working Ylith Mycorrhizas in Forestry and Agriculture," *Aust. Cent. Int. Agric. Res.*, p. 347, 1996.
- [25] C. Elena, U. Osorio, A. Esperanza, and F. Molano, "Multiplicación de hongos micorriza arbuscular (h.m.a) y efecto de la micorrización en plantas micropropagadas de banano (," *Rev. Fac. Agron. UNAL*, vol. 61, no. 1, pp. 4279–4290, 2008.
- [26] E. Guerrero, "Micorriza: fundamentos biológicos y estado del arte.," in *Micorrizas Recurso biológico del suelo.*, 1996, p. 346.
- [27] W. Kaonongbua, J. B. Morton, and J. D. Bever, "Taxonomic revision transferring species in Kuklospora to Acaulospora (Glomeromycota) and a description of Acaulospora colliculosa sp. nov. from field collected spores.," *Mycologia*, vol. 102, no. 6, pp. 1497–509, 2010.
- [28] J. L. Spain, "Patency of shields in water-mounted spores of four species in Acaulosporaceae (Glomales).," *Mycotaxon*, vol. 43, pp. 331–339, 1992.
- [29] C. Walker and J. M. Trappe, "Acaulospora spinosa sp. nov. with a key to the species of Acaulospora.," *Mycotaxon*, vol. 12, pp. 515 – 521, 1981.
- [30] A. Schüßler and C. Walker, "The Glomeromycota. A species list with new families and new genera.," *The Royal Botanic Garden Edinburgh*, vol. 22, pp. 24–26, 2010.
- [31] R. E. Koske and W. . Halvorson, "Scutellospora arenicola and Glomus trimurales: Two new species in the Endogonaceae," *Mycologia*, vol. 81, no. 6, pp. 927–933, 1990.
- [32] E. Sieverding and F. Oehl, "Revision of Entrophospora and description of Kuklospora and Intraspora, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes," *J. Appl. Bot. Food Qual. Bot.*, vol. 80, no. 1, pp. 69–81, 2006.
- [33] C. Walker, "Species in the Solanaceae: a new species (Glomus occultum) and a new combination (Glomus geosporum).," *Mycotaxon*, vol. 15, pp. 49–61, 1982.
- [34] W. N. Becker and I. R. Hall, "Gigaspora margarita, a new species in the Endogonaceae.," *Mycotaxon*, vol. 4, pp. 155–160, 1976.
- [35] J. Blaszkowski, P. Ryszka, F. Oehl, S. Koegel, A. Wiemken, G. M. Kovacs, and D. Redecker, "Glomus achrum and G.bistratum, two new

species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) found in maritime sand dunes,” *Botany*, vol. 87, no. 3, pp. 260–271, 2009.

- [36] J. Blaszkowski, “*Glomus gibbosum*, a new species from Poland,” *Mycologia*, vol. 89, pp. 339–345, 1997.
- [37] C. Walker, G. Cuenca, and F. Sánchez, “*Scutellospora spinosissima* sp. nov., A Newly Described Glomalean Fungus from Acidic, Low Nutrient Plant Communities in Venezuela,” *Ann. Bot.*, vol. 82, no. 1983, pp. 721–725, 1998.
- [38] B. Estrada, J. Palenzuela, J. Barea, J. M. Ruiz-lozano, G. Alves, and F. Oehl, “*Diversispora clara* (Glomeromycetes)—,” *Mycotaxon*, vol. 118, pp. 73–81, 2011.
- [39] J. W. Gerdemann and B. K. Bakshi, “Endogonaceae of India: two new species,” *Trans. Br. Mycol. Soc.*, vol. 66, pp. 340–343, 1976.
- [40] J. Blaszkowski, “*Glomus corymbiforme*, a new species in Glomales from Poland,” *Mycologia*, vol. 87, pp. 732–737, 1995.
- [41] F. Oehl, F. A. De Souza, and E. Sieverding, “Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes,” *Mycotaxon*, vol. 106, no. December, pp. 311–360, 2008.
- [42] J. Blaszkowski, “*Scutellispora nodosa* - a new species with knobby spores,” *Mycologia*, vol. 83, no. 4, pp. 537–542, 1991.
- [43] R. H. Posada Almanza, L. A. Franco Castro, A. P. Cuellar Calderón, W. Sánchez Chacón, and A. P. Sánchez Figueroa, “Inóculo de hongos de micorriza arbuscular en pasturas de *Brachiaria decumbens* (Poaceae) en zonas de loma y vega,” *Acta Biológica Colomb.*, vol. 12, no. 1, pp. 113–120, 2007.
- [44] D. H. Rickerl, F. O. Sancho, and S. Ananth, “Vesicular-Arbuscular Endomycorrhizal Colonization of Wetland Plants,” *J. Environ. Qual.*, vol. 23, no. 5, pp. 913–916, 1994.
- [45] L. M. Carvalho, I. Caçador, and M. A. Martins-Loução, “Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of the Tagus estuary (Portugal),” *Mycorrhiza*, vol. 11, pp. 303–309, 2001.
- [46] J. A. Entry, P. T. Rygielwicz, L. S. Watrud, and P. K. Donnelly, “Influence of adverse soil conditions on the formation and function of Arbuscular mycorrhizas,” *Adv. Environ. Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 123–138, Nov. 2002.
- [47] J. P. Tejena Vergara, “Diversidad de hongos Micorrízicos Arbusculares en la Finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena,”

Universidad de Guayaquil, 2011.

- [48] M. Habte and N. W. Osorio, "Arbuscular mycorrhizas : Producing and applying arbuscular mycorrhizal inoculum," Hawai, 2001.
- [49] E. Sieverding, "Selección de hospedero, sustrato de suelo, nivel y fuente de fósforo para la producción de esporas de hongos vesículo-arbuscular.," in *Memorias del Primer Congreso Nacional sobre Micorrizas*, 1984, pp. 237 – 250.
- [50] E. Owusu Bennoah and B. Mosse, "Plant Growth Response to Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza. XI . Field Inoculation Responses in Barley, Lucerner and Onion," *New Phytol.*, vol. 83, no. 3, pp. 671–679, 1979.