

1. Introducción

En los últimos años el estudio de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) ha marcado un gran avance en el campo agrícola y biológico, la relación simbiótica que se produce entre estos hongos y el sistema radicular de las plantas influye de manera determinante en el desarrollo de las mismas.

El papel de la actividad microbiana influye en la cinética de los procesos que se llevan a cabo en el suelo, tales como: la mineralización e inmovilización de nutrientes, e igualmente en la participación activa en el ciclo de nutrientes. (Guerra, 2007).

Debemos considerar que la colonización por hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de las raíces no conllevan daño alguno para éstas, el desarrollo de las hifas externas se ramifican y distribuyen en el suelo, el micelio externo tiene la función de ser participe en la adquisición de nutrientes y agua para las plantas, otros beneficios de los HMA es que dan a las plantas una mayor capacidad de tolerancia a los ambientes extremos, en la actualidad es muy bien conocido que los HMA están presentes en todos los biomas y ecosistemas terrestres desde hace más de 400 millones de años, convirtiéndose en la simbiosis vegetal más extendida en la naturaleza (Smith & Read, 2008).

Los HMA han desempeñado un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento de la estructura y diversidad de los ecosistemas (van der Heijden *et al.*, 1998).

En los ecosistemas frágiles y amenazados las micorrizas son las principales contribuyentes al establecimiento y desarrollo de las plantas (Haselwandter, 1987).

Las plantas que habitan en áreas áridas y semiáridas como son los característicos de la Península de Santa Elena, específicamente la Comuna Zapotal, el estrés ambiental constituye el principal obstáculo para su supervivencia y reproducción. Este estrés involucra baja disponibilidad de agua, patrones de lluvia altamente

impredecibles, suelos pobres en nutrientes (nitrógeno y fósforo) con alta variación espacial y temporal (Zak *et al.*, 1995; Whitford, 1986; Schlesinger *et al.*, 1990) y suelos con alta salinidad (Al-Karaki, 2000).

Una de las estrategias que utilizan las plantas frente a factores ambientales adversos es la asociación con los HMA, debido a su amplia distribución en la naturaleza y capacidad de asociación con casi la totalidad de las plantas terrestres. Los HMA son altamente adaptables a diferentes ambientes y son intermediarios cruciales entre el suelo y la planta (Sylvia & Williams, 1992). La simbiosis entre los hongos micorrízicos arbusculares y el sistema radicular de las plantas las ayudan a establecerse, desarrollarse, sobrevivir en ambientes extremos como son los áridos, semiáridos y desérticos muy característicos del Litoral Ecuatoriano.

Se ha reportado que los HMA son cosmopolitas y son encontrados en la mayoría de los ecosistemas incluyendo los áridos y semiáridos (Varma, 1996). La colonización en raíces de plantas desarrollándose en estas áreas es muy variable. La diversidad de especies micorrízicas depende del tamaño del área estudiada, estación del año, características edáficas y latitud (Allen, 1995).

El establecimiento de la micorriza no solo resulta ventajoso para la planta y el hongo, si no también favorece al ecosistema en su conjunto, ya que mejora la calidad del suelo así como el desarrollo, la diversidad y la productividad de la cubierta vegetal (Sánchez, 2009).

El estudio taxonómico de los HMA se ha basado en considerar aspectos morfológicos como son: el color, forma y tamaño de sus estructuras de reproducción, lo que ha permitido agrupar a estos hongos de manera artificial en la naturaleza, al no existir claves actualizadas o completas que permitan identificar claramente los organismos colectados en los suelos de cualquier ecosistema.

Actualmente las herramientas moleculares son las más empleadas en el estudio taxonómico de los HMA, sin embargo las técnicas en donde se utiliza las características morfológicas siguen siendo una herramienta adecuada y accesible para realizar determinaciones taxonómicas en un primer nivel de estos hongos, siempre y cuando no se cuente con la infraestructura adecuada para llevar a cabo la utilización de herramientas moleculares.

En este trabajo se evaluó la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en dos zonas, la primera intervenida por la actividad agrícola, y la segunda una zona en donde la actividad agrícola es nula, en la primera se ha implementado un sistema de riego eficaz para los diversos cultivos establecidos en la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal junto con un tratamiento adecuado para llevar a cabo la agricultura, lo que ha modificado las características edáficas del suelo que representan a la península de Santa Elena, en la segunda el suelo permanece con las características edáficas de un ecosistema árido.

La relación de los HMA con las raíces de las plantas en la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena no ha sido estudiada anteriormente, por lo que este trabajo contribuye a un mejor entendimiento de la simbiosis micorriza-arbuscular, tomando en consideración la diversidad de los HMA en esta zona.

Los resultados arrojados en este estudio dejan la puerta abierta para nuevas investigaciones ya que la diversidad de HMA encontrada es considerable, y la utilización de nuevas tecnologías para mejorar la producción agrícola en el litoral ecuatoriano es de suma importancia para mantener los ecosistemas saludables y la diversidad de HMA nativos en buen estado, ya que su pérdida y disminución involucraría daños ambientales muchas veces irreparables, que perjudicarían a las comunidades que se benefician de las actividades agrícolas.

2. Antecedentes

2.1. Micorrizas

La palabra Micorriza es un término proveniente del griego mikos, hongo y rhiza, raíz, fue utilizado por primera vez en el año de 1885 por el botánico alemán Albert Berthard Frank para hacer referencia a determinadas asociaciones existentes entre algunos hongos del suelo y las raíces de las plantas.

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

Las micorrizas son asociaciones simbióticas, mutualista, de carácter biotrófico en la que el huésped autótrofo, la planta, proporciona compuestos carbonados, procedentes de la fotosíntesis al simbionte heterótrofo, el hongo, así como un microhábitat protegido. A cambio el hongo le proporciona al vegetal nutrientes minerales, principalmente fósforo, y agua, mediante un sistema ramificado de hifas extraradicales capaz de explorar el suelo más allá de la zona de influencia de la raíz (Barea *et al.*, 1980).

El registro fósil y otros datos sugieren que todas las plantas terrestres existentes surgieron a partir de una condición arbusculo-micorrízica ancestral. Esta aparición se remonta al Devónico a partir del cual hongos y plantas evolucionaron hasta lo que son actualmente. Las micorrizas arbusculares evolucionaron simultáneamente con la primera colonización terrestre por parte de las plantas hace unos 450-500 millones de años y persisten actualmente en la mayoría de taxa existente. Las ectomicorrizas (hace unos 200 millones de años) y las micorrizas ericoides (hace unos 100 millones de años) evolucionaron cuando se incrementó el contenido en materia orgánica de algunos suelos antiguos y cuando aumentó la vegetación esclerófila como respuestas a suelos pobres, respectivamente. Las asociaciones micorrízicas parecen ser resultado de procesos de coevolución relativamente difusos. Mientras que acontecimientos tempranos en la evolución de la simbiosis micorrízicas han implicado cambios

genéticos recíprocos en las plantas primitivas y en los hongos de vida libre, las evidencias disponibles actualmente indican una evolución paralela de ambos en respuesta a cambios en el ambiente (García, 2002).

2.2. Tipos de Micorrizas

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

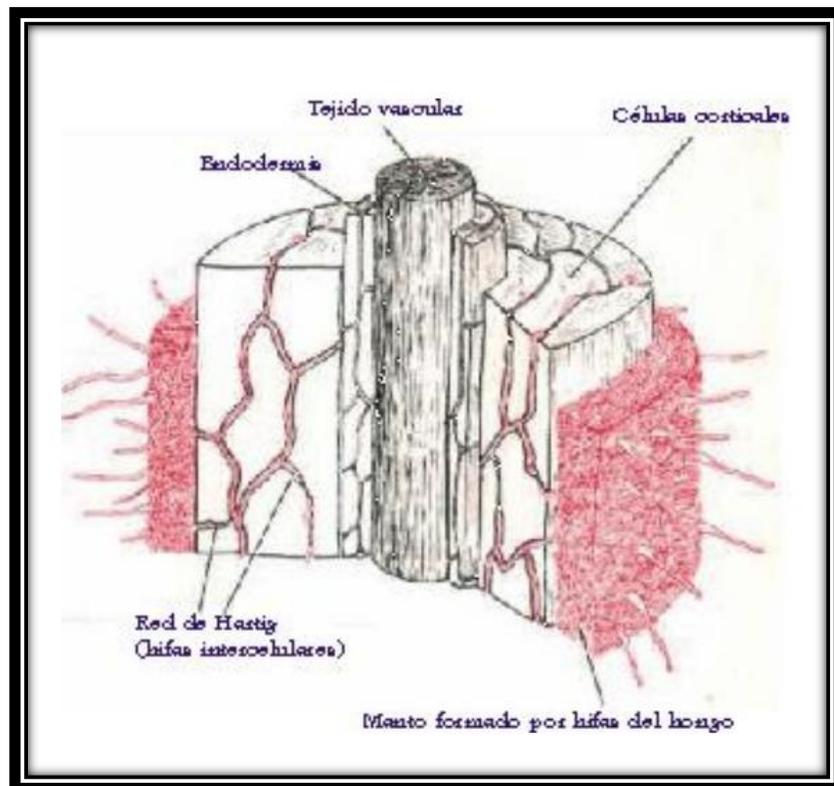


Fig. 1. Colonización de Ectomicorrizas.

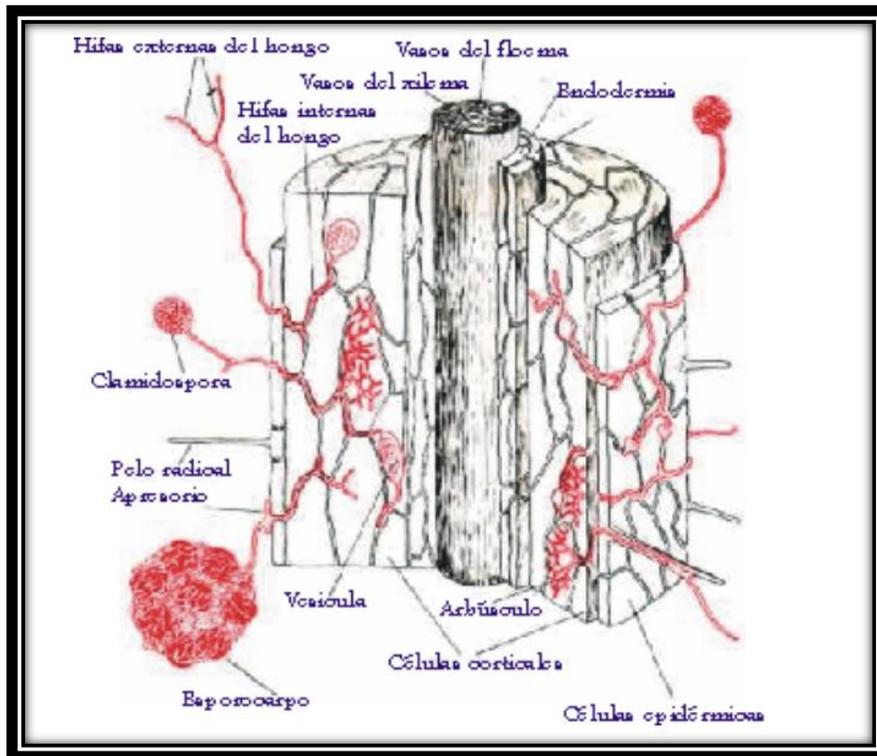


Fig. 2. Colonización de Endomicorizas (Micorrizas vesículo-arbusculares)

2.2.1. Ectomicorizas

Se caracterizan porque desarrollan una espesa capa de micelio sobre la zona cortical de las raíces absorbentes de la planta, las hifas del hongo no penetran en el interior de las células de la raíz, si no que se ubican sobre y entre las separaciones de éstas. Se pueden observar a simple vista (Fig. 1). Este tipo de micorrización predomina entre los árboles de zonas templadas, se produce principalmente sobre especies forestales y leñosas, siendo especialmente característico en hayas, robles, eucaliptus y pinos. Los hongos que la forman son tanto Basidiomycota como Ascomycota.

2.2.2. Endomicorizas

Los hongos que las producen se caracterizan por colonizar intracelularmente el córtex radical o sea que no hay manto externo que pueda verse a simple vista.

Las hifas se introducen inicialmente entre las células de la raíz, pero luego penetran en el interior de éstas, formando vesículas alimenticias y arbusculos (Fig. 2). Por ello este grupo se las conoce también como micorrizas vesículo-arbusculares (MVA), los cuales constituyen la simbiosis más extendida sobre el planeta. Los hongos que la forman pertenecen a la división Glomeromycota y se dan en todo tipo de plantas, aunque predominan en hierbas y gramíneas. Abundan en suelos pobres como los de las praderas y estepas, la alta montaña y las selvas tropicales. En el bosque atlántico aparecen junto a las ectomicorrizas.

2.2.3. Ectendomicorrizas

Presentan características intermedias entre las Ectomicorrizas y las Endomicorrizas, pues presentan manto externo, como las ectomicorrizas, pero también penetran en el interior de las células, como las endomicorrizas y no existen vesículas ni arbusculos. Este grupo se presenta tanto en Basidiomycota como Ascomycota y son más abundantes en angiospermas que en gimnospermas. Su distribución es restringida.

2.3. Micorrizas vesículo-arbusculares.

Las micorrizas vesículo-arbuscular (MVA) son simbiosis mutualistas entre ciertos hongos del Orden Glomales y las raíces de la mayoría de las plantas. Esta simbiosis favorece el crecimiento de las plantas a través de un incremento en la captación de fósforo a partir del suelo. Lógicamente, el hongo también se beneficia de la planta mediante elementos provenientes de la fotosíntesis.

Este tipo de micorriza se encuentra en condiciones naturales en la mayoría de los cultivos tropicales y subtropicales de interés agronómico (Sieverding, 1991).

Las micorrizas vesículo-arbuscular (MVA) constituyen el tipo de simbiosis más ampliamente distribuida en la naturaleza. Se sabe en la actualidad que está presente en el 80% de las plantas, principalmente Angiospermas, así como en Gimnospermas, Briofita y Pteridofitas. Los hongos que forman parte de esta simbiosis son microscópicos a diferencia con los demás hongos formadores de

micorrizas. La principal característica morfológica de estos hongos son los arbusculos, estructuras típicas de la colonización que el hongo desarrolla en el interior de las células de la corteza de la raíz por ramificación dicotómica repetida de sus hifas (Sánchez, 2009).

Las micorrizas vesículo-arbusculares presentan hifas que penetran en la corteza, pueden ser enrolladas o con ramas haustoriales ramificadas dicotómicamente (Gallaud, 1908).

Aunque las micorrizas vesículo-arbusculares están ampliamente distribuidas en la mayoría de las plantas, existen plantas que no están micorrizadas entre estas tenemos: Phytolaccaceae, Caricaceae, Malvaceae y Solanaceae (Janos, 1980).

La antigüedad del origen y presencia de las micorrizas se remonta a hace 460 millones de años, gracias a la cantidad de registros fósiles encontrados, estando presente en familias de plantas que tienen miembros de alta importancia económica tales como las perteneciente a las Familias Poaceae, Fabaceae, Solanaceae y Rosaceae.

Los vegetales que presentan la asociación micorriza vesículo-arbúscular se benefician por el incremento en la toma de nutrientes como, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, cobre, molibdeno, hierro y manganeso, pues el hongo funciona como una extensión del sistema radical de la planta, facilitando a través de su red de hifas una mayor absorción de éstos en el suelo. En esta asociación el componente fúngico de la simbiosis se nutre de los carbohidratos almacenados en las células mesodérmicas en formas sencillas de fructosa, glucosa y sacarosa y de los exudados radicales de las plantas (Read, 1999).

2.4. Características generales de los Hongos Micorrízicos arbusculares (HMA).

A los Hongos Micorrízicos arbusculares se los conoce también como endomicorriza y esto se debe a que el hongo se desarrolla en el interior de la raíz de la planta hospedera y forma estructuras intracelulares.

2.4.1. Ciclo de vida

Durante su ciclo de vida estos hongos producen esporas (Fig. 3), las cuales germinan para formar un micelio vegetativo que al contactar la superficie de la raíz se modifica (Fig 4), en una protuberancia similar a una ventosa (apresorio) (Fig. 5), de donde surge la hifa que inicia la infección de los tejidos de la raíz. Posteriormente se forman hifas inter e intracelularmente en las células corticales, que se van ramificando paulatinamente para introducir los carbohidratos procedentes de la planta y dan el aspecto de diminutos arboles llamados arbusculos (Fig 6).

En algunos casos las hifas se hinchan y forman vesículas ovoides que contienen lípidos o sustancias de reserva (en el suborden Glomineae). Por lo anterior en ocasiones se habla de micorriza Vesícula-arbuscular. Los tejidos de la raíz colonizados por el hongo son los más externos: la epidermis y las células corticales, mientras que los meristemos y los tejidos vasculares son resistentes a la infección micorrízica (Fig. 7).

Estos hongos se han especializado en introducirse en las células corticales de la planta y en formar estructuras singulares para poder llevar a cabo su metabolismo; pero también fuera de la planta, otras hifas se ramifican en el interior del suelo (fase extraradical) (Fig. 8), explorando y adquiriendo nutrientes como fósforo y nitrógeno principalmente, así como algunos micronutrientes que son llevados como un tributo a la planta huésped, para su nutrición mineral (Reyes, 2002).



Fig. 3. Germinación de una Espora.



Fig. 4. Reconocimiento del anfitrión y el crecimiento pre-simbiótico en la proximidad de una raíz.



Fig. 5. Formación de apresorios en la epidermis de la raíz y la colonización de la corteza de la raíz.



Fig. 6. Arbúsculos en el interior de las células corticales de la raíz.



Fig. 7. Detalle de una hifa intracelular.



Fig. 8. Micelio extraradical y formación de las siguientes generaciones de esporas.

2.4.2. Estructuras de los hongos micorrízicos arbusculares

La descripción morfológica de estos hongos es de suma importancia al momento de investigar las diferentes especies existentes en la naturaleza.

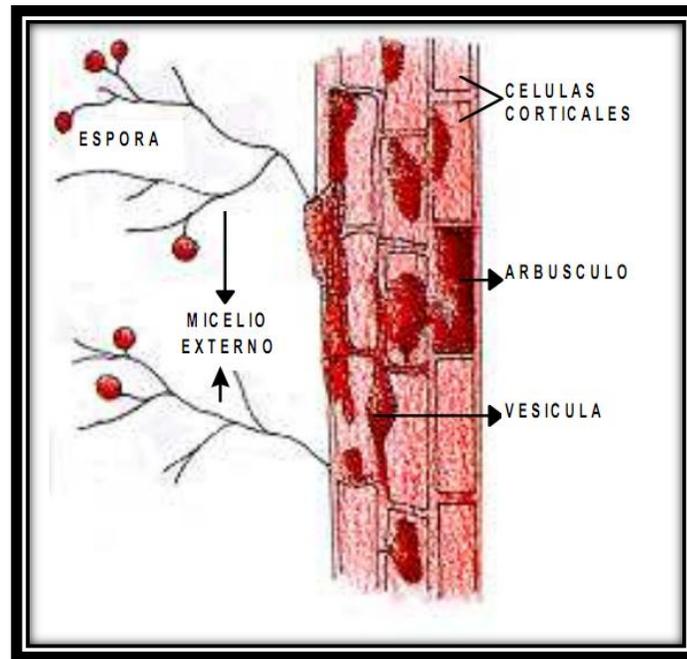


Fig. 9. Corteza de la raíz – Estructura morfológica de los HMA. Adaptado de Sieverding. Aspectos Básicos de Investigación de los Hongos Micorrízicosvesículos-arbusculares (MVA).

Las estructuras del mico-simbionte que se extienden dentro de la raíz de la planta hospedadora y en el sustrato circundante, son características de cada tipo de micorriza y sirven para su diferenciación (Allen 1991) (Fig. 9).

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

Arbúsculos: los HMA al ponerse en contacto con la raíz forman una estructura sobre las células epidérmicas vegetales conocida como “apresorio” y a partir de este cuerpo se producen las hifas que son filamentos tubulares, que penetran la epidermis radicular hasta llegar a la endodermis sin atravesarla, allí comienza su

ramificación para formar los arbuscúlos, que tienen un tamaño comparable al de las mitocondrias y su vida aproximada es de 1 a 3 semanas, después de lo cual se colapsa y parte de él se reabsorbe hacia el citoplasma hifal y el resto de componentes permanecen en la célula hospedera, rodeados por el plasmalema (Escobar, 1998).

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

Coils: circunvoluciones de hifas intracelulares, implicadas en la absorción inicial de compuestos carbonados por parte del hongo (Smith & Smith 1997).

Células auxiliares: son estructuras cilíndricas y espinosas, las cuales se forman en hifas gruesas, alrededor de las raíces, son abundantes durante la colonización temprana y luego estas disminuyen cuando la esporulación aumenta (<http://invam.caf.wvu.edu>).

Micelio intracelular: conjunto de hifas que crecen dentro de la pared de las células de la raíz (Castillo, 2009)

Micelio externo o extramátrico: componente importante en la simbiosis, formado por las hifas principales, gruesos y ramificados dicotómicamente, así como por hifas también ramificadas, siendo las encargadas de la absorción del fósforo y otros nutrientes de lugares donde las raíces no pueden acceder por si mismas. Pero cuando el sustrato se agota el citoplasma de las hifas finas se retrae hacia la hifa principal donde se forman septos. Este fenómeno puede ser un indicador de deficiente aireación y/o agotamiento de nutrientes del suelo, entre otros (Escobar, 1998).

Esporas: se forman sobre el micelio extramátrico y son órganos de conservación sexual o asexual de las MVA. Formadas en el extremo o no de una hifa, con características propias que constituyen la única estructura externa que puede

permitir el reconocimiento morfológico de las especies de las Micorrizas Vesícula Arbúscular. Las esporas se dividen en dos grupos: las Clamidosporas (Fig. 11) que son células especializadas formadas de manera asexual y que agrupa a los géneros *Glomus* y *Sclerocystis*. Y las azigosporas que son esporas formadas sexualmente y que agrupa a los tres géneros: *Gigaspora* *Acaulospora* y *Entrophospora* (Escobar, 1998) (Fig. 10).

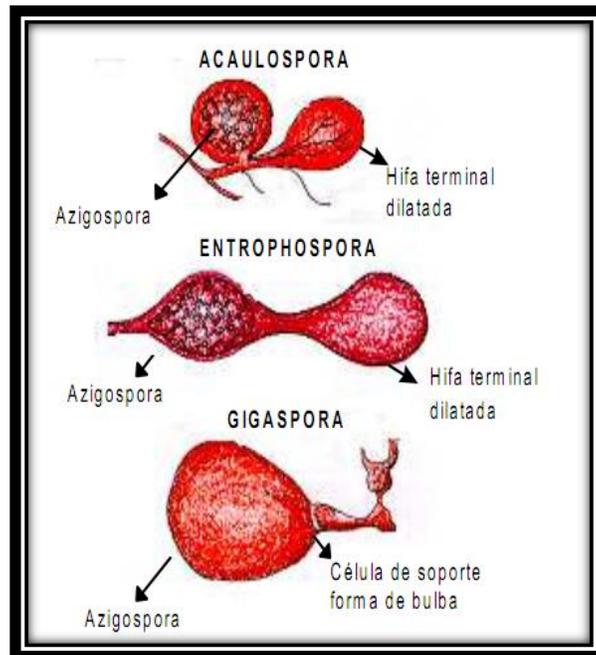


Fig. 10. Géneros de las familias Acaulosporaceae y Gigasporaceae que forman azigosporas.
Adaptado de Sieverding. Aspectos de la Taxonomía de las MVA.

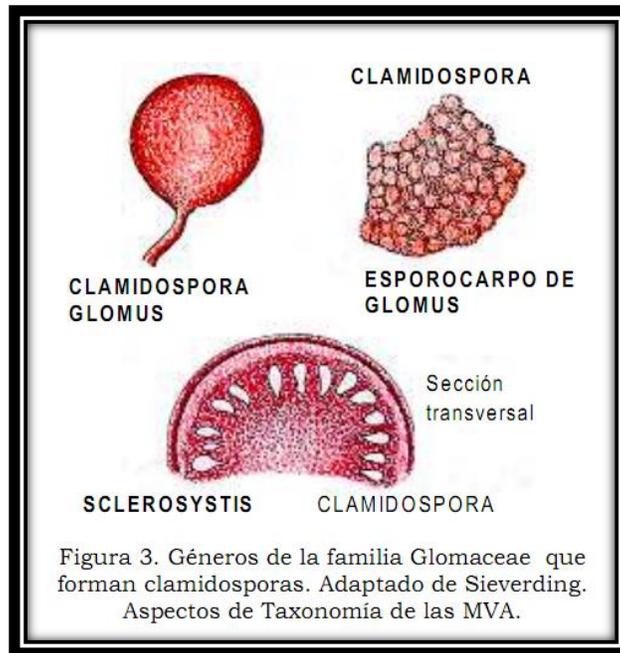


Figura 3. Géneros de la familia Glomaceae que forman clamidosporas. Adaptado de Sieverding. Aspectos de Taxonomía de las MVA.

Fig. 11. Géneros de la familia Glomaceae que forman clamidosporas. Adaptado de Sieverding. Aspectos de Taxonomía de las MVA.

2.5. Etapas en el establecimiento de las micorrizas

El establecimiento de la simbiosis micorrízica va a depender de las interacciones entre los tres componentes más importantes del sistema: el hongo, las plantas y las condiciones ambientales. Su presencia puede implicar que ocurran procesos de reconocimiento entre los simbiosites, compatibilidad y especificidad, los cuales condicionan su expresión y conducen a la integración morfológica y funcional de las asociaciones (Sánchez, 1999).

De acuerdo con Guerrero, (1986), y en concordancia con Sánchez, (1999), en el proceso de la formación de la simbiosis se pueden distinguir diferentes fases: precolonización, penetración inicial del hongo, colonización extraradical y desarrollo del micelio externo y de las estructuras reproductivas. Aparentemente los modelos de penetración y colonización del hongo son independientes no solo del hospedero si no también del tejido a colonizar.

2.5.1. Etapas de la simbiosis

En el proceso de establecimiento de una relación simbiótica micorriza vesículo-arbuscular. Pueden diferenciarse cuatro etapas:

2.5.1.1. Primera etapa o de precolonización

Las raíces de las plantas susceptibles son infectadas con M.V.A., siempre y cuando esté presente una estructura infectiva del hongo, que luego entra en contacto con los pelos absorbentes de las raíces. Se consideran órganos o unidades infectivas: las esporas y otras estructuras del hongo u otra raíz ya infectada. Bajo condiciones favorables la infección puede ocurrir en un tiempo de 2 a 3 días (Sieverding, 1989).

2.5.1.2. Segunda etapa o de colonización y distribución

Una vez el hongo ha infectado la raíz, se distribuye en ella, creciendo intercelular e intracelularmente infectando toda la corteza de la raíz. Entrando a conformar el micelio interno, arbusculos y vesículas. La duración del proceso de infestación depende del ambiente, de la especie vegetal y por su puesto del hongo, tardando desde 10 días hasta varias semanas (Sieverding, 1989).

2.5.1.3. Tercera etapa o de estabilización o efectividad

Simultáneamente a la formación de estructuras internas, el hongo forma el micelio externo, órgano a través del cual el hongo absorbe los nutrientes y los transporta a la raíz de la planta, en este momento es cuando la simbiosis empieza a funcionar en forma benéfica para la planta (Sieverding, 1989).

2.5.1.4. Cuarta etapa o de reproducción

De 1-4 meses después de la tercera etapa, el hongo empieza a reproducirse formando esporas asexuales en el micelio externo. Las esporas son órganos de reproducción del hongo, que puede perdurar latentes por largos tiempos en el suelo, especialmente en épocas que no hay hospedero a su alcance (Sieverding, 1989).

2.6. Taxonomía de los hongos micorrízicos arbusculares

Los hongos micorrízicos arbusculares se encuentran presentes en un mayor número de especies vegetales que los otros tipos de micorrizas juntas y se ha logrado observar en más de 1000 géneros de plantas que representan alrededor de unas 200 Familias. Se calcula que cerca del 90% de las 300000 especies de plantas vasculares en el mundo forman micorriza arbuscular (Marx & Cordell, 1989). La especificidad entre la planta y el hongo tiene muy poca evidencia (Smith & Read, 1997), aún cuando se ha demostrado especificidad ecológica y compatibilidad funcional (Molina et al; Clapp *et al.*, 1995 Klironomo, 2000).

Los estudios de taxonomía de micorrizas iniciaron en 1809 con Link quien los reconoce como hongos hipógeos o epigeos del orden endogonales, género zigomicotina por ser productores de zigosporas, clamidosporas no sexuales o esporangios. La taxonomía de micorrizas ha ido variando acorde los últimos descubrimientos de la tecnología moderna, es así que, basados en estudios moleculares, morfológicos y ecológicos, remueven a la micorrizas de Zigomicotina a un nuevo phylum: Glomeromycota, con tres nuevos órdenes: Archaeosporales, Paraglomerales y Diversisporales (Paillacho, 2010)

La taxonomía de los hongos formadores de micorriza arbuscular es bastante joven. Thaxder (1992) elaboró una monografía de la familia Endogonaceae, pero no fue sino hasta 1974 que Gerdemann y Trappe inician el estudio formal de la taxonomía de estos hongos y hacen una revisión de la familia Endogonaceae a la que ubican en el orden Mucorales de la clase Zygomycetes. En esta revisión presentaron a los géneros *Endogone*, *Glomus*, *Modicella* y *Sclerocystis* y describieron a los géneros *Acaulospora* y *Gigaspora*. El género *Endogone* actualmente se encuentra ubicado en el orden Endogonales, y *Modicella* fue transferido a la Clase Ascomycetes. Ames y Scheider, (1979) encontraron esporas que coincidían con la descripción de *Glomus infrequens*, sin embargo, estas esporas se formaban inicialmente dentro de la hifa de un sáculo esporífero semejante al de *Acaulospora* por lo que consideraron que correspondía a un nuevo género: *Entrophospora*. Posteriormente, Walker y Sanders (1986) segregan

del género *Gigaspora* a *Scutellospora* basándose en el modo de germinación y las características de la pared de las esporas.

Según Morton, (1990), Morton y Benny, (1990), durante muchos años los hongos formadores de micorrizas arbusculares se ubicaron en el orden Endogonales junto al género no micorrízico *Endogone*. Sin embargo, la luz de las consideraciones filogenéticas, se estableció que su condición simbiótica constituía criterios suficientes para agruparlos en un taxón particular, lo cual dio origen al orden Glomales y a un re-arreglo de familias. Clasificaron a los hongos micorrízicos en la división Eumycota, clase Zygomycetes, orden Glomales, suborden Glominaeae y Gigasporaceae con las siguientes familias y sus géneros respectivos:

- **Glomaceae** (*Glomus*, *Sclerocystis*)
- **Acaulosporaceae** (*Acaulospora* y *Entrophospora*)
- **Gigasporaceae** (*Gigaspora* y *Scutellospora*)
- **Archaeosporaceae** (*Archaeospora*)
- **Paraglomaceae** (*Paraglomus*)

A nivel de géneros, la taxonomía de estos hongos se fundamenta en características tales como formación y morfología de las esporas, modo de germinación y morfología del esporocarpio. Otros caracteres, como apariencia de las esporas (color, contenido, grosor de la pared, ornamentación y tipo de conexión entre las hifas), murografías (diagramas que ilustran la estructura de la pared de la espóra y anatomía de la infección del hongo), se usan para la taxonomía a niveles de especies (no rutinaria entre los taxónomos), (Schenck y Pérez, 1990).

De otro lado, los caracteres morfológicos son a veces difíciles de distinguir, lo cual hace complicado el manejo de claves, por demás complejas. La morfología de algunas esporas M.A es muy similar, por lo que en ocasiones puede ser muy difícil distinguir una especie de otra (Azcon y Guerrero, 1996).

Dos nuevos ancestros de hongos formadores de micorrizas arbusculares fueron descubiertos a partir de la secuencia de ADN ribosomal. Son dos nuevas familias:

Archaeosporaceae, la cual contiene dos géneros con tres especies formadoras de esporas semejantes al género *Acaulospora*, se encontró que dos de las especies son dimorfitas; y la familia Paraglomaceae, la cual contiene el género *Paraglomus* con dos especies formadoras de esporas diferentes a las del género *Glomus*. Ambas especies fueron identificadas desde medios de cultivos con suelos y fragmentos de raíces de hierbas y secuenciales cultivos de sorgo (Fig. 12). Estas especies son formadoras de arbusculos en medios de cultivos con trigo (Morton & Redecker, 2001).

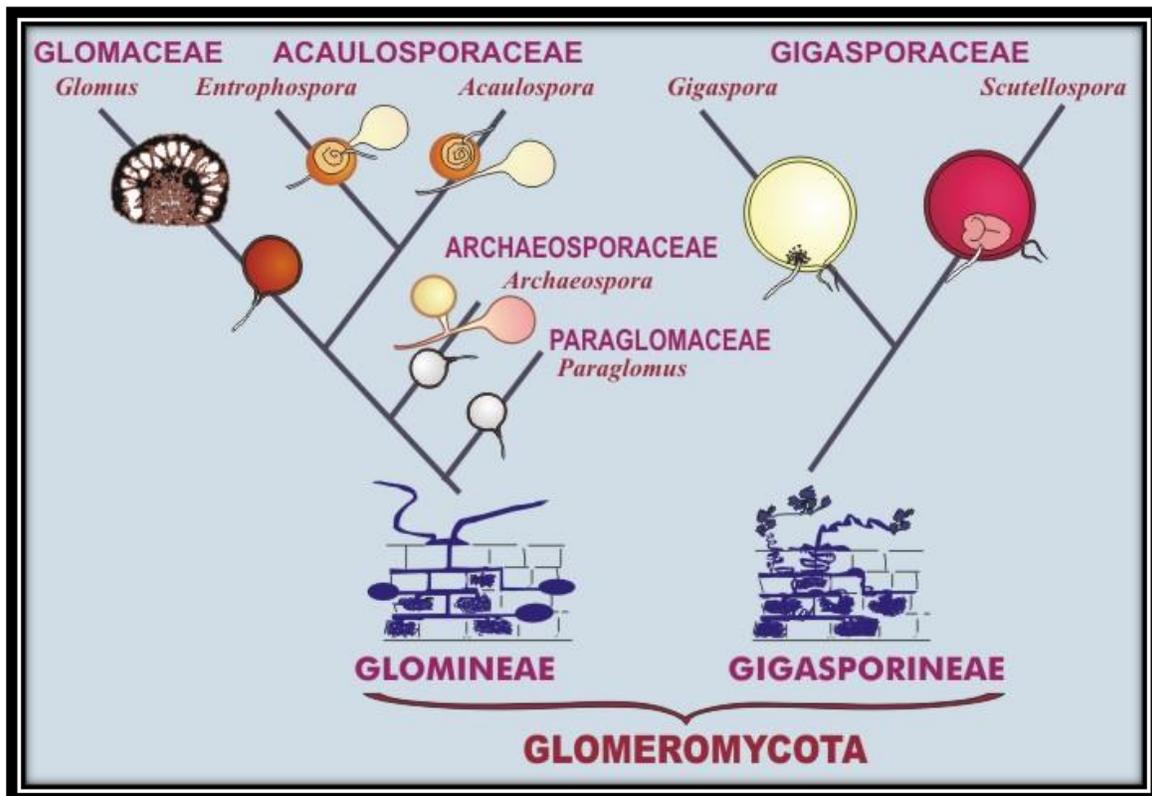


Fig. 12. Clasificación taxonómica propuesta por Morton y Redecker.

Relaciones filogenéticas en el orden *Glomales*, según Morton y Redecker (2000).

2.6.1. Glomeromycota

Se trata de un grupo que reúne a unas 200 especies de hongos, basal dentro del cladomonofilético de hongos más derivados, y similar morfológicamente al orden Glomales (Zigomycota). El número de especies podría ser muy superior al

supuesto hasta ahora, pues el número de haplotipos (genotipos distintos, no reconocible a nivel fenotípico) parece ser muy elevado. Fueron tradicionalmente considerados como pertenecientes a la división Zigomycota por presentar talos sifonales. También han sido considerados próximos a Chytridiomycota (a los que parecen ser más próximos) por la presencia de β -tubulina.

Son todos hongos simbioses obligados, formadores de endomicorrizas vesículo-arbusculares. De hecho la mayor parte del talo de estas especies se encuentra formando vesículas ramificadas dentro de las células radiculares del hospedante. Estas endomicorrizas son de gran importancia ecológica e industrial. Aportan fósforo (P) y nitrógeno (N) que fijan de la atmósfera (N₂) a las plantas, por lo que incrementan notablemente su productividad. Pueden ser utilizados en repoblaciones forestales o cultivos. Pueden establecer relaciones con cerca del 90% de las plantas vasculares.

Son formadores de clamidosporas, pero no hay evidencia de reproducción sexual ni presentan zigósporas. Las clamidosporas se forman por gemación en micelios que quedan rodeados por una gruesa pared celular, dando lugar a esporas aisladas o agregadas en esporocarpos. Presentan una pared sencilla pero con varias capas superpuestas. Pueden ser externas o aparecer en el interior de las células radiculares del hospedante.

Las esporas aparecen por gemación y permanecen adheridas a la hifa, lo cual es un carácter simple siomórfico (ocurre en varios linajes). Además estos hongos son capaces de colonizar por medio de reproducción vegetativa; fragmentación de micelios. Además puede producirse anastomosis (micelios distintos quedan unidos formando un cenobio).

2.6.2. Clasificación taxonómica de los HMA (Morton & Benny, 1992)

Cada uno de los géneros formadores de hongos micorrízicos arbusculares está definido por criterios relacionados con la forma en que se origina las esporas; es decir cada uno de ellos tiene una formación especial de esporas, además de que

presentan diferente morfología en los puntos de unión de las hifas sustentoras o formadoras (Schenck y Pérez 1990).

Morton y Benny en 1990 separaron del orden Mucorales a los hongos que no producían cigosporas y que potencialmente formaban micorriza arbuscular, creando el orden Glomales. Dentro de este orden, separaron dos subórdenes, el suborden Glomineae que agrupa a los hongos que forman células auxiliares en el exterior de las raíces del fitobionte y el suborden Gigasporineae en donde incluyeron a aquellos hongos que no forman dichas estructuras (Fig. 13), pero sin embargo que forman células auxiliares al exterior de las raíces. En esta investigación los investigadores colocan a la familia Gigasporaceae dentro del suborden Gigasporineae y a las familias Acaulosporaceae y Glomaceae en el suborden Glomineae.

Clase	Orden	Subórdenes	Familias	Géneros
Zygomycetes	Glomales	Glomineae	Glomaceae	<i>Glomus</i>
				<i>Sclerocystis</i>
			Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>
				<i>Entrophospora</i>
		Gigasporinae	Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i>
				<i>Scutellospora</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica de los HMA (Morton y Benny, 1992).

La identificación de las especies ha estado basada en el estudio de las esporas en función de su pared y grupos o capas que la conforman (Walker, 1983). Por lo anterior se diseñó una serie de representaciones esquemáticas (Murógrafos y Murónimos) (Fig. 14) señalando las posibles características de las paredes (Walker, 1992).

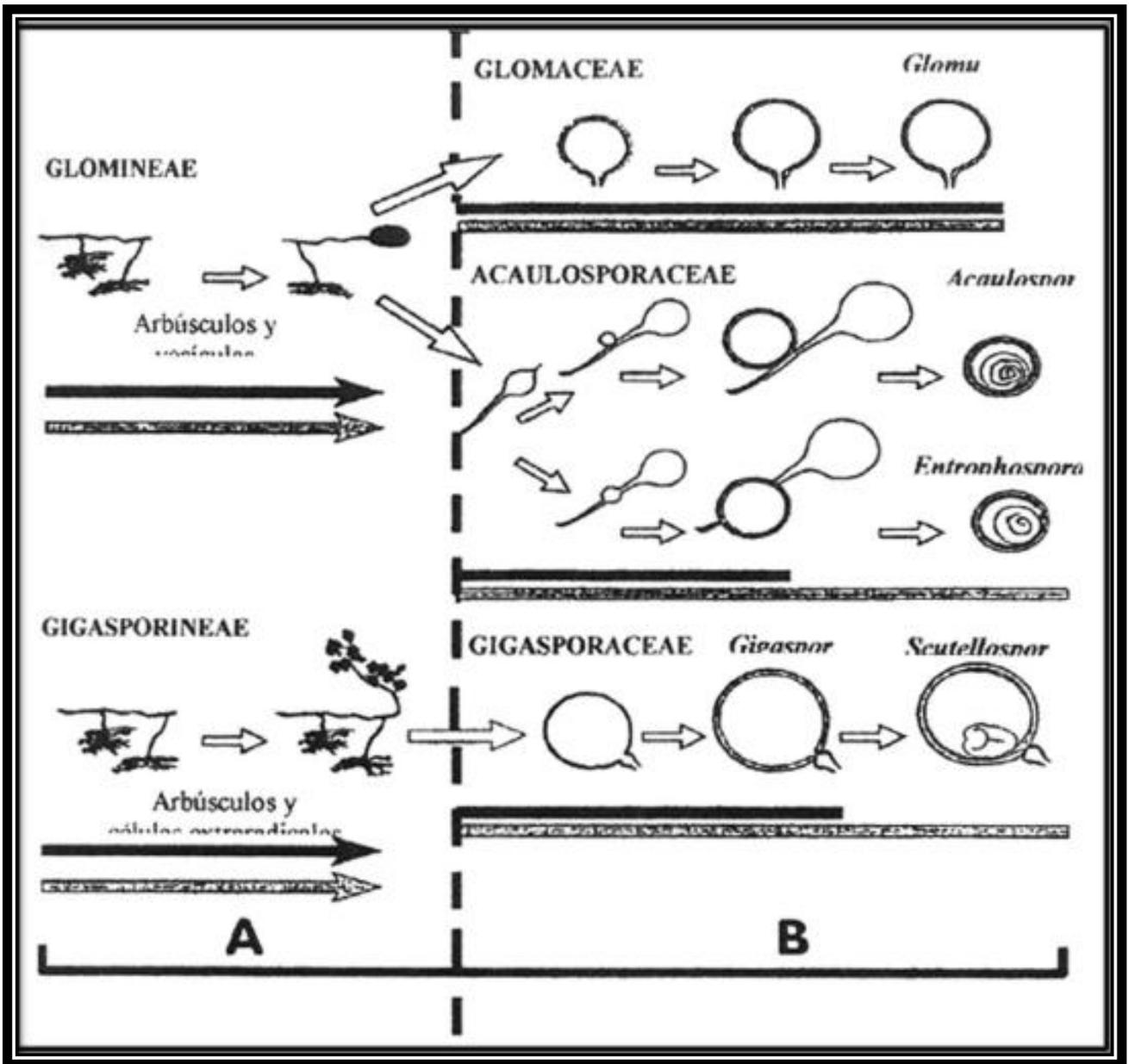


Fig. 13. Grupos taxonómicos en los Glomales, Zigomicetos con base en el crecimiento y diferenciación de sus partes en un organismo fúngico (Morton y Bentinvenga, 1994).

TIPOS DE CAPAS DE LAS PAREDES MURÓGRAFO	MURÓNIMO
1. Unitaria Pared rígida	U
2. Laminada Formada por varias láminas	L
3. Evanesciente Desaparece en esporas maduras	E
4. Membranosa Pared delgada	M
5. Pericial Formada por micelio que rodea la espora	P
6. Coriacea Pared gruesa rígida	C
7. Amorfa Pared más interna y flexible (Melzer)	A
8. Expandible Externa y se expande en líquidos de montaje	X
9. Germinal En <i>Gigaspora</i> , previo a la germinación	G

Fig. 14. Representación esquemática de las diferentes capas que conforman la pared de las esporas de hongos micorrízicos arbusculares.

2.6.3. Clasificación taxonómica de los HMA (Morton & Redecker, 2001)

Estudios posteriores en taxonomía de las especies de hongos micorrízicos arbusculares realizados por Morton y Redecker (2001) basados principalmente en el análisis del fragmento 18S del DNAr parecen mostrar la existencia de dos clados ancestrales de hongos micorrízicos arbusculares filogenéticamente distintos, que clasificaron como dos nuevas familias, Archaeosporaceae y Paraglomaceae.

Actualmente la Biología molecular puede presentar una vía alternativa viable en la identificación de las especies de los hongos formadoras de este tipo de micorriza, así como en la identificación de las moléculas orgánicas que intervienen en la estimulación e inhibición de la germinación de esporas y establecimientos de los hongos micorrízicos arbusculares en la planta hospedante (Bago *et al.*, 2000).

Recientemente, con base en los avances en lo que se refiere a técnicas moleculares y relacionándolas con las características morfológicas de las esporas, se han realizado cambios significativos en la taxonomía de los hongos formadores de la asociación simbiótico micorriza-arbuscular. El uso de nuevas técnicas que involucran la secuenciación del ADN, las determinaciones de perfiles de ácidos grasos, reacciones inmunológicas hacia anticuerpos monoclonales específicos y junto con la caracterización morfológica de las esporas y hábitos de colonización de los HMA han permitido tener avances sustanciales en la taxonomía de estos hongos (Morton y Redecker, 2001). En este sentido, las técnicas moleculares, con base en el estudio del ADN, han revelado que el grupo de hongos formadores de micorrizas arbuscular puede ser más diverso de lo que actualmente se piensa y cuya clasificación taxonómica, puede ser diferente eliminando al género *Sclerocystis* y fusionándolo en el género *Glomus*.

Clase	Orden	Subórdenes	Familias	Géneros
Zygomycetes	Glomales	Glomineae	Glomaceae	<i>Glomus</i>
			Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>
				<i>Entrophospora</i>
			Paraglomaceae	<i>Paraglomus</i>
		Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i>	
		Gigasporineae	Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i>
				<i>Scutellospora</i>

Tabla 2. Clasificación taxonomica de los HMA (Morton y Redecker, 2001).

Esta clasificación trata de describir la ruta filogenética de los HMA, las nuevas familias comprenden especies que presentaban características morfológicas atípicas a los géneros en los que estaban ubicados. La familia Archaeosporaceae incluye tres especies que forman esporas atípicas a la *Acaulospora* y dos de ellas son dimórficas y forman esporas de tipo Glomoide (Morton y Redecker, 2011).

Por otra parte la familia Paraglomaceae incluye dos especies formadoras de esporas que no son distinguibles con aquellas especies del género *Glomus* y su creación se basa en características de hábito de colonización y su morfología es muy similar a los miembros de la familia Archaeosporaceae. La descripción de esta familia se basa en características moleculares (ácidos grasos y la secuencia del ADNr 18S), lo que permite considerarla como un grupo ancestral de los Glomales y son distantes de otra familias de los Glomales (Morton y Redecker, 2001).

2.6.4. Reciente clasificación de los hongos formadores de micorriza arbuscular (Schüessler *et al.*, 2001)

Recientemente se ha reconocido un nuevo phylum denominado Glomerimycota, en el cual han sido ubicados los HMA. Sin embargo debemos considerar que esta clasificación aún se encuentra en estudio. (Schüelssler *et al.*, 2001).

Phylum	Orden	Familias	Géneros
Glomeromycota	Glomerales	Glomaceae	<i>Glomus</i>
	Paraglomerales	Paraglomaceae	<i>Paraglomus</i>
	Archaeosporales	Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i>
	Diversisporales	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>
		Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i>
		Diversisporaceae	

Tabla 3. Reciente clasificación de los hongos formadores de micorriza arbuscular (Schüessler *et al.*, 2001).

La última familia en la tabla es aún inédita por que no sabe que géneros se ubicarán dentro de la misma.

Schüessler *et al.*, (2001), basándose en características moleculares, morfológicas y ecológicas separan a los hongos micorrízicos arbusculares y al hongo endocitobiótico *Geosiphon pyriforme* del phylum Zygomycota y los ubican en un nuevo phylum: Glomeromycota. En este mismo trabajo y apoyándose en el código de nomenclatura botánica corrigen los nombres de los órdenes Glomales y Paraglomales modificándolos por Glomerales y Paraglomerales respectivamente. En el primer orden incluyen a la familia Glomeraceae con el género *Glomus*. En el segundo, ubican a la familia Paraglomeraceae con el género *Paraglomus*. En el orden Archaeosporales incluyen a las familias Archaeosporaceae y Geosiphonaceae. La primera familia con el género *Archaeospora* y la segunda con *Geosiphon pyriforme* que es un hongo que se asocia con la cianobacteria *Nostoc* y por lo tanto no forma micorriza arbuscular. Proponen otro nuevo orden llamado

Diversisporales con las familias Diversisporaceae, Acaulosporaceae y Gigasporaceae. En la familia Diversisporaceae colocan a *Glomus spurgum*, *G. etunicatum* y *G. versiforme*. En Acaulosporaceae a *Acaulospora* y *Entrospora* y en Gigasporaceae a *Gigaspora* y *Scutellospora*. Sin embargo a pesar que esta nueva clasificación resuelve algunos problemas taxonómicos todavía deja otros por resolver, ya que de acuerdo con el código de nomenclatura botánica no puede ubicarse un mismo género en dos familias diferentes por lo que las especies de la familia Diversisporaceae deben asignarse a un género nuevo. Por otra parte esta familia solo puede diferenciarse de la familia Glomeraceae por la secuencia génica del fragmento 18S RNAr (Fig. 15).

El phylum Glomeromycota incluye más de 150 especies muchas de las cuales son sinónimos. Las especies de hongos micorrízicos arbusculares tradicionalmente se han identificado usando características morfológicas de espora asexuales, siendo la estructura de la pared, tamaño, color ornamentación, hifa de sostén y modo de oclusión de esta hifa con la espora los principales criterios usados para la delimitación de especies. Estas características presentan poca variación lo que dificulta enormemente la identificación de estos hongos. Actualmente se sabe que la biología molecular es una herramienta muy útil para resolver problemas taxonómicos, sin embargo, consideramos que no se debe ser el único criterio que permita la diferenciación de especies ya que esto complicaría aún más el estudio taxonómico de estos hongos.

2.6.4.1. Glomerales

Hongos hipogeos en su mayoría, a veces epigeos, forman endomicorrizas con micorrizas simbióticas ya sea como esporas, vesículas o arbusculos en las plantas hospederas, las hifas del micelio vegetativo en su mayoría no se encuentran septadas, en las hifas mayores el citoplasma se retira o corta para formar esporas, la reproducción es asexual por medio de clamidosporas, pudiendo ser terminal y a veces intercalar. Las esporas se encuentran solitarias, formando grupos o en esporocarpos, presenta la secuencia de la fracción 18S del RNAr YTRRY/2-5/RYYARGTYGNCARCTTCTTAGAGGGACTATCGGIGTYTAACCGRTGG (los

nucleótidos subrayados son específicos para este taxón), dentro de este orden Schüessler *et al.*, (2001), ubica a la familia Glomeraceae con el género *Glomus*.

En todas las especies de *Glomus*, las esporas germinan a través del lumen de la hifa de sostén, pero en algunos el tubo de germinación puede emerger también directamente de la pared de la espora. La micorriza formada por las especies de esta familia se tiñe fuertemente con azul de tripano, fucsina ácida y negro de clorazol.

2.6.4.2. Paraglomerales

Presentan la secuencia de la fracción 18S de RNAr GCGAAGCGTCATGGCCTTAACGGCCGT (los nucleótidos subrayados son específicos para este taxón) (Schüessler *et al.*, 2001). La familia Paraglomeraceae ubicada en este orden incluye al género *Paraglomus*. Las esporas formadas por este género no pueden distinguirse morfológicamente de las formadas por *Glomus*. La única diferencia morfológica de las especies de esta familia y las del género *Glomus* se presenta en las características de la colonización, ya que el *Paraglomus* no se ha observado la formación de vesículas y la tinción es débil en las estructuras intraradicales.

2.6.4.3. Archaeosporales

De acuerdo Schüessler *et al.*, (2001) este orden se caracteriza por presentar la secuencia génica del fragmento 18S del RNAr YCTATCYKYCTGGTGAKRCG (los nucleótidos subrayados son específicos para este taxón). Este orden está formado por la familia Archaeosporaceae que comprende el género *Archaeospora*. Este género se caracteriza por formar esporas monomórficas o dimórficas, cuando son monomórficas solo se forman esporas acaulosporoides. Cuando son dimórficas, se forman tantas esporas acaulosporoides formadas por *Archaeosporas* se distinguen por las formadas por el género *Acaulospora* por la presencia de una capa parental interna gruesa flexible y la ausencia tanto de la pared interna delgada flexible como de la placa de germinación característica de *Acaulospora*.

La germinación de las esporas se lleva a cabo de la misma manera que en el género *Glomus*.

2.6.4.4. Diversisporales

Este orden incluye a las familias Diversisporaceae, Acaulosporaceae y Gigasporaceae. La secuencia del fragmento 18S del RNAr GTYARDYHMHYY/2-4/GRADRKKYGCRCAC distingue este orden Schüessler *et al.*, (2001). Los hongos de la familia Acaulosporaceae se caracterizan por formar sus esporas en hifas de sostén que terminan en un sáculo globoso. Las esporas en *Acaulosporas* se forman lateralmente sobre la hifa de sostén, mientras que las esporas de *Entrophospora* se forman dentro de la hifa de sostén. La germinación de las esporas se lleva a cabo a través de una placa de germinación flexible que se forma sobre la superficie de la pared más interna de la espora. La placa de germinación es difícil de observar excepto en esporas viejas cuyo contenido esté plasmolizado.

La familia Gigasporaceae se caracteriza por la formación de sus esporas en una hifa de sostén bulboso y esta constituida por los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*. Estos géneros se diferencian por la composición de la pared y el modo de germinación. La pared de las esporas de *Gigaspora* está constituida por un solo grupo de capas que no se separan al romperse la espora; el tubo de germinación sale directamente de la pared; las células auxiliares que forman las especies del género *Gigaspora* son equinuladas. El género *Scutellospora* la pared de las esporas está formada por al menos dos grupos de capas que se separan al romperse la espora y el tubo de germinación sale de una estructura especial llamada escudo de geminación. Las células auxiliares son nudosas.

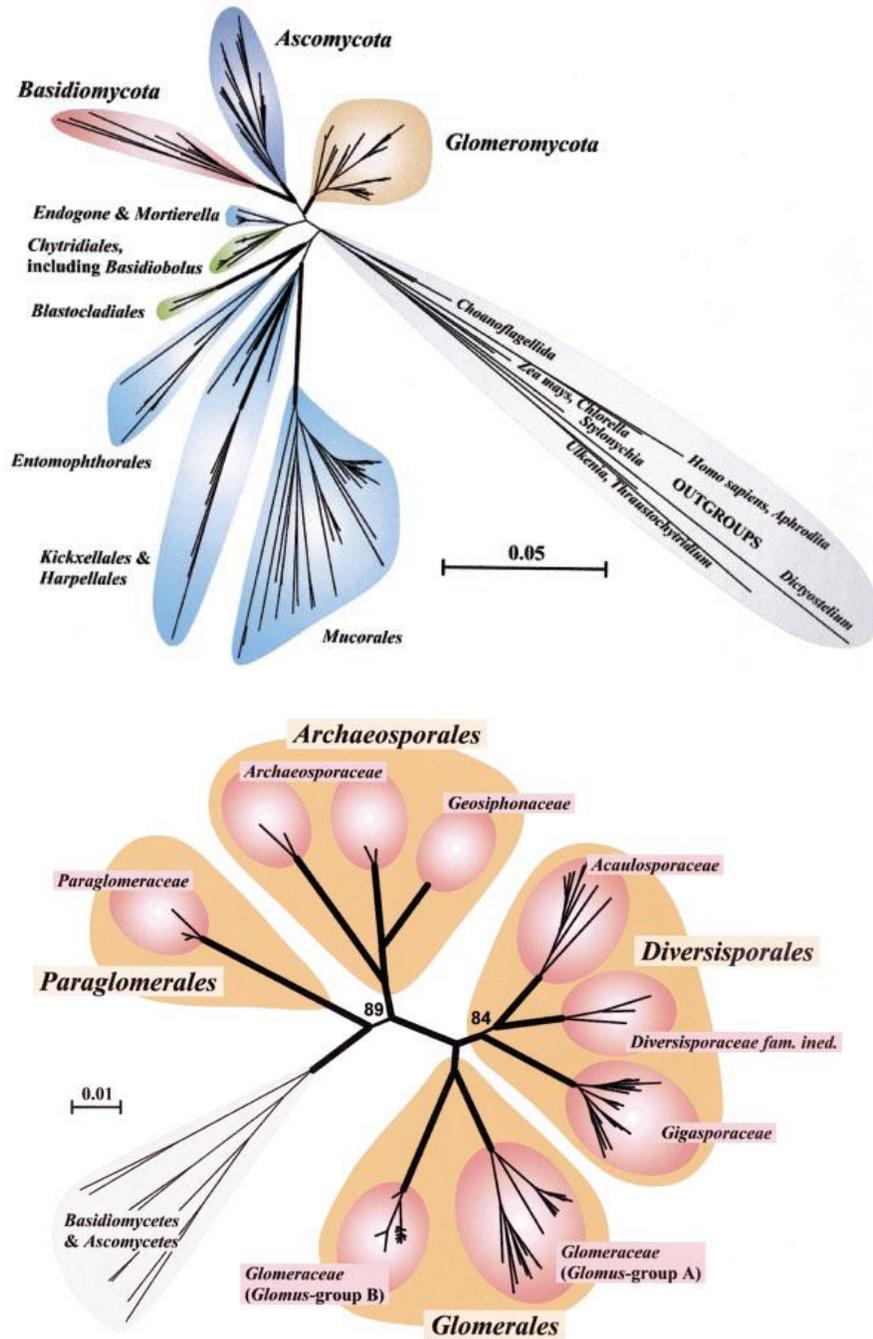


Fig. 15. Últimas revisiones de la clasificación de los hongos formadores de micorrizas arbusculares. (a) Relaciones filogenéticas del phylum *Glomeromycota* respecto de otros grupos de hongos. (b) Relaciones filogenéticas en el phylum *Glomeromycota* basadas en las secuencias de la subunidad pequeña del ARNr (SSU, 18S) (basado en Schüßler et al. 2001, revisado por Walker y Schüßler 2004).

2.6.5. Principales géneros de hongos micorrízicos arbusculares.

Glomus: Las hifas fúngicas se diferencian dando lugar a los arbusculos, formaciones dicotómicas con apariencia de un pequeño árbol, con troncos cilíndricos, los cuales se afilan hacia las extremidades, las vesículas, son generalmente de paredes delgadas y elipsoides. Las hifas que son constituidas superficialmente en la raíz son las hifas supraradical, las hifas que se extienden de manera radial alrededor de la raíz hospedera son hifas extraradicales pues dan al suelo estabilidad física, química y biológica, los puntos de entrada que es el lugar origen de donde parte una hifa para colonizar la célula, tras la formación de un apresorio el hongo penetra en la raíz y se extiende en la misma, estos se encuentran en la superficie de la raíz, generalmente, la colonización más vieja consta de una hifa principal y presenta abundantes vesículas, la tinción con azul de metileno es muy intensa, descrita por (Tulasne y Tulasne, 1845).

Paraglomus: El desarrollo de las esporas procede exactamente igual que en *Glomus*, por la expansión blástica de una punta de las hifas, por lo general la materia orgánica se acumula en la superficie de la espora, no hay reacción en el reactivo de Melzer, descrita por (Morton y Redecker, 2000).

Acaulospora y Entrophospora: Estos dos géneros se caracterizan por presentar arbusculos generalmente similares al *Glomus*, vesículas intraradicales altamente polimórficas, globosas con finas capas y presentan lípidos no continúan a lo largo de la raíz., hifas intraradical rectas y en espiral las cuales forman los posibles puntos de entrada que son irregulares y presentan bifurcaciones, la mayoría de las unidades de infección se combinan y en cambio algunas quedan aisladas y dan a la micorriza una distribución muy dispereja, la tinción con azul de metileno es débil, descrita por (Gerdemann y Trappe, 1973) (Emend. Berch, 1985).

Gigaspora: Género que presenta una característica muy específica, células auxiliares espinosas, las cuales se transforman en hifas gruesas, se encuentran, alrededor de las raíces, son abundantes durante la colonización temprana y luego esta disminuye cuando la esporulación aumenta, los arbusculos presentan un eje

principal ancho y con ramificaciones que se afilan en sus extremidades; las unidades de infección del hongo se combinan para formar una colonización bastante uniforme a través de la corteza en diferentes lugares de la raíz, descrita por (Gerdemann y Trappe,1973).

Scutellospora: Se caracteriza por incluir en su arquitectura, arbúsculos más gruesos y más largos con ramificaciones, puntos de entrada, hifa extra e intraradical circular presentes cerca de los puntos de entrada, presentan una morfología similar a la *Gigaspora*, en este género, las células auxiliares carecen de espinas superficiales, estas presentan y forman amplias concavidades en diversos lugares de las células descrita por (Walker y Sanders, 1986).

Archaeospora: Todas las especies forman esporas que nacen del cuello lateral de un pre-diferenciado “sáculo esporífero” pero el modo de formación o bien es como la de las especies en *Acaulospora* o de una hifa rama o “pedicelo” para formar una espora como las del género *Glomus*. Algunas especies son dimórficas formando ambos morfotipos de esporas (glomoides y acaulosporoides), descrita por (Morton y Redecker, 2000).

2.7. Clave sinóptica para la identificación de géneros (Basada en el modo de formación de las esporas) Tomado de Taxonomía de hongos formadores de micorriza arbuscular (Varela y Gonzáles, 2002)

Géneros incluidos

- 1.- *Acaulospora*
- 2.- *Archaeospora*
- 3.- *Enthrophospora*
- 4.- *Gigaspora*
- 5.- *Glomus*

6.- *Paraglomus*

7.- *Scutellospora*

1.- Esporas

- ❖ Esporas formadas en esporocarpos 1,5
- ❖ Esporas arregladas radialmente alrededor de un plexo central de hifas 5
- ❖ Esporas formadas solitarias en el suelo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
- ❖ Esporas dimórficas (glomoides y acaulosporoides) 2

2.- Ontogenia de las esporas

- ❖ Esporas formadas terminal o intercaladamente sobre una hifa de sostén recto, curva en forma de embudo 2, 5, 6
- ❖ Esporas formadas lateralmente sobre una hifa que termina en un sáculo globoso 1,2
- ❖ Esporas formadas a partir de hifas que terminan en un sáculo globoso 1,2
- ❖ Esporas formadas dentro de una hifa que termina en un sáculo globoso
- ❖ Esporas formadas terminalmente sobre una hifa bulbosa llamada "célula esporógena" 4,7
- ❖ Espora sin hifa de sostén 1, 3, 6

3.- Pared de las esporas

- ❖ Esporas cuya pared al romperse no se separe en varias capas 2, 4, 5, 6
- ❖ Esporas cuya pared al romperse se separa en al menos dos capas 1, 3, 5, 7

Para la identificación de las especies se requiere determinar el tamaño de las esporas y la estructura de la pared; el tamaño de la espora se obtiene con ayuda de un ocular micrométrico. Se recomienda un mínimo de 40 esporas y sacar la moda. La estructura de la pared es el principal criterio morfológico que se usa para la delimitación de especies.

Walker en 1983 propone para describir la estructura de la pared el uso de una terminología consistente y una representación gráfica estandarizada de la pared (Murógrafo). En dicho trabajo introduce el concepto de peridio hifal y enlista cuatro tipos de paredes: pared unitaria, pared laminada, pared evanescente y pared membranosa y las describe de la siguiente manera:

Pared unitaria: Pared rígida formada por una sola capa.

Pared laminada: Pared formada por muchas capas; las capas incrementan con la edad de la espora.

Pared evanescente: Pared efímera formada por una o varias capas. Se desprende al madurar la espora.

Pared membranosa: Pared delgada no rígida frecuentemente con pliegues. Esta pared a menudo se colapsa en soluciones hipertónicas.

Posteriormente, se adicionaran otros tipos de pared. Walker (1986) introduce la pared coriácea como una pared robusta con apariencia de cuero en soluciones hipertónica y desarrolla el concepto de murónimo como una herramienta útil para describir de manera abreviada la estructura de la pared de las esporas de los hongos micorrízicos arbusculares. Morton (1986) introdujo la pared amorfa como una pared sin forma, elástica, cuya elasticidad varía dependiendo del líquido de montar. Spain *et al.* (1989) introducen la pared germinal, a partir de la cual surgen los tubos de germinación en el género *Gigaspora*.

Walker (1983) considera varias paredes en la estructura de la espora, sin embargo, es importante mencionar que las esporas de estos hongos están formadas por una sola pared que puede presentar distintas capas que se separan o no al romper ligeramente las esporas. Sin embargo, la utilización de la terminología propuesta ha venido a simplificar la descripción de las especies. Berch (1986) sugiere el uso de capas de la pared en lugar de simplemente paredes. Por otro lado, Maia *et al.* (1993) consideran que la terminología de la pared e los hongos arbusculares es algunas veces confusa, y consideran que la

pared de la espora es una unidad con varias subunidades a las que llaman zonas, cada una de las zonas equivale al concepto de pared de Walker (1983). Stürmer y Morton (1997) reinterpretan la estructura de la pared y confirman que todas las estructuras subcelulares consideradas como paredes por Walker (1983) forman parte de una sola pared. En dicho trabajo proponen la aplicación de criterios ontogénicos en tiempo y espacio, además de las propiedades de cada capa para describir la pared.

Cada capa la enumeran consecuentemente desde la más externa a la más interna y reseña sus características.

Aún cuando la terminología original propuesta por Walker (1983) ha tenido serias modificaciones, la estructura de la pared sigue siendo el criterio morfológico más importante para la descripción de especies fúngicas arbusculares.

Actualmente, se considera importante completar la descripción morfológica (Fig. 18) de las esporas con sus propiedades bioquímicas (perfil de ácidos grasos) y moleculares (especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación). Esta diversidad de herramientas permitirá una identificación más precisa de las especies. (Declerck *et al.*, 2000).

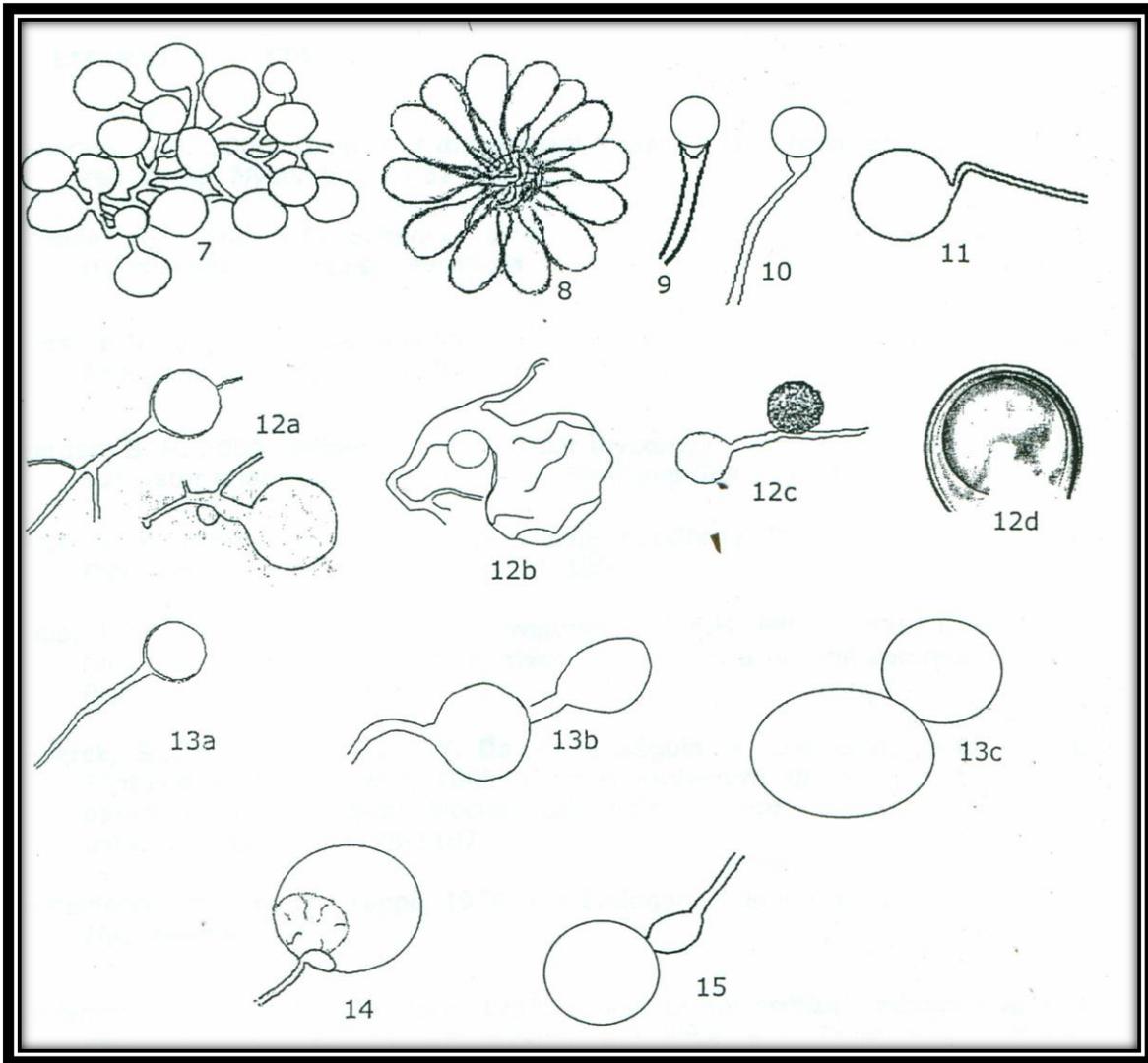
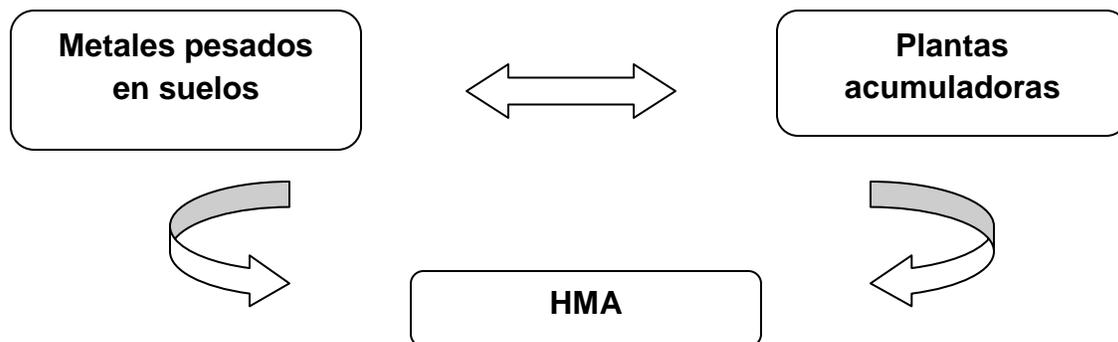


Fig. 18. Esporocarpio de *Glomus* 8. Corte de un esporocarpio de *Glomus* mostrando a las esporas arregladas radialmente alrededor de un plexo central de hifas. 9. Espora con hifa de sostén recta. 10. Espora con hifa de sostén en forma de embudo. 11. Espora con hifa de sostén curva. 12. Formación de espora en *Acaulospora*: a) Sáculo globoso, b) Espora joven sobre la hifa de sostén, c) Espora sésil, d) Espora madura sobre la hifa de sostén, e) Espora madura en hifa de sostén. 13. Formación de espora *Entrophospra*: a) Sáculo globoso, b) Espora formándose dentro de la hifa de sostén, c) Espora madura dentro de la hifa de sostén. 14. Espora de *Scutellospora* mostrando el escudo de germinación. 15. Espora de *Gigaspora*.

2.8. Impactos de la micorriza arbuscular en la sostenibilidad de los ecosistemas terrestres

La micorriza arbuscular (MA) se destaca como una de las simbiosis más generalizadas e importantes en los ecosistemas terrestres; esta simbiosis mutualística ejerce gran influencia en la nutrición y tolerancia de las plantas a estrés bióticos y abióticos (Siqueira y Saggin, 1995)



Esquema representativa de la asociación simbiótica entre planta-micorriza arbuscular-metales pesados en suelos contaminados. Fuente: Leyval *et al.*, 1997.

La importancia de la micorriza reside en su papel en la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados, se ha comprobado que esta simbiosis tiene un efecto benéfico, ya que inmoviliza los metales en la raíz, reduciendo su translocación a la parte aérea de la planta y, en consecuencia, el flujo de metales a la cadena trófica (Pawłowska *et al.*, 2000; Del Val *et al.*, 1999; Pawłowska *et al.*, 1996; Barea *et al.*, 1995; Leyval *et al.*, 1995).

Por otra parte, se ha comprobado que las plantas micorrizadas tienen un efecto benéfico, basado en la capacidad que confiere a la planta para inmovilizar metales en la raíz, reduciendo así su translocación a la parte aérea y, en consecuencia, el flujo de metales a la cadena trófica (Del Val *et al.*, 1999).

Los reportes de las altas concentraciones de metales muestran variaciones en la acumulación y la translocación dentro de la planta dependiendo del hongo, de la planta hospedera, densidad de la raíz, características del suelo, metales y su disponibilidad (Joner y Leyval, 2001; Leyval *et al.*, 1997).

En contraposición a lo mencionado por Joner y Leyval, 2001; acerca de la micorriza arbuscular (MA) que puede subsistir en suelos altamente contaminados con metales pesados; según Jamal, 2002; la colonización a menudo es reducida en esas condiciones. Varios metales pesados son fungitóxicos, razón por la cual reducen la germinación de las esporas, el crecimiento micelial y, consecuentemente, la colonización micorrízica.

2.9. Importancia de las micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos

El estrés ambiental es el principal obstáculo para la supervivencia y reproducción de las especies vegetales que se encuentran en áreas áridas y semiáridas. Este estrés involucra baja disponibilidad de agua, patrones de lluvia altamente impredecibles, suelos pobres en nutrientes (nitrógeno y fósforo) con alta variación espacial y temporal (Zak *et al.*, 1995; Whitford, 1986; Schlesinger *et al.*, 1990) y suelos con alta salinidad (Al-Karaki, 2000). Cualquier factor biótico o abiótico que pueda inducir el buen desarrollo de las plantas creciendo en condiciones de estrés es realmente valioso, porque dará como resultado mayor productividad y estabilidad en la vegetación (Ferrera-Cerrato, 1983).

Es conocido que las plantas han desarrollado numerosas estrategias para desarrollarse en estas condiciones. Por ejemplo, *Prosopis glandulosa* produce raíces muy profundas para tener acceso al agua almacenada en la profundidad del perfil del suelo, mientras *Bouteloua eriopoda* presenta raíces fibrosas hinchadas para interceptar humedad disponible antes de que el agua se evapore (Herman, 2000). Sylvia y Williams (1992) mencionaron que los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son los organismos predominantes en la vecindad de las

raíces y se encuentran en diferentes ambientes, aun cuando se presenten condiciones ambientales desfavorables para las plantas.

Numerosos autores han sugerido que es de esperarse mayor impacto benéfico de los HMA cuando las plantas están expuestas a ambientes extremos que limitan el crecimiento. Es probable, que una de las estrategias, también sea la asociación con los HMA, ya que éstos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y asociados con muchas plantas. Los HMA son altamente adaptables a diferentes ambientes y son intermediarios cruciales entre el suelo y la planta (Sylvia y Williams, 1992). Esta simbiosis permite a la planta establecerse, desarrollarse, sobrevivir en ambientes extremos como son los áridos, semiáridos y desérticos, y hasta influir en la diversidad vegetal (van der Heijden *et al.*, 1998). Herman (2000) mencionó que al no incluir a los HMA en los estudios biológicos de plantas y suelos en sistemas áridos y semiáridos se cae en un error, ya que se ignora a uno de los principales elementos participantes en estos sistemas. Kyde y Gould (2000) mencionan que los hábitats sin HMA virtualmente no existen y éstos incluyen desde áreas severamente perturbadas y erosionadas, minas, suelos contaminados por diferentes compuestos (metales pesados, hidrocarburos, plaguicidas) hasta ecosistemas no alterados por el hombre.

3. Hipótesis

- ❖ La diversidad de hongos micorrízicos arbusculares es mayor en la zona con cultivos agrícolas y menor en la zona sin cultivos agrícolas en la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

- ❖ Evaluar la diversidad de hongos que forman la asociación micorrízica vesículo arbuscular (MVA) en suelos de la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena.

4.2. Objetivos Específicos

1. Identificar los géneros y/o especies de hongos que forman la asociación micorrízica vesículo arbuscular (MVA) asociados a las especies agrícolas cultivadas en la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena.
2. Determinar la densidad (esporas /g suelo) de hongos que forman la asociación micorrízica vesículo arbuscular (MVA), presentes en suelos rizosférico en la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena.
3. Determinar el nivel de colonización en raíces por hongos que forman la asociación micorrízica vesículo arbuscular (MVA), presentes en suelos rizosférico en la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena.
4. Establecer la relación entre la diversidad, la densidad y colonización de hongos que forman la asociación micorrízica vesículo arbuscular (MVA).

5. Materiales y Métodos

5.1. Área de Estudio

Ubicación Geográfica

El área de estudio se encuentra ubicada en la Prov. de Sta. Elena, Vía el Azúcar – Sta. Elena, con una posición geográfica de 05° 4' 49.40" S y 09° 7' 45.45" Km 73 vía el Azúcar-Sta. Elena, a una altura de 34 metros sobre el nivel del mar (msnm). Con una temperatura media anual 25.3 °C y una precipitación media anual de 254.4 mm. La Comuna Zapotal es una de las 65 comunas localizadas en la Península de Santa Elena en la Provincia del Guayas, las cuales son reconocidas por la Ley de Régimen Comunal. Las comunas en la Prov. de Sta. Elena tienen como principal característica la propiedad de la tierra alrededor de la cual se forma una organización social, la cual se constituye en una unidad socio-política identificada con un territorio particular. La Comuna Zapotal goza de una excelente ubicación geográfica y medios de acceso en relación al resto de las comunidades de la Prov. de Sta. Elena, por lo que fue invitada a participar como ejecutora del proyecto, su más importante aporte es el otorgamiento de 5 ha de terreno en los cuales se desarrolló el proyecto propuesto.



Fig. 19. Ubicación geográfica "Agrofuturo".

5.2. Materiales

5.2.1. Materiales de Campo

- ❖ Fundas ziploc
- ❖ Machete
- ❖ Guantes
- ❖ GPS

- ❖ Pala
- ❖ Materiales de oficina
- 5.2.2. Materiales de laboratorio**
- ❖ Tamices de 500 μm y 45 μm
- ❖ Nevera
- ❖ Anaqueles
- ❖ Bandejas
- ❖ Frascos contenedores
- ❖ Placas porta y cubre objetos
- ❖ Vaso de precipitación
- ❖ Pinzas
- ❖ Aguja enmangada
- ❖ Matraz de erlenmeyer
- ❖ Autoclave
- ❖ Estufa
- ❖ Microscopio
- ❖ Estereoscopio
- ❖ Cajas de Petri
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Jeringuillas
- ❖ Tijera
- ❖ Tubos para centrífuga
- ❖ Centrífuga
- ❖ Vidrio reloj
- ❖ Micropipeta
- ❖ Pipeta
- ❖ Semillas de *Brachiaria decumbens*
- ❖ Papel aluminio
- ❖ Papel filtro
- ❖ Computadora
- ❖ Calculadora

- ❖ Varilla de vidrio
- ❖ Vasos de plástico
- ❖ Turba
- ❖ Arena
- ❖ Cámara fotográfica
- ❖ Balanza analítica
- ❖ Embudo

5.2.3. Reactivos

- ❖ Hidróxido de potasio (KOH) al 10%
- ❖ Peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 10%
- ❖ Ácido clorhídrico (HCl) al 10%
- ❖ Anilina azul y Azul tripano 0.05%
- ❖ Ácido Láctico
- ❖ Hidrato de cloral
- ❖ Glicerol
- ❖ Agua destilada
- ❖ Sacarosa al 60%

Solución nutritiva de Long Ashton.

❖ N-NO ₃	0.808g
❖ Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0.944g
❖ NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.184g
❖ MgSO ₄ 7H ₂ O	0.368g
❖ MnSO ₄ 4H ₂ O	0.0022g
❖ CuSO ₄ 5H ₂ O	0.00025g
❖ ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.00029g
❖ H ₃ BO ₃	0.00310g
❖ NaCl	0.00590g
❖ (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0.000088g
❖ Citrato férrico al 1%	2ml
❖ Agua destilada	1000ml

5.3. Muestreo

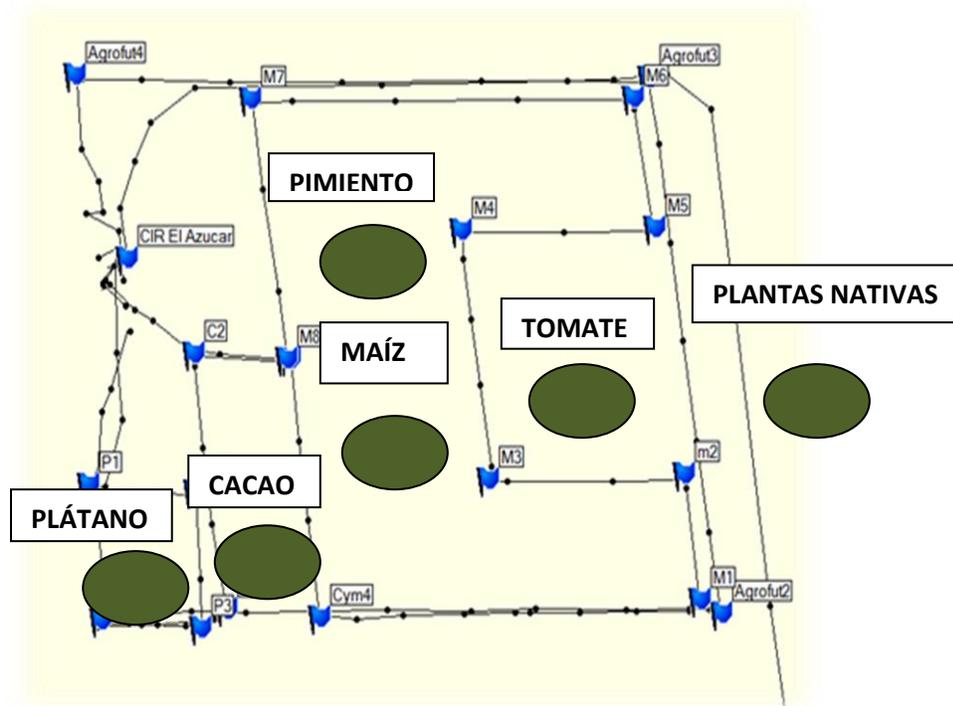
La finca que se escogió para realizar el muestreo se llama Agrofuturo que tiene una superficie de 5 hectáreas en donde se distribuyen los diferentes cultivos que se incluyeron en el proyecto de investigación.

La finca se dividió en varios lotes en función de los cultivos presentes en el lugar, los cultivos establecidos corresponden a plantas de:

- ✓ Maíz (*Zea mays*)
- ✓ Tomate (*Solanum lycopersicum*)
- ✓ Pimiento (*Capsicum annum*)
- ✓ Plátano (*Musa AAB subgrupo plátano*)
- ✓ Cacao (*Theobroma cacao*)

Cada lote tiene una superficie de 0,5 hectáreas aproximadamente.

En el siguiente esquema, los círculos verdes muestran los sitios estratégicos donde se realizó el muestreo.



El trabajo de laboratorio y experimental se desarrolló en los laboratorios e invernaderos de la Carrera de Ingeniería Agrícola y Biológica de la Facultad de Mecánica y Ciencias de la Producción de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

El primer paso que se llevó a cabo fue el de seleccionar 6 lotes, de aproximadamente 0,5 hectáreas cada uno, En cada lote se tomó una muestra, componente de 6 sub-muestras de suelo rizosférico, a una profundidad de 0 – 20 cm, las cuales se empacaron en bolsas ziploc y rotuladas con la fecha, el número o código asignado, vegetación circundante y repetición (en caso de que sea necesario); estas muestras fueron llevadas al Laboratorio de Fitopatología de la Carrera de Ingeniería Agrícola y Biológica de la Facultad de Mecánica y Ciencias de la Producción de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

5.4. Etapas en el laboratorio

5.4.1. Secado

Las muestras de suelo provenientes de los 6 sitios de muestreos fueron tamizados para separar partes gruesas de suelo (piedras, cascajos) y raíces.

5.4.2. Aislamiento de esporas

Una vez realizado el tamizado de cada muestra, se procedió al aislamiento de esporas mediante la técnica propuesta por Sieverding (1984). De cada muestra se tomaron 100 gr. de suelo, se depositaron en un beaker al cual se agregaron entre 200 a 300 ml de agua, se agitó por 30 minutos, posteriormente se pasó por un juego de tamiz de 500 μm y 45 μm , para secar la muestra se utilizó un papel filtro y embudo y se lo dejó hasta que la muestra se haya secado totalmente sobre el papel filtro. El contenido una vez seco se pasó a los tubos de la centrífuga, a la cual se le agregó con una jeringa al fondo del tubo 25 ml de solución de azúcar al 60%. Cada tubo fue equilibrado con ayuda de una balanza y seguidamente se

centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos. Los contenidos de los tubos de la centrífuga se pasaron por los tamices de 500 μm y 45 μm respectivamente para cada muestra obtenida del tamizado anterior, se lavaron las esporas varias veces con agua corriente y se pasaron a cajas de Petri, las cuales se rotularon con un número que identifica la muestra, la fecha de procesamiento y finalmente se guardaron en la nevera para su posterior utilización.

5.4.3. Conteo de esporas

De cada muestra procesada por la técnica anterior y teniendo en cuenta lo indicado por Schenck y Pérez, (1990), se tomaron 2 ml de cada una de ellas, se depositaron en una caja de Petri rayada en cuadrículas 1 cm^2 para realizar y facilitar el conteo respectivo. Cada conteo se realizó tres veces para obtener un estimativo del número total de esporas en 100 gr. de suelo por muestra. En este caso los resultados han sido expresados en número de esporas/100 g de suelo de esta manera pudimos obtener la densidad promedio de hongos micorrízicos vesículo-arbusculares.

5.4.4. Separación de morfotipos

Después del conteo respectivo, se recolectaron en un vidrio reloj, se observarán al estereoscopio y con ayuda de una aguja de disección se reunieron los morfotipos teniendo en consideración la similitud en forma, color y tamaño de las esporas. Con la ayuda de una micropipeta se extrajeron las esporas, se depositaron en cajas de Petri con agua estéril. Estas cajas de Petri se rotularon con el respectivo número de muestra y fecha, de donde fue recolectada y las características de cada morfotipo encontrado, finalmente se guardaron en una nevera para su posterior utilización.

5.4.5. Identificación de géneros y/o especies

Cada uno de los morfotipos aislados se depositó en vidrios de reloj, se observaron al estereoscopio para verificar sus características y eliminar esporas de otros morfotipos y partículas contaminantes, las cuales se retiraron con ayuda de una aguja de disección. Una vez limpias las esporas se procedió a la preparación de láminas, que consiste en colocar una gota de PVLG, sobre el cual se colocarán entre 10 y 15 esporas por muestras, las cuales fueron cubiertas con laminillas y se procedió a la observación microscópica para su identificación a nivel de género y/o especie. Además en cajas de Petri se colocaron por grupo los diferentes géneros y/o especies determinadas, para su inoculación en el ensayo posterior.

5.4.6. Evaluación morfológica de las poblaciones de micorrizas

Las esporas fueron evaluadas y agrupadas por morfotipos para cada muestreo, para su posterior clasificación a partir de características morfológicas a nivel de género y/o especie, usando la clave taxonómica de Shenk y Pérez (1990) y la tabla de colores publicada por el INVAM (International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Mycorrhizal Fungi). Para esto se hicieron placas de cada uno de los morfotipos, usando como medio de montaje PVLG y reactivo de Melzer. La observación microscópica se realizó con objetivos de 40X e inmersión 100X. Para las medidas se empleó una regla micrométrica con 100 divisiones adaptada al ocular.

5.4.7. Porcentaje de infección

Para determinar el porcentaje de infección de las raíces, se utilizó raíces de un centímetro de longitud aproximadamente, se depositaron en un frasco boca ancha estéril, se lavaron varias veces con agua para remover el suelo adherido a las raíces mismas y se procedió a su respectiva tinción, utilizando la técnica propuesta por Sieverding, (1984). Esta técnica consiste en añadir las raíces en vasos de precipitación cubiertos con KOH al 10%, permaneciendo dentro de esta solución en la autoclave por 10 minutos, al cabo de los cuales se procede a

decantar el contenido del vaso y lavar las raíces con agua corriente. Luego se agrega HCl al 10% hasta cubrirlas y de nuevo se procede a dejarlas a temperatura ambiente por otros 10 minutos, hasta que tomen un color blanquecino. Se decanta y se lavan con agua corriente, se tiñen con azul de anilina o azul de tripano (0.05% en ácido láctico), para permanecer por espacio de 10 minutos en la autoclave.

Finalizada esta última fase se decanta el azul de tripano, se recupera para su reutilización y se conservan las raíces en glicerina. Las raíces coloreadas por esta técnica, en un número de 10 a 15, se colocaron paralelamente sobre láminas, se taparon con un cubreobjetos y se observaron al microscopio en objetivo de 10X y 40X, realizando el conteo en 100 campos ordenadamente. En cada campo se observó y se contó el número de campos negativos y positivos. Cuando el campo de positivo se determinó el tipo de estructura presente como arbusculos, vesículas, hifas y esporas. Para determinar el porcentaje de colonización de cada muestra, se utilizó la siguiente formula, propuesta por Sieverding, (1984):

$$\% \text{ de colonización} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de campos infectados}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de campos observados ((+) + (-))}} \times 100$$

5.4.8. Inoculación e incremento de hongos micorrízicos arbusculares

Las MVA recolectadas en el campo e identificadas en la fase de laboratorio se incrementaron en un invernadero construido en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología de la Carrera de Ingeniería Agrícola y Biológica de la Facultad de Mecánica y Ciencias de la Producción de la Escuela Superior Politécnica del Litoral por medio de cultivos monospórico para facilitar su descripción, como planta hospedante se utilizó *Brachiaria decumbens* que se caracteriza por ser

micotrófica obligada, y de esta manera obtener una gran cantidad de esporas por géneros y/o especies identificadas en los procesos anteriores.

Se utilizó como sustrato turba y arena, en proporción 1:3 para realizar el cultivo monospórico.

La solución de Long Ashton se le aplicó a las plantas hospederas para un crecimiento regular de las mismas.

El cultivo monospórico se lo realizó con la técnica de Mansur y Dodd en donde se utilizan cajas de Petri que se llenan con arena esterilizada. A la caja de Petri se le hace un orificio (en la tapa y en la contratapa) para colocar una plántula (3-5 días de edad) y permitir el desarrollo de ésta, las esporas se separan del suelo o cultivo trampa por tamizado y decantación. Se coloca una espora (cultivo monospórico) en la punta de la radícula. Los cultivos se mantienen en forma vertical y se pueden revisar al estereoscopio para visualizar la germinación de la espora y producción de micelio externo.

El incremento de las MVA tardó aproximadamente 4 meses, tiempo al cabo del cual se observaron los cultivos para seleccionar los que presentaron mayor población de esporas y de micelio externo.

5.5. Análisis estadístico

A partir de la cantidad de esporas de cada género y o especie se calculó la diversidad mediante el índice de Shannon-Wiener. Este índice tiene en cuenta el número de individuos así como el número de grupos taxonómicos (géneros y/o especies). Varía desde 0, para comunidades con sólo un grupo taxonómico, a valores superiores para aquellas comunidades con varios grupos taxonómicos, mediante

La fórmula:

$$H = 3.3219 (\log N - 1/N \sum n_i \log n_i)$$

Donde **H** es la diversidad genética, **ni** es el número de individuos del taxón y **N** es el total de individuos.

Para establecer que las especies de MA nativas colectadas no pertenecen al mismo género y/o especie se utilizará una tabla de contingencia. Mediante un análisis de varianza se determinó la diferencia en la densidad de esporas entre los puntos estudiados.

Se usó el análisis de correlación lineal simple para establecer la relación entre el nivel de colonización de las MA en las raíces y la densidad de esporas/g de suelo. Las variables correlacionadas son: porcentaje de colonización y número de esporas/g de suelo.

5.5.1. Índice de Shannon-Wiener

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

Expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a que especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una colección (Magurran, 1988; Peet, 1974; Baev y Penev, 1995). Asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. Adquiere valores entre cero, cuando hay una sola especie, y el logaritmo de S, cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos (Magurran, 1988).

A continuación se describe el procedimiento propuesto por Hutcheson en 1970 para probar la hipótesis nula de la diversidad proveniente de dos muestras.

a. Para cada muestra se calcula el índice de diversidad ponderado (H_p) en función de la frecuencia de cada especie:

$$H_p = (N \log N) - (\sum f_i \log f_i) / N$$

Donde:

f_i = frecuencia (número de individuos) registrada para la especie i .

b. Para cada muestra calculamos la varianza del índice de diversidad ponderado:

$$var = [\sum f_i \log^2 f_i - (\sum f_i \log f_i)^2] N / N^2$$

c. Se calcula la diferencia de las varianzas de ambas muestras: var_1

$$Dvar = \sqrt{var_1 + var_2}$$

d. Se obtiene el valor de t

$$t = Hp_1 - Hp_2 / Dvar$$

e. Calculamos los grados de libertad asociados con el valor de t .

$$g. l. = (var_1 + var_2)^2 / (var_1^2 / N_1) + (var_2^2 / N_2)$$

f. Buscamos en tablas estadísticas el valor de la distribución de t para los grados de libertad calculados.

6. Resultados

De acuerdo con los análisis realizados en Laboratorio de Fitopatología de la Carrera de Ingeniería Agrícola y Biológica de la Facultad de Mecánica y Ciencias de la Producción de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, los resultados finales del análisis micorrízico del suelo proveniente de la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena, fueron en promedio 174.2 esporas viables en 100 gramos de suelo (Tabla 4), la población es considerable si tomamos como referencia que el suelo de esta zona está expuesto a un alto estrés hídrico debido a las condiciones climáticas, estas tierra son semidesérticas y áridas, pero el resultado se obtuvo realizando una comparación de la zona virgen (Sin actividades agrícolas) y una zona que ha sido expuesta a un sistema de riego debido a que actualmente se lleva a cabo un proyecto de agricultura vinculado con la comunidad en dicha Zona.

Número de esporas en 100g de suelos (100%)							
	Pimiento	Cacao	Tomate	Plátano	Maíz	Plantas nativas	Total
<i>Archaeospora sp.</i>	25	30	15	30	45	70	215
<i>Gigaspora sp.</i>	25	0	5	0	40	0	70
<i>Scutellospora sp.</i>	0	20	0	25	40	15	100
<i>Paraglomus sp.</i>	20	15	15	30	25	40	145
<i>Glomus sp1.</i>	40	20	30	40	40	30	200
<i>Glomus sp2.</i>	45	30	25	30	40	50	220
<i>Acaulospora sp.</i>	10	5	5	25	35	15	95
Total	165	120	95	180	265	220	1045

El promedio se obtuvo dividiendo el número total de esporas para los 6 sitios de muestreo dando como resultado 174.2 esporas/100g de suelo seco.

Tabla 4. Número de esporas/100g de suelo para los diferentes cultivos y morfoespecies descritas.

Los resultados obtenidos en el análisis general del suelo proveniente de la zona estudiada, nos indica que la mayor cantidad de esporas por 100 g de suelo fue encontrada en los cultivos de maíz 265 esporas/ 100g de suelo seco. La menor cantidad de esporas por 100g de suelo fue encontrado en los cultivos de de tomate 95 esporas/ 100 g de suelo seco (Tabla 4).

En los cultivos de cacao, pimiento, plátano y plantas nativas tienen valores intermedios siendo las cantidades relativamente cercanas a los valores extremos, de esta manera se encontró 120, 165, 180, 220 esporas/ 100g de suelo seco en los cultivos ante mencionados respectivamente (Tabla 4).

Tomando en consideración por otro lado a los géneros de hongos micorrízicos arbusculares encontrados en el análisis general del suelo, la morfoespecie *Glomus* es el género dominante dentro de la población encontrada. Y el género menos representativo pero no menos importante fue la morfoespecie *Gigaspora* (Tabla 4).

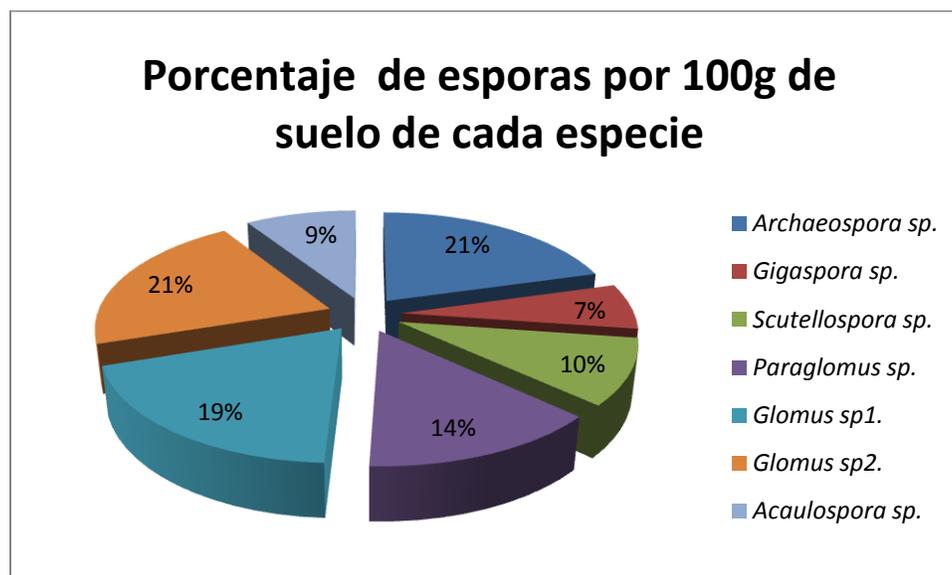


Fig. 20. Porcentaje de esporas por 100g de suelo en cada morfotipo descrito.

Son claras las evidencias de que cada cultivo asociado con las diferentes especies de hongos micorrízicos arbusculares durante su desarrollo tienen un gran beneficio; una mayor y más eficiente captación de nutrientes; protección contra patógenos de plantas o contra la falta o exceso de agua; y también resistencia a

metales pesados y contaminantes ambientales, lo cual repercute en un mayor crecimiento y reproducción. Por otro lado el hongo que es un organismo heterótrofo, al asociarse con una especie vegetal en este caso con uno de los diferentes cultivos considerados en este trabajo de investigación, obtienen un ambiente libre de competencia en el interior de las raíces que es donde se establecen y también alimento por medio de los azúcares producidos por las plantas durante el proceso de la fotosíntesis. Los diferentes géneros de hongos micorrízicos arbusculares estuvieron presentes casi en su totalidad en los diversos cultivos. De esta manera la morfoespecie dominante fue *Glomus sp2.* con el 21%, *Archaeospora sp.* con el 21%, *Glomus sp1.* con el 19%, el *Paraglomus sp.* ocupa el cuarto lugar de abundancia con un 14%, *Scutellospora sp.* presenta un 10%, *Acaulospora sp.* representa el 9% y finalmente la morfoespecie *Gigaspora sp.* con un 7% de abundancia (Fig. 20).

El género *Glomus* constituye aproximadamente un 40% en relación a los otros géneros encontrados en el análisis de suelo. Podemos decir que en la actualidad hemos descrito solo 6 géneros presentes en la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena. . Siendo estos *Glomus*, *Archaeospora*, *Paraglomus*, *Scutellospora*, *Acaulospora* y *Gigaspora*.

Distribución de las especies de endomicorrizas identificadas en los diferentes cultivos						
	Pimiento	Cacao	Tomate	Plátano	Maíz	Plantas nativas
<i>Archaeospora sp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Gigaspora sp.</i>	X		X		X	
<i>Scutellospora sp.</i>		X		X	X	X
<i>Paraglomus sp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Glomus sp1.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Glomus sp2.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Acaulospora sp.</i>	X	X	X	X	X	X

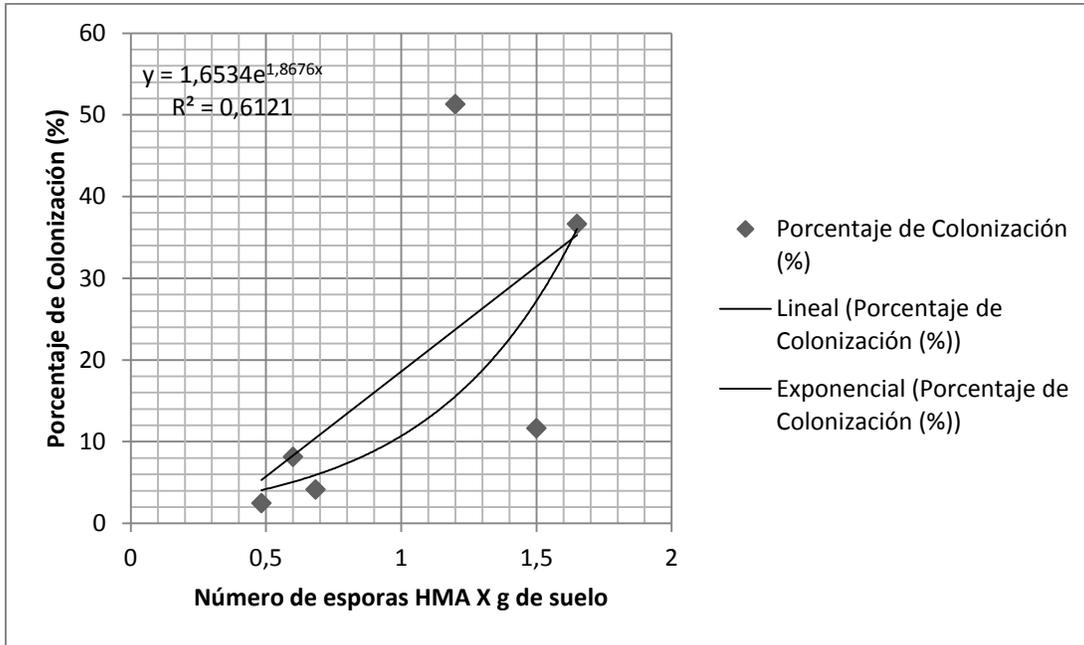
Tabla 5. Distribución de las especies de endomicorrizas identificadas en los diferentes cultivos.

Para establecer que las especies nativas y de los diferentes cultivos no son iguales se utilizó una tabla de contingencia (Tabla 5). La diversidad de especies tanto nativas como las pertenecientes a los diferentes cultivos fue alta si consideramos que las condiciones en dicha zona son adversas. Se identificaron un total de 7 especies de Hongos micorrízicos arbusculares pertenecientes a 6 géneros: *Glomus*, *Archaeospora*, *Paraglomus*, *Scutellospora*, *Acaulospora* y *Gigaspora* (Tabla 5).

El género *Gigaspora* no se presentó en los cultivos de Cacao, y plátano dentro de los suelos que están sometidos a un sistema de riego por la actividad agrícola que se lleva a cabo en este lote, en tanto que en las especies nativas, es decir suelo que no está sometido a ninguna actividad agrícola tampoco estuvo presente (Tabla 5).

El género *Scutellospora* no se presentó ni en los cultivos de pimiento, ni en los cultivos de tomate. Sin embargo estuvieron presentes en los cultivos de cacao, plátano y maíz. Además este último género estuvo presente en el suelo no intervenido por las actividades agrícolas (Tabla 5).

Los géneros *Glomus*, *Archaeospora*, *Paraglomus* y *Acaulospora* fueron encontrados en todos los cultivos y en las plantas nativas (Tabla 5).



R= 0.7823 correlación significativa

Fig. 21. Correlación entre el porcentaje de colonización y el número de esporas HMA x g de suelo.

El análisis de correlación (Pearson) permitió determinar la relación significativa (0.7823) que existe entre la densidad de esporas /g de suelo y la colonización de raíces por los HMA. De acuerdo con Sieverding el clima y concretamente la humedad del suelo, tiene gran influencia en las tasas de colonización de las raíces por los HMA (Fig. 21).

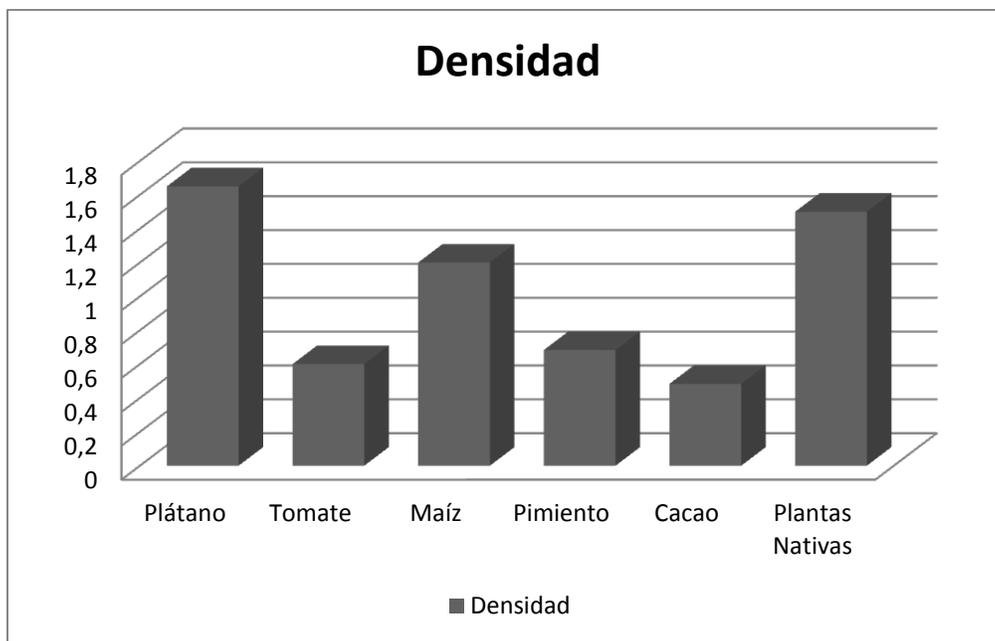


Fig. 22. Representación de la densidad de esporas por gramo de suelo seco.

El análisis de número de esporas/g de suelo seco muestra una presencia mayor en los cultivos de Plátano dentro del ambiente edáfico que está sometido al riego con un 1.65 esporas/g de suelo seco, la densidad más baja se presentó en los cultivos de cacao con un 0.48%, sin embargo en el ambiente edáfico no intervenido para uso de actividades agrícolas presento un nivel de densidad elevado siendo de 1.5 esporas/g de suelo seco mostrándose muy cercano este valor al del cultivo de plátano. El cultivo de maíz presento 1.2 esporas/g de suelos siguiéndole el pimiento y el tomate con 0.68 y 0.60 esporas/g de suelo seco respectivamente (Fig. 22).

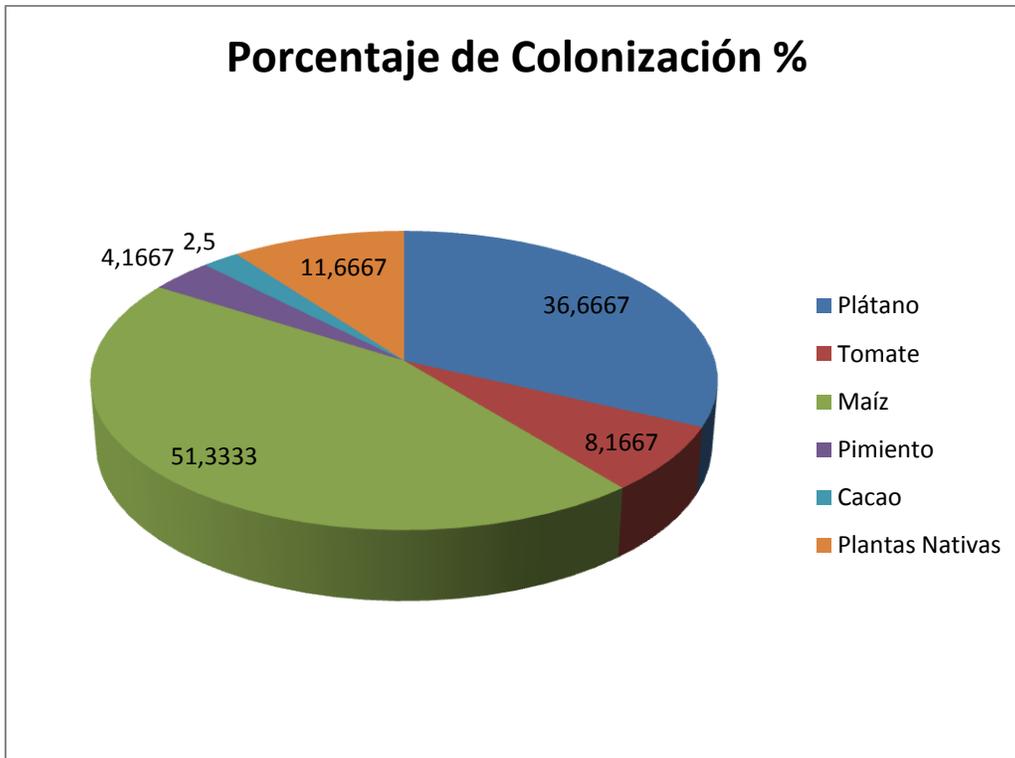


Fig. 23. Representación del porcentaje de colonización del sistema radicular de las plantas de cultivos agrícolas y plantas nativas.

Son interesante los resultados de los análisis de colonización del sistema radicular pues el cultivo de maíz tuvo el mayor porcentaje de colonización con un 51.33% de colonización, mostrándose valores muy bajos en el sistema radicular de las plantas nativas con 11.66% de colonización, no mostró relación con la densidad de esporas encontradas en el análisis de suelo. El plátano colonizó con un 36.66%, al contrario del caso antes mencionado este cultivo si presento una relación más directamente proporcional con la densidad de esporas/ g de suelo seco. El cultivo de tomate presentó un 8.16% mientras que el cultivo de pimiento presentó 4.16% de colonización, los valores más bajos se encontraron en el sistema radicular de las plantas de cacao con un 2.5% de colonización (Fig. 23).

Orden	Familia	Género	Especie
Archaeosporales	Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i>	<i>Archaeospora sp.</i>
Diversisporales	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora sp.</i>
	Gigasporaceae		<i>Gigasporaceae sp</i>
	Scutellospora		<i>Scutellospora sp.</i>
Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i>	<i>Glomus sp1.</i>
			<i>Glomus sp2.</i>
Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>	<i>Paraglomus sp.</i>

Tabla 6. Ubicación taxonómica de los Hongos Micorrizógenos Arbusculares encontrados.

Se registraron 7 especies de Hongos micorrízicos arbusculares pertenecientes a 6 géneros y cuatro familias (Tabla 6). La Familia Glomeraceae presentó un 40% de abundancia de esporas/100g de suelo seco, la Acaulosporaceae presentó un 25%, y las familias Archaeosporaceae y Paraglomeraceae con 21 y 15% respectivamente (Fig. 24).

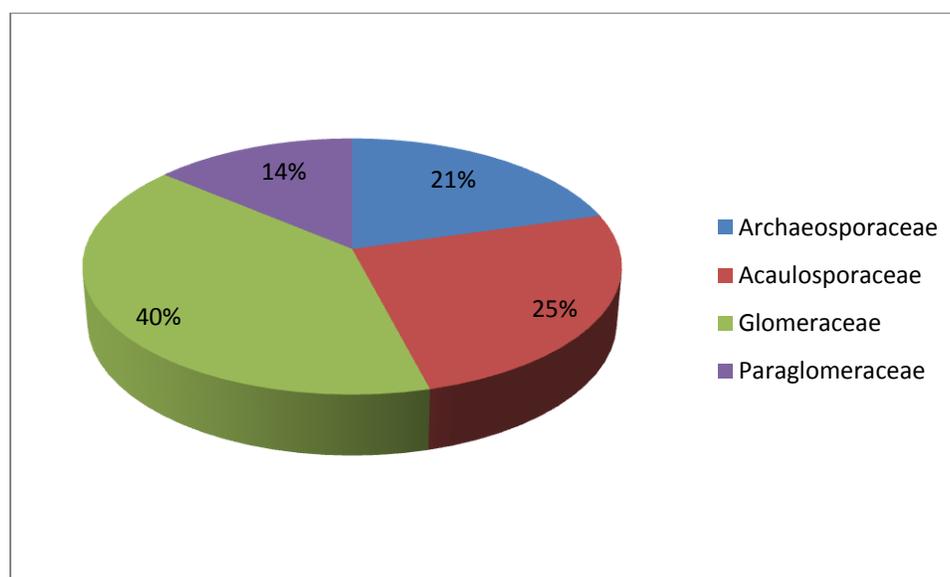


Fig. 24. Porcentaje de densidad de esporas por familia presentes en la Comuna Zapotal – Provincia de Santa Elena.

Parámetros ecológicos	Suelo con sistema de riego (Actividad agrícola)	Suelo sin sistema de riego (Sin actividad agrícola)	Total de la diversidad en la finca Agrofuturo (General).
Diversidad máxima	1,94	1,79	1,95
Índice de diversidad	1,88	1,65	1,87
Equitatividad	0,97	0,92	0,96

Tabla 7. Medidas de diversidad de HMA en la Comuna Zapotal – Provincia de Santa Elena.

Utilizando el índice de diversidad de Shannon-Wiener como indicador, la diversidad fue de 1.87 para todos los datos en conjunto, la equitatividad fue alta (Tabla 7).

La diversidad de HMA varió entre los 2 ambientes edáficos. La comunidad de HMA más diversa y equitativa fue aquella en donde el suelo tenía un sistema de riego, el cual se lleva a cabo por las actividades agrícolas de esta zona, en tanto que la comunidad menos diversa y equitativa fue la que no tenía sistema de riego, ya que no es utilizado para actividades agrícolas de la Comuna Zapotal (Tabla 7).

Al compararse los índices de diversidad, mediante la t-student ($p < 0.05$) modificada por Hutchenson (1970), se encontraron diferencias significativas entre los dos ambientes edáficos. El valor de la distribución $t_{0.05(2)75.3503} = 2.04$. Como el valor de t obtenido es de (5.7399) es mayor que el valor de t en las tablas, por lo cual rechazamos la hipótesis nula y llegamos a concluir de acuerdo a este procedimiento que la diversidad en los cultivos agrícolas no es igual a la diversidad que se encuentra presente en los suelos de las plantas nativas. Mostrando una considerable influencia el sistema de riego que tenían los cultivos agrícolas, presentando una mayor diversidad de HMA que los suelos con plantas nativas.

Características representativas para identificación de géneros y/o especies de HMA según (INVAM)



Archaeospora sp. con aumento de 40X



Archaeospora sp. en PVLG con aumento de 40X



Archaeospora sp. en reactivo de Melzer con aumento de 40X



Capas de la pared celular de *Archaeospora sp.* (40X).

Descripción de *Archaeospora sp.*

Usualmente las esporas de esta especie son de color hialino y rara vez de blanco cremoso, tienen una forma globosa, subglobosa e irregular, el tamaño de la espora oscila entre 40 y 80 μm , claramente se puede observar la presencia de 3 capas hialinas, tanto en PVLG como en el reactivo de Melzer la espora conserva su color hialino. El tubo germinativo se encuentra presente y se origina en la pared de la espora.



Gigaspora sp. con aumento de 40X



Gigaspora sp. en PVLG con aumento de 40X



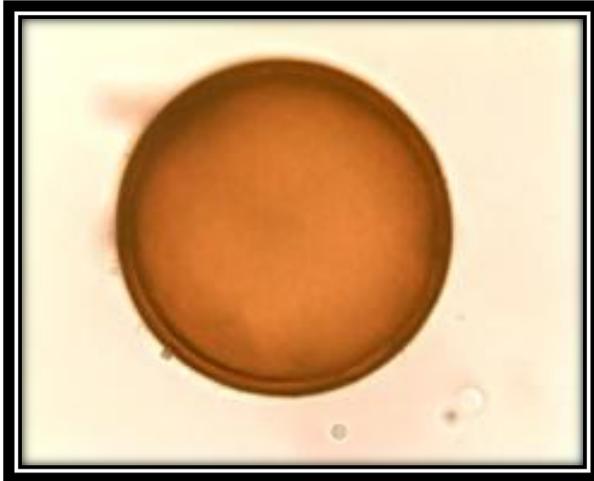
Gigaspora sp. en reactivo de Melzer con aumento de 40X



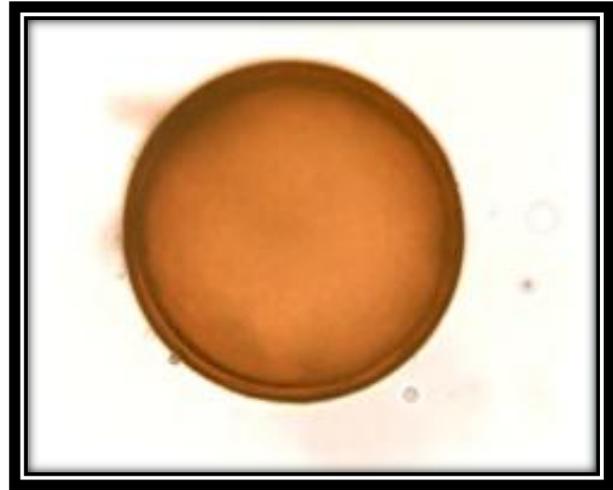
Capas de la pared celular de *Gigaspora sp.* (40X)

Descripción *Gigaspora sp.*

La espora es de color blanco crema, es globosa, grande, de 260 a 400 μm de diámetro, posee 3 capas las 2 primeras son hialinas y la tercera es de color amarilla pardo. Con PVLG la espora mantiene su color blanco crema o hialina, en tanto que con el reactivo de Melzer se torna de un color rojizo oscuro con excepción de la capa más externa. El tubo germinativo se encuentra presente originándose de la capa más interna de la pared y con una protuberancia, inmediatamente emerge después de la capa más externa de la pared.



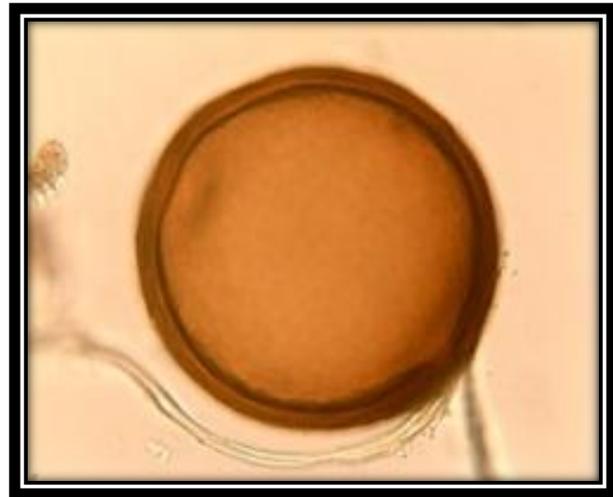
Scutellospora sp. con aumento de 40X



Scutellospora sp. en PVLG con aumento de 40X



Scutellospora sp. en reactivo de Melzer con aumento de 40X



Capas de la pared celular de *Scutellospora sp.* (40X)

Descripción *Scutellospora sp.*

Las esporas son de color café crema o suelen ir de color pálido a un oscuro cobre, tienen una forma globosa o subglobosa, con un tamaño de entre 240 a 360 μm , posee dos capas, la externa permanentemente rígida de color amarillo marrón oscuro y la interna naranja-marrón. Con PVLG la espora toma un color amarillo marrón, y con el reactivo de Melzer la espora tiene un color que va del rojo al naranja marrón. Poseen un escudo de germinación con apariencia rugosa, la cual es visible cuando la espora se encuentra intacta.



Paraglomus sp. con aumento de 40X



Paraglomus sp. en PVLG con aumento de 40X



Paraglomus sp. en reactivo de Melzer con aumento de 40X



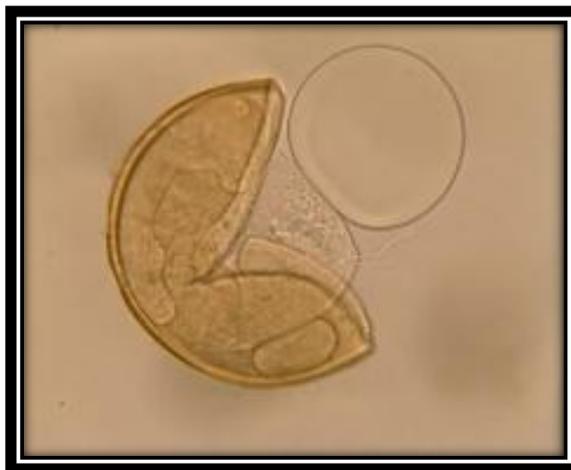
Capas de la pared celular de *Paraglomus sp.* (40X)

Descripción *Paraglomus sp.*

Esporas de color hialino a hialino oscuro y en algunos casos hialina crema, son globosas, subglobosas e irregulares, tiene un tamaño entre 60 y 140 μm , posee 3 capas hialinas. En PVLG la espora no cambia de color se mantiene hialina, en el reactivo de Melzer se torna de color amarillo oscuro. El tubo germinativo se forma a partir de la oclusión de la capa más interna de la espora.



Glomus sp1. con aumento de 40X



Glomus sp1. en PVLG con aumento de 40X



Glomus sp1. en reactivo de Melzer con aumento de 40X



Capas de la pared celular de *Glomus sp1.* (40X)

Descripción *Glomus sp1.*

La espora tiene un color amarillo hialino, posee una forma que va de globosa a subglobosa, el tamaño fluctúa entre 80 y 140 μm , con 4 capas hialinas, las más externas son ligeramente oscuras mientras que las 2 más internas son hialinas. Con PVLG la espora mantiene su color amarillo claro o hialino, con el reactivo de Melzer se vuelve amarilla oscura. El tubo germinativo emerge de una de las paredes internas de la espora.



Glomus sp2. con aumento de 40X



Glomus sp2. en PVLG con aumento de 40X



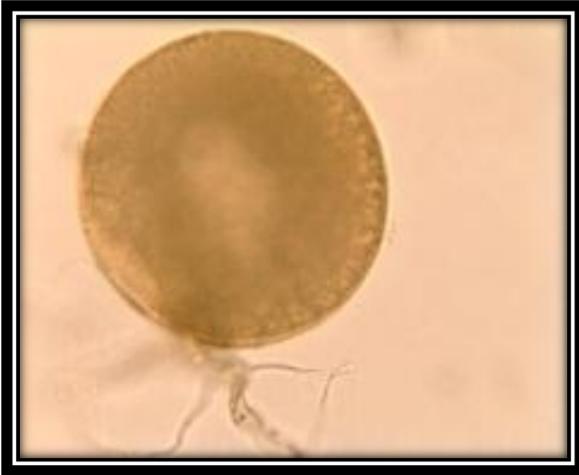
Glomus sp2. en reactivo de Melzer con aumento de 40X



Capas de la pared celular de *Glomus sp2.* (40X)

Descripción *Glomus sp2.*

Las esporas son de color amarilla hialina o anaranjada hialina, son de gran tamaño, en cuanto a su forma pueden ser globosas, subglobosas y de vez en cuando ovoide, su tamaño va de 100 a 240 μm de diámetro. Posee 4 número de capas entre naranjas, amarillas y oscuras, con pared membranosa o laminada, con la capa más interna ligeramente oscura de donde nace un tubo germinativo. Con PVLG la espora mantiene su color amarillo hialino, mientras que con el reactivo de Melzer se torna de un color hialino naranja-oscuro. El tubo germinativo nace de la capa más interna de la espora.



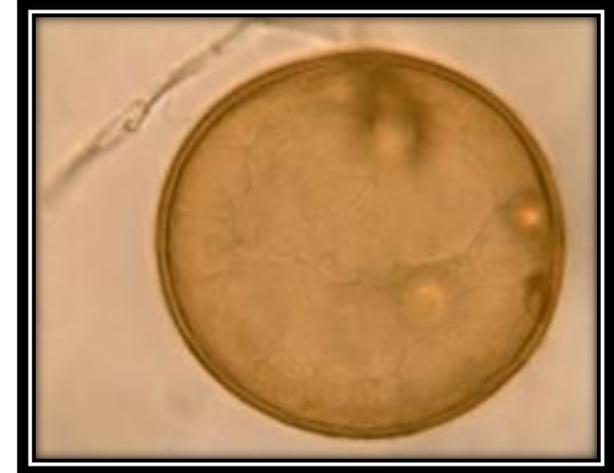
Acaulospora sp. con aumento de 40X



Acaulospora sp. en PVLG con aumento de 40X



Acaulospora sp. en reactivo de Melzer con aumento de 40X



Capas de la pared celular de *Acaulospora sp.* (40X)

Descripción *Acaulospora sp.*

Espora de color verde-amarilla crema, de forma globosa, relativamente grandes, con un tamaño que va de 240 a 360 μm , posee 3 capas amarilla cremas a naranja crema oscura la más interna, la capa externa es continua, son visibles en la pared más externas las placas de germinación. En PVLG la espora tiene un color entre amarillo y naranja oscuro a café claro, y en reactivo de Melzer son amarillas oscuras. Poseen placas o esferas de germinación que se forman en la superficie de la pared de la espora, un tubo ligeramente visible.

7. Discusión

La presencia de hongos micorrízicos vesículo arbusculares son evidentes en la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena. Se podría pensar que debido a las condiciones extremas a las que están expuesto los suelos de la Península de Santa Elena la presencia de estos hongos podría ser discutible, sin embargo los análisis realizados a estos suelos durante el estudio de la diversidad de estos hongos dio como resultado una significativa cantidad de especies tanto en los suelos intervenidos como en los no intervenidos, de ahí que podemos remontarnos al momento en que los HMA aparecen en nuestro planeta en el Devónico hace casi 460 millones de años, así mismo, el hecho de que más del 90% de las plantas terrestres (Fitobiontes) tengan uno o más de estos hongos asociados (microbiontes), muestra la eficiente asociación mutualista, su globalidad y la estrecha coevolución planta-hongo micorrízico, así como su relevancia en el reino vegetal.

Según Kyde y Gould (2000) los hábitats sin HMA virtualmente no existen y éstos incluyen desde áreas severamente perturbadas y erosionadas, minas, suelos contaminados por diferentes compuestos (metales pesados, hidrocarburos, plaguicidas) hasta ecosistemas no alterados por el hombre. Y esto se ve reflejado en la Comuna Zapotal que a pesar de poseer suelos áridos y semiáridos no está libre de la presencia de HMA. Tal como Varma (1996) reportó que los HMA son cosmopolitas y son encontrados en la mayoría de los ecosistemas incluyendo los áridos y semiáridos.

Los cambios en los niveles de colonización en relación con la densidad de esporas de hongos micorrízicos arbusculares ya han sido documentados en estudios de diversas especies vegetales (Mendoza *et al.*, 2002). En este estudio la cantidad total de esporas y el porcentaje de colonización estuvieron relacionados de manera significativa ($r= 0.7823$), sin embargo en algunos casos como sucede en el cultivo de maíz la correlación no fue significativa entre las dos variables, lo

contrario sucedió en el cultivo de plátano en donde la relación entre estas dos variables fue altamente significativa.

Diferentes factores pueden influir en la distribución y la estructura de la comunidad de los HMA, tales como los factores climáticos y edáficos (Bohrer *et al.*, 2001; Olivera y Olivera, 2005), la variación espacial y temporal (Uhlman *et al.*, 2004; Dandan y Zhiwei, 2007), el tipo de vegetación (van der Heijden, 1998; Burrows y Pflieger, 2002), la especificidad entre hongo-planta (Sanders, 2002), la perturbación (Hijri *et al.*, 2006; Dandan y Zhiwei, 2007) y la capacidad de esporulación de los HMA (Hart y Reader, 2002; Clapp *et al.*, 2002; González – Chávez *et al.*, 2007). Sin embargo, en este estudio los cambios en la estructura de la comunidad pudieran estar influenciados en mayor medida por la influencia del riego en las parcelas en donde se ha intervenido con actividades agrícolas, en tanto que en el área en donde no se encontraba intervenida por la actividad agrícola es muy probable que los datos muestren una estabilidad de la comunidad de hongos micorrízicos vesiculares.

En este estudio se logró identificar 7 especies que fueron aisladas del área con intervención agrícola y de otra área sin intervención agrícola, los cambios de diversidad se dieron más por el sistema de riego que al parecer ponen en actividad a los hongos micorrízicos arbusculares ya que en el área en donde no se ha intervenido con el sistema de riego la diversidad fue relativamente menor. Es claro que la subestimación en la población de esporas micorrízicas asociadas con una raíz es posible, debido a errores en la identificación y a la sucesión de los HMA con respecto al tiempo y espacio.

Debido a la naturaleza de la investigación, la cual se considera un estudio preliminar, al no existir ningún tipo de trabajo realizado en esta zona, debemos considerar que la morfología de esporas observadas en la rizósfera de las plantas sólo representa una pequeña parte de la diversidad de HMA colonizando las raíces, debido a que esporas morfológicamente idénticas pueden estar formadas

por especies genéticamente diferentes (Sanders *et al.*, 1995) o por especies de baja esporulación o por colonizadores fúngicos no esporulantes (Clapp *et al.*, 1995).

Bashan *et al.*, (2000) mencionaron que el potencial de inóculo de HMA en áreas desérticas es bajo y que este inóculo consta relativamente de mayor cantidad de fragmentos hifales que de esporas, los cuales están localizados en las capas más superficiales. Esto puede explicar muchas veces porque es tan grande la variación y la no relación de la cantidad de esporas con el porcentaje de densidad. Sin embargo, en otro estudio realizado por Reyes-Quintanar *et al.*, (2000) se ha comprobado que a pesar de los efectos de los agentes de perturbación por erosión, una zona erosionada con limitada fertilidad y baja población microbiana, la presencia de HMA en el sistema radical y la proliferación de esporas en el suelo rizosférico, se encontraron en abundante cantidad. Esta abundante población permitiría que los HMA nativos pudieran ser utilizados como inoculante potencial para usarse en el establecimiento de plantas micorrízicas nativas y auxiliares en los procesos de recuperación de zonas perturbadas, lo cual es una de los proyectos a futuro que se llevarán después de este estudio.

Glomus ha sido el principal género observado en áreas áridas y en dunas (Beena *et al.*, 2000a y b). Por ejemplo; *Glomus mosseae*, *Glomus dimorphicum*, *Glomus fasciculatum*, pero pueden estar presentes *Gigaspora* (*Gigaspora gigantea*), *Acaulospora* (*Acaulospora taiwania*) y *Sclerocystis* (Lara, 1987, Beena *et al.*, 2000a, b). Mohan y Mishra (1998) reportaron que esporas de los géneros: *Glomus*, *Gigaspora* y *Sclerocystis* estuvieron colonizando suelos desérticos de la India. De éstos, *Glomus fasciculatum* fue el hongo más comúnmente aislado. Dalpe *et al.* (2000) también observaron a *Glomus fasciculatum* desarrollándose en la rizosfera de *Faidherbia albida* creciendo en zonas semiáridas de África, y *Gigaspora margarita* fue aislada sólo desde 16.5m a 34 m de profundidad. En el caso de la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena las

especies pertenecientes al género *Glomus* fueron dominantes algo que es muy común en la mayoría de estudios realizados con los HMA, este género en total conformaba el 40% de los géneros de HMA presentes en estos suelos, siguiéndole en abundancia el género *Archaeospora* con un 21%, y el 39% restante lo representan los géneros *Paraglomus*, *Scutellospora*, *Acaulospora* y *Gigaspora* (Fig. 20).

La estacionalidad ambiental (secano o lluvias) es un factor determinante en la composición y variación de la población de HMA en las zonas áridas. En este aspecto, la respuesta de la colonización radical y la esporulación de los HMA es muy variable (Braunberger *et al.*, 1994; Jasper *et al.*, 1993). En algunos estudios realizados en México, particularmente en el Altiplano Potosino-Zacatecano, se ha denotado que la variación de la capacidad de esporulación de los hongos, no sólo depende del hospedante al que los HMA se encuentran asociados sino también, esta característica es modificada por la presencia de lluvias o períodos de sequía. Esto último tiene mucho sentido y guarda relación con las poblaciones de HMA en la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena, los datos obtenidos nos dan una idea muy clara de la distribución de las especies de HMA presentes tanto en aquella zona sometida a un riego constante y aquella que no está sometida al riego (Tabla 5).

En otro estudio llevado a cabo en la zona árida no erosionada de Zapotitlán de las Salinas, Puebla (Reyes, 2000) el efecto de la estacionalidad no fue un factor determinante tanto en la colonización como en la esporulación de los HMA. A pesar de que la esporulación fue ligeramente mayor en la época de lluvias, ésta no fue estadísticamente diferente a la cuantificada en época de secano. Al parecer, la esporulación de los HMA estuvo modificada por el tipo de hospedante al que estaban asociados. En cuanto a este enunciado podemos añadir que en la zona de la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena, el riego puede considerarse como época lluviosa y el área que no es sometida a riego como la época seca lo cual no se considera un factor determinante en cuanto a niveles de colonización y número de esporas entre un lugar y otro. Aunque si se podría

hablar de la diferencias de estas variantes si analizamos uno por uno los cultivos presentes, ya que unos son mucho más idóneos para la abundancia tanto de colonización, número de esporas y diversidad de especies de HMA.

La diversidad de HMA encontrada en la finca Agrofuturo ($H' = 1,87$), la cual resultó ser considerable pero relativamente menor y mayor a otros estudios realizados en diversas zonas del planeta. Por ejemplo *Hijri et al.*, encontraron una diversidad que varió de $H' = 0.35-1.30$. Estos resultados están por debajo de lo reportado Panwar y Tarafdar (2006) que varió de $H' = 3.25-3.72$. Estas diferencias pueden ser explicadas por los diferentes factores ambientales.

En cuanto a una comparación de la diversidad entre los suelos con cultivos agrícolas y los suelos con plantas nativas para probar la hipótesis nula de que las diversidades (suelo nativo y cultivos medidos con el índice de Shannon-Wiener) seguimos el procedimiento propuesto por Hutcheson en 1970, el valor de la distribución $t_{0.05(2)75.3503} = 2.04$. Como el valor de t obtenido es de (5.7399) es mayor que el valor de t en las tablas, rechazamos la hipótesis nula y concluimos que la diversidad en los cultivos agrícolas no es igual a la diversidad que se encuentra presente en los suelos de las plantas nativas. Mostrando una considerable influencia el sistema de riego que se aplica en los suelos que tienen cultivos agrícolas al tener una mayor diversidad de HMA que los suelos con plantas nativas.

Los resultados de la riqueza de especies registradas en este estudio previo enfatizan la necesidad de considerar y proteger la diversidad de HMA, y que estos microorganismos deben ser considerados a futuros para prácticas de manejo, debido a la creciente necesidad de mantener la diversidad y buen funcionamiento de los ecosistemas. De acuerdo con van der heijden *et al.*, (1998). La inminente reducción de la diversidad en la tierra, y su potencial amenaza sobre la sustentabilidad y estabilidad de los ecosistemas puede revertirse solo si todo el ecosistema incluyendo los componentes microbianos son protegidos y conservados.

8. Conclusiones

El estudio de la Diversidad de Hongos Micorrízicos en la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena, nos permitieron concluir que bajo las condiciones extremas de la zona, se observaron niveles relativamente altos de esporas nativas del suelo.

Las poblaciones presentan una diversidad media alta de acuerdo con el índice de Shannon-Wiener, al compararlo con otros trabajos realizados en zonas áridas y semiáridas.

Mediante el índice de Shannon-Wiener según el procedimiento propuesto por Hutcheson en 1970, rechazamos la hipótesis nula y llegamos a la conclusión de que la diversidad en los cultivos agrícolas no es igual a la diversidad que se encuentra presente en los suelos de las plantas nativas. Mostrando una considerable influencia el sistema de riego que se aplica en los suelos que tienen cultivos agrícolas al tener una mayor diversidad de HMA que los suelos con plantas nativas. Por lo tanto existe una ligera proporcionalidad entre la vegetación agrícola y la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares.

En este estudio la cantidad total de esporas y el porcentaje de colonización presentaron una correlación significativa, sin embargo en algunos casos como sucede en cultivo de maíz la correlación no fue significativa entre las dos variables, lo contrario sucedió con el cultivo de plátano en donde la relación entre estas dos variables fue altamente significativa.

En la agricultura y en especial si esta se está llevando a cabo en suelos con baja fertilidad como son los suelos áridos y semiáridos de la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena, no se debe pasar por alto el papel que representan los hongos micorrízicos vesículo arbusculares como un componente

esencial de los cultivos agrícolas. En la actualidad, la biotecnología aplicada a la agricultura ha permitido producir inoculantes de hongos micorrízicos vesículo arbusculares, los cuales se pueden aplicar bajo ciertas condiciones favorables.

Se identificaron 7 morfoespecies de hongos micorrízicos arbusculares pertenecientes a 6 géneros y cinco familias. La familia Glomaceae el mayor número de especies, entre las otras familias presentes están, Paraglomaceae, Archaeosporaceae, Acaulosporaceae, y finalmente la familia Gigasporaceae.

Glomus fue el género más abundante, frecuente y dominante.

El considerable potencial micorrízico y la riqueza de especies registradas en este trabajo se enfatiza en la necesidad de proteger de diversidad de Hongos micorrízicos arbusculares ya que en el futuro nos servirán para mejorar y mantener la diversidad y el buen funcionamiento de los ecosistemas.

Los hongos micorrízicos arbusculares como se ha podido demostrar en este estudio son un componente común e importante en la zona árida y semiárida de la Península de Santa Elena, la impresionante adaptación que han demostrado estos organismos a pesar de las condiciones extremas del ecosistema, merece una gran atención, en especial aquellos que buscan ecosistemas sostenibles.

9. Recomendaciones

Se debe considerar la forma como garantizar la conservación del suelo como un recurso natural vivo. Que sirve de sustento para las plantas, tanto aquellas de importancia agrícola como ecológica.

Se debe reconocer la importancia que los HMA, y considerarlo como uno de los mayores organismos del suelo en aportar en el desempeño de la dinámica nutricional de las plantas, dentro de los procesos de solubilización, mineralización, inmovilización, humidificación entre otros.

Es necesario un estudio más a fondo incluyendo las nuevas técnicas de biología molecular en el análisis de diversidad, para tener una idea más clara de las especies existentes en los suelos áridos y semiáridos de las Península de Santa Elena y de esta manera aportar en el desarrollo de la agricultura en dicha zona.

El empleo de los HMA nativas es de suma importancia para mejorar el desarrollo y disponibilidad de Fósforo (P) para los cultivos agrícolas. Para esto el agricultor puede mediante técnicas sencillas y de bajo presupuesto aislar y multiplicar micorrizas nativas, para usarse en los cultivos, es recomendable realizar la inoculación en etapas iniciales como son en la siembra o en el trasplante.

En un futuro es recomendable realizar una multiplicación masiva de HMA y de esta manera poder proveer a los agricultores de la Comuna Zapotal de estos organismos del suelo para fortalecer la agricultura sustentable y sostenible.

La producción y aplicación de inóculos que faciliten que los hongos micorrízicos se asocien a las plantas de interés comercial o ecológico, ayudando a la obtención de plantas micorrizadas para su futuro uso.

Realizar un rediseño de las formas tradicionales de producir contaminantes y destructores del medio ambiente en la producción agrícola, empezando con una mejor utilización y aprovechamiento del recurso suelo en donde se incluye a los HMA como un gran aporte en el avance y desarrollo de la agricultura en el país.

10. Bibliografía

- ❖ Alarcón, A. 2001 Actualización de la Taxonomía de los Glomales. *Terra*. 19: 103-104.
- ❖ Al-Karaki, GN. 2000. Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza* 10:51-54.
- ❖ Allen, M.F. 2007. Mycorrhizal fungi: Highways for water and nutrients in arid soils. *Vadose Zone Journal* 6:291-297.
- ❖ Allen, E.B. 1995. La restauración de zonas áridas perturbadas con especial referencia a los hongos micorrízicos. Pp. 167-177. In. R. Orellana, J. A. Escamilla y A. Larqué Saavedra (Eds.) *Ecofisiología vegetal y conservación de recursos genéticos*. CICY, Yucatán, México.
- ❖ Bago, B; Azcon-Aguilar, C; Shachar-Hill; Pfefer, P.E. 2000. El micelio externo de la micorriza arbuscular como Puente simbiótico entre la raíz y su entono. En: *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la micorriza arbuscular*. Eds. A. Alarcón y R. Ferrera-Cerrata. Mundi Prensa México, S.A. de C.V. 78-92.
- ❖ Barea JM, C Azcón-Aguilar y R Azcon. 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizae improve both symbiotic N₂ fixation and N uptake from soil as assessed with a ¹⁵N technique under field conditions. *New Phytologist* 106:717-725.

- ❖ Barea, J.M., Escudero, J.L. & Azcon-Aguilar, C. 1980. Effects of introduced and indigenous VA mycorrhizal fungi on nodulation, growth and nutrition of *Medicago sativa* in phosphate-fixing soils as affected by P Fertilizers. *Plant and Soil* 54(2) 283-296.

- ❖ Barea JM, Azcón-Aguilar C, Ocampo JA, Azcón R. 1991. Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. En: Olivares J, Barea JM, editors. *Fijación y movilización biológica de nutrientes Vol II. Capítulo 17. Fijación de N. y micorrizas*. Madrid. Consejo superior de Investigaciones científicas.

- ❖ Barea, J.M., & P. Jeffries. 1995. Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plants systems, pp. 521-559. In: B. Hock and A Varma (ed). *Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

- ❖ Barea, J., Perez, E. 2001. importancia de las micorrizas en el establecimiento y protección de las plantas en suelos degradados, medio ambiente, transferencia de tecnologías. En: *Phytoma*. España.

- ❖ Bashan, Y., E. A. Davis, A. Carillo-García y Linderman, R. G. 2000. Assesement of VA mycorrhizal inoculum potential in relation to the establishment of cactus seedlings under mesquite nurse-trees in the Sonoran Desert. *Appl. Soil. Ecol.* 14: 165-175.

- ❖ Beena KR, NS Raviraja, AB Arun y KR Sridhar. 2000b. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi on the coastal sand dunes of the west coast of India. *Current Sci.* 79:1459-1466.

- ❖ Berch, S.M. 1985. *Acaulospora sporocarpia*, a new sporocarpic species, and emendation of the genus *Acaulospora* (Endogonaceae, Zygomycotina). *Mycotaxon* 23: 409-418.
- ❖ Bernaza, G. y M.A. 2006. Las Micorrizas: Alternativa Ecológica para una Agricultura Sostenible.
- ❖ Bohrer, G., V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano y Ward, D. 2001. Effects of environmental variables on vesicular-arbuscular mycorrhizal abundance in wild population of *Vangueria infausta*. *J. Veget. Sci.* 12:279-278.
- ❖ Bolaños B., M. M; Rivillas., C. A.; Suárez V., S. 2000. Identificación de micorrizas arbusculares en suelos de la zona cafetera colombiana. *Cenicafé* 51(4): 245-262
- ❖ Buelvas., J.O., Peñates., W.N. 2008. Caracterización de géneros de hongos formadores de Micorrizas arbusculares (h.m.a) y vesículo arbusculares (h.m.v.a) nativas, asociadas con el pasto angleton (*Dichanthium aristatum*), bajo diferentes fuentes de Abonamiento en la hacienda casanare, municipio de tolú, Sucre. Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programa Zootecnia, Sincelejo: 15–117.
- ❖ Burrows, R.R., y Pflieger, F. L. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Can. J. Bot.* 80: 120-130.
- ❖ Blanco, FA., Salas, E. 1997. Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 21(1):55-67.

- ❖ Braunberger PG, LK Abbott y AD Robson. 1994. The effect of rain in the dry season on the formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas in the growing season of annual clover-based pastures. *New Phytologist* 127: 107-114.

- ❖ Castillo, C.G., I. Astroza, F. Borie y R. Rubio. 2008. Efecto de cultivos hospederos y no hospederos sobre propágulos micorrízicos arbusculares. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*, 8 (1), 37-54.

- ❖ Clapp, J.P., Young, J.P.W., Merryweather, J.W., Fitter, A.H. 1995. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytologist* 130:259-265.

- ❖ Clapp, J.P., T. Thorunn, T. J. Daniel y Young J.P. 2002. Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. En: M. G. A. van der Heijden y Sanders I. R. (eds.). *Mycorrhizal Ecology*. Springer.Berlin. pp. 201-224.

- ❖ Dandan, Z. y Zhiwei. Z. 2007. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the hot-dry valley of the Jinsha River, southwest China. *Appl. Soil Ecol.* 37: 118-12

- ❖ Dalpe Y, TA Diop, C Plenchette y M Gueye. 2000. Glomales species associated with surface and deep rhizosphere of *Faidherbia albida* in Senegal. *Mycorrhiza* 10:125-129.

- ❖ Declerck S, Devos B, Delvaux B y Plenchette C. 1994. Growth response of micropropagated banana plants to VAM inoculations. *Fruits*. 49 (2): 103-109.

- ❖ Declerck S, Plenchette C y Strullu DG. 1995. Mycorrhizal dependency of banana (*Musa acuminata* AAA group) cultivar. *Plant & Soil*. 176:183-187.

- ❖ Declerck S, Risède JM, Rufikiri G y Delvaux B. 2002. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on severity of root rot of bananas caused by *Cylindrocladium spathiphylli*. *Plant Pathology* 51: 109-115.

- ❖ Declerck, S., S. Granenbrouck, Y. Dalpé, S. Séguin, A. Grandmougin-Ferjani, J. Fontaine y M. Sancholle. 2000. *Glomus proliferum* sp. Nov.: a description based on morphological, biochemical, molecular and monoxenic cultivation data. *Mycologia* 92: 1178-1187.

- ❖ Del Val, C., Barea, J. M., y Azcón-Aguilar C. 1999. Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.*, 11, 261-269.

- ❖ Del Val, C., J. M. Barea, y C. Azcón-Aguilar. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy metals-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 718-723.

- ❖ Escobar-Acevedo CJ, Zuluaga-Pelaez JJ, Colorado-Gasca G, Paez D. 1998. Micorriza Vesícula Arbúscular (MVA) Recurso microbiológico para desarrollar una agricultura sostenible.

- ❖ Ferrera-Cerrato R. 1983. La micorriza vesículo-arbuscular en los diferentes agroecosistemas. Pp. 13-17. In: Symposium: La sequía y su impacto. Colegio de Postgraduados. Edo. de México.

- ❖ Fredeen, A.L. et al., 1989. Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max.* *Plant Physiol.* 89: 225-230.
- ❖ Friese CF, Allen MF. 1991. The Spread of VA Mycorrhizal Fungal Hyphae in the Soil; Inoculum Types and External Hyphal Architecture. *Mycologia.*83:409-418.
- ❖ García, B.F., Reig, J., Ibars, A., &Estrelles, E. 2002. La evolución de la simbiosis micorrízica. *Butil. Soc. Micol. Valenciana* 7: 49-54.
- ❖ García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A. 2002. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Exp. Bot.* 53: 1377 – 1386.
- ❖ García-Romero, I., Garcia-Garrido, J.M, Martinez –Molina E, Ocampo J.A. 1990. Possible influence of hydrolytic enzymes on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections of alfalfa. *Soil Biol. Biochem.* 22: 149-152.
- ❖ García-Romero, I., García-Garrido, J.M, Ocampo, J.A. 1991. Pectolytic enzymes in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 78: 343-346.
- ❖ Gerdemann J. W., Trappe J.M. 1974. The Endogonales in the Pacific Northwest., *Mycol. Mem.* 5, pp. 29-30.
- ❖ Gerdemann J, Nicholson T. 1963. Spores of Mycorrhizal Endogone Species Extracted from Soil by Wet Sieving and Decanting. *Trans Brit Mycol Soc.* 46:236-244.

- ❖ Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of technique for measuring vesicular – arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84: 489-500.
- ❖ González-Chávez MC. 2004 Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*. 23: 29-37.
- ❖ González-Chávez MC., Carrillo R., Wright S. & Nichols K. 2004 The role of glomalina protein by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*. 130: 317-323.
- ❖ González-Chávez, M.C., A. Alarcón y Ferrara-Cerrato, R. 2007. Biodiversidad funcional de los hongos micorrízicos arbusculares en zonas áridas semiáridas, En: Montaña N. M., S. L. Camargo-Ricalde, R. García-Sánchez y Monroy-Ata A. (eds). *Hongos micorrizógenos arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos*. Mundi-Prensa, Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, UAM-Iztapalapa, FES-Zaragoza-UNAM. México, D.F. pp. 12-24.
- ❖ Guerrero E, Rivillas C, Rivera E. 1996. Perspectivas de manejo de la micorriza arbuscular en ecosistemas tropicales. En Guerrero E. (Ed.), *Micorrizas. Recurso Biológico del suelo*. Fondo FEN Colombia, Bogotá. 181-201.
- ❖ Guerra, J.G.M., Ndiaye, A., de Assis, R.L. & Espíndola, J.A.A. 2007. Cultivos de cobertura como indicadores de procesos ecológicos. *LEISA Revista de Agroecología*. 22:20.

- ❖ Hart, M.M. y Reader, R. J. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 153: 335-344.
- ❖ Haselwandter, K. 1987. Mycorrhizal infection and its possible ecological significance in climatically and nutritionally stressed alpine plant communities. *Angew Bot* 61:107–114.
- ❖ Helgason, T., Merryweather, J.W., Denison, J., Wilson, P., Young, J.P.W., Fitter, A.H. 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90:371-384.
- ❖ Herman P. 2000. Biodiversity and evolution in mycorrhizae of the desert. Pp. 141-160. In: Ch W
- ❖ Hernández, M. I. 2000. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como complemento de la nutrición mineral de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*) [Tesis de Maestría], INCA.
- ❖ Hijri, B., Z. Sýkorová, F. Oehl, K. Ineichen, P. Mäder, A. Wiemkwn y Redecker, D. 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Mol. Ecol.* 15: 2277-2289.
- ❖ INVAM. 2006. Micorriza Information Exchange Web Site clearinghose for onformation on research, teaching, business of mycorrhizal simbiosis.

- ❖ Jamal, A., Ayub, N., Usman, M, y Khan, A. G. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance zinc and nickel uptake from contaminated soil by soyabean and lentil. *International Journal of Phytoremed.* 4 (39): 205-221.

- ❖ Johnson, D., Vandenkoornhuyse, P.J., Leake, J.R., Gilbert, L., Booth.R.E, Grime, J.P., Young, J.P.W., Read, D.J. 2003. Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytologist* 161:503-515.

- ❖ Klironomos, J.N., McCune, J., Hart, M., Neville, J. 2000. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecology Letters* 3:137-141.

- ❖ Koch, A.M., Croll, D., Sanders, I.R. 2006. Genetic variability in a population of arbuscular mycorrhizal fungi causes variation in plant growth. *Ecology Letters* 9:103-110.

- ❖ Kyde MM y AB Gould. 2000. Mycorrhizal endosymbiosis. Pp. 161-198. In: Ch.W Bacon and JF White Jr. (eds). *Microbial endophytes*. Marcel Dekker. Ney York. Basel.

- ❖ Lara F.V. 1987. Estudio de la endomicorriza (V-A) en los agroecosistemas de las zonas áridas y semiáridas del Altiplano Potosino-Zacatecano. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México. DF.

- ❖ Llerena, A. 2009. Efecto de la simbiosis entre *Bradyrhizobium japonicum* con Micorrizas arbusculares para mejorar la producción en el litoral

ecuatoriano. Proyecto de investigación. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.

- ❖ Leyval, C., Singh, B.R., y Janer, E.J. 1995. Occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some Norwegian soils influenced by heavy metals and soil properties. *Water, Air Soil Pollut.* 83, 203-216.
- ❖ Leyval C., Joner E. J., Del Val C., y Haselwandter K. 2000. Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Ed By S. Gianinazzi, H. Schuepp, J. M. Barea and Haselwandter.
- ❖ Leyval, C., Joner, E., Del Val, C., Haselwandter. K. 2001. Potencial of arbuscular mycorrhiza for bioremediation. *Mycorrhiza*. 7 (2): 308-317.
- ❖ Maherali, H., Klironomos, J.N. 2007. Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science* 316:1746-1748.
- ❖ Maia, L. C. and A. M. Yano-Melo. 2001. Germination and germ tube growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora albida* in different substrates. *Braz. J. Microbiol.* 32: 281-285.
- ❖ Martinez, L.B., Pugnaire, F.I. 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas* 18 (2): 44-54.
- ❖ Marx D.H., Cordell C.E., Maul S.B., Ruehle J.L. 1989. Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorius* in bare-root and container

seedlings nurseries. II. Efficacy of various vegetative and spore inocula. *New Forest* 3: 57-66.

- ❖ Mason, P.A., Musoko, M.O., Last, F.T. 1992. Shortterm changes in vesicular-arbuscular mycorrhizal spore populations in Terminalia plantations in Cameroon. In: Read, D.J., Lewis, D.H., Fitter, AH., Alexander, I.J (eds.). *Mycorrhizas in ecosystems*. Wallingford: CAB International. Pp.261-26.
- ❖ Mendoza M, Bocco G, López-Granados E, Bravo M. 2002. Implicaciones Hidrológicas del cambio de la cobertura vegetal y uso del suelo: una propuesta de análisis espacial a nivel regional en la cuenca cerrada del lago de Cuitzeo, Michiacán, *Investigaciones Geográficas*, diciembre, número 049. Universidad Nacional Autónoma de México Distrito Federal, México pp. 92-117.
- ❖ *Micorrizas: Recurso Biológico Del Suelo* by Eduardo Guerrero Forero, Concepcion Azcon and Concepcion Azcon (1996, Book, Illustrated).
- ❖ Miller, R.M. and J a s t r o w, J.D. 1992a. The appl i c a l i o n of VA mycorrhizae to ccosystem restoration and reclamaüon. In: M.P. Alien (ed) *Mycorrhiza! Functioning*, Chapman & Hall, New York, pp. 438-467.
- ❖ Miller, R.M. and Jastrow, J.D. 1992b. The role of inycorrhizal f u n g í in soil conservation. ín: G.J. Bclhlenfalvay and R.G. Lindernian (cds) *Mycorrhizae in Susiainable Agriculture*, Ain. Soc. Agron. Special Publication 54, American Society of Agronomy, Madison, pp. 29-44.

- ❖ Miller S L and Allen E B. 1992 Mycorrhizal Functioning. M F Allen Ed. Chapman & Hall. 301-332. 534 p.

- ❖ Mohan V y RN Mishra. 1998. Studies on VAM association in Marwar Teak (*Tecomella undulata* (Smith) Seeman) in desert soils of Rajasthan. *Mycorrhiza* 10:16-18.

- ❖ Moreno, C. E. 2001. *Métodos para medir la biodiversidad*. M&T–Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Zaragoza, 84 pp.

- ❖ Molina M., Mahecha L. y Medina M. 2005. Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en sistemas silvopastoriles. *Revista Colombiana de Ciencias pecuarias*. 18 (2): 162-175.

- ❖ Moora, M., Opik, M., Sen, R., Zobel, M. 2004. Native arbuscular mycorrhizal fungal communities differentially influence the seedling performance of rare and common *Pulsatilla* species. *Functional Ecology* 18:554-562.

- ❖ Morton J. & Benny G. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*.37: 471-491.

- ❖ Morton J. & Redecker D. 2001. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*. 93(1): 181-195.

- ❖ Munkvold, L., Kjoller, R., Vestberg, M., Rosendahl, S., Jakobsen, I. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 164:357-364.

- ❖ Neelam-Verma; N Verma, KSS Nair y J.K. Sharma (Eds). 1996. Impact of diseases and insect pests in tropical forests. Proceedings of the IUFRO Symposium, Peechi, India, 23-26.
- ❖ Oliveira, N. A. y Olivera, L. 2005. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in plantas of *Theobroma grandiflorum* schum and *Pullinia cupana* Mart. Of an agroforestry system in Central Amazonia, Amazonas State, Brazil. Brazilian J. Microb. 36: 262-270.
- ❖ Páez, O. G. Guerrero. 2006. Las Micorrizas: Alternativa Ecológica para una Agricultura Sostenible.
- ❖ Paillacho Cedeño, Fabián Isacc. 2010. Evaluación de la efectividad de las micorrizas arbusculares nativas sobre el desarrollo y estado nutritivo del Palmito (*Bactris gasipaes* HBK) en etapa de vivero, en Santo Domingo de los Tsáchilas. Carrera de Ingeniería de Ciencias Agropecuarias. ESPE-IASA II. Sede Santo Domingo.
- ❖ Panwar, J. y Tarafdar, J. C. 2006 a. Arbuscular mycorrhizal fungal dynamics under *Mitragyna parvifolia* (Roxb.) Korth. In Thar. Desert Appl. Soil Ecol. 34:200-208.
- ❖ Pawlowska, T. E., Chaney, R.L., Chin, M. y Charvat. 2000. Effects of metal phytoextraction practices on the indigenous community of arbuscular mycorrhizal fungi at a metal contaminated landfill. Appl. Environ. Microbiol. 6, 2526-2530.
- ❖ Pawlowska, T. E., Blaszkowski, J., y Ruhling, A. 1996. The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland .Mycorrhiza 6, 499-505.

- ❖ Phillips J.M., Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.

- ❖ Read, D.J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. *Experienta* 47:376-391..Sieverding, E.1991.Vesicular Arbuscular Mycorrhiza in Tropical Agrosystem. Deutsche Gesellschaft fur technische Zusammenarbeit (GTZ) GMBH, federal Republic of Germany. 371 p.

- ❖ Read, D.J. Mycorrhiza. 1999. The state of the art. En: *Mycorrhiza* 2nd. (A. Varma y B. Hock, eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p. 3-34.

- ❖ Read J, Koucheiki HK, Hodgson J. 1976. Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza in Natural Vegetation Systems. *New Phytol.*77:641-653.

- ❖ Redecker, D., Morton, J. & Bruns, T. 2000b. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 14: 276-284.

- ❖ Redecker D., Morton J.B. & Bruns T.D. 2000. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molec. Phylogenet. Evol.* 14: 276–284.

- ❖ Redecker D. 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73–80.

- ❖ Reyes Q.C.K. 2000. Estudio microbiológico de la rizosfera e interrzosfera de la relación entre *Neobuabauimia tetetzo* y dos leguminosas de la familia Mimosaceae. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de MéxicoDF., México.
- ❖ Reyes-Quintanar CK, R Ferrera-Cerrato, A Alarcón y S Rodríguez Z. 2000. Microbiología de la relación de nodricismo entre leguminosas arbóreas y *Neobuxbaumia tetetzo* en suelos no erosionados y erosionados en Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Pp. 56-68. In: A Alarcón y R Ferrera-Cerrato (Eds). Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. MundiPrensa. México.
- ❖ Reyes, J.I. 2002. Asociaciones biológicas en el suelo: la micorriza arbuscular (M A). Depto. de Biología. División de CBS. U A M-I. ContactoS 44, 5-10.
- ❖ Sánchez, P.A., Salinas, J.G. 1999. Low input technology for managing Oxisols and Ultisols in tropical America. Advances in Agronomy.34:279.
- ❖ Sánchez DE PM. Endomicorrizas en agroecosistemas colombianos. Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira; 1999.
- ❖ Sánchez, I. 2009. Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interés ecológicos en ambientes mediterráneos. Granada.

- ❖ Sanders IL, RM Alt, K Groppe, T Boller y A Wiemken. 1995. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist* 130: 419-427.
- ❖ Sanders, I.R., Clapp, J.P., Wiemken, A. 1996. The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems - a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 133:123-134.
- ❖ Sanders, R.I. 2002. Specificity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. En: M. G. A. van der Heijden y Sanders I. R. (eds.). *Mycorrhizal Ecol.* Springer. Berlin. Pp. 415-436.
- ❖ Schenck NC & Perez Y. 1990. Manual for identification of VA Mycorrhizal fungi. In : Schenck NC & Perez Y, eds., *INVAM*, University of Florida, Gainesville.USA. 241.
- ❖ Schenck, N. C., Perez, Y. 1990. Manual for identification of MVA mycorrhizal fungi. 3^a Edition. Florida: Sinergistic publication.
- ❖ Schüessler, A., Schwarzott, D., Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105:1413-1421.

- ❖ Schüßler A., Schwarzott D. & Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*. 105:1413-1421.
- ❖ Schwarzott D, Walker C, Schüßler A. 2001. *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is non-monophyletic. *Mol Phylogen Evol* 21:190–197.
- ❖ Serralde, A.M., Ramirez, M.M. 2004. Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Revista Corpoica*, Vol. 5 N°1. 31-40.
- ❖ Sieverding E. Manual de métodos de investigaciones en micorrizas vesículo-arbusculares en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira; 1983.
- ❖ Sieverding, E. 1984. Curso Nacional sobre Micorrizas; Aspectos básicos de la investigación en micorrizas vesículo arbusculares. Universidad Nacional de Palmira.
- ❖ Sieverding E. & Toro S. 1985. The genus *Entrophospora* in Colombia. In: GIANINAZZI-PEARSON V. & Gianinazzi S. (eds.), *Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae*, Dijon, France, INRA, Paris, pp. 621–626.
- ❖ Sieverding, E. 1989. Aspectos de la taxonomía y la identificación de hongos formadores de endomicorrizas V.A. In; *Investigaciones sobre endomicorrizas en Colombia*. 2 ed. Palmira, CIAT. P 209-223.

- ❖ Sieverding, E. 1989. Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29:369-390.
- ❖ Sieverding E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agro systems. German Technical cooperation (GTZ) Eschborn, pp 371.
- ❖ Sieverding E. 1991. Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Management in Tropical Agroecosystems. Technical Cooperation, Federal Republic of Germany. Eschborn. p. 271.
- ❖ Siqueira, J.O., y Moreira, E.M.S. “Microbial populations and activities in Spain”, A. 2003. Implications of microbial heavy metals. tolerance in the environment. *Reviews in undergraduate research*, 2, 1-6. 1997.
- ❖ Simon, L., Bousquet, R., Levesque, C., Lalonde, M. 1993. Origin and Diversification of Endomycorrhizal Fungi and Coincidence with Vascular Land Plants. *Nature*. 363: 67-69.
- ❖ Smith. S.E., Jakobsen, I. 2000. Spatial differences in acquisition of soil phosphorus between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 147:357-366.
- ❖ Smith, S.E., Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London. UK.

- ❖ Smith, F. A. & S. E. Smith. 1997. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol.* 137: 373-388.

- ❖ Smith, S. E. & D. J. Read. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Second edition. Academic Press, San Diego.

- ❖ Smith, S. E. & D. J. Read. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokio, Toronto.

- ❖ Sosa, T., Sánchez, N., Morales, E., Cruz, F. 2006. Interacción Micorrizas arbusculares *Trichoderma harzianum* (Moniliaceae) y efectos sobre el crecimiento de *Brachiaria decumbens* (Poaceae). *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 11 No. 1:43 – 54.

- ❖ Spain, J. L., E. Sieverding, and S. Toro T. 1989. *Scutellospora biornata*: A new species in the Endogonaceae from the Llanos Orientales of Colombia. *Mycotaxon* 35:219-227.

- ❖ Stümer S. L., Moton J. B. 1997. Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in *Glomus*. *Mycologia* 89, 72-81.

- ❖ Sylvia, D.M. & S.E Williams. 1992. Vesicular arbuscular mycorrhizae and environmental stress. Pp.101.124. In: Bethlenfalvay GJ and RG Linderman (Eds.). *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. ASA-Special Publication No. 54.

- ❖ Tulasne, L.R. and Tulasne, C. 1845. Fungi nonnulli hipogaei, novi v. minus cognito act. *Giorn. Bot. Ital.* 2: 55-63.
- ❖ Uhlman, E., C. Görke, A. Peteren y Oberwinkler, F. 2004. Comparasion of species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in winter rainfall areas of South Africa and summer-rainfall areas of Namibia. *Mycol. Prog.* 3:267-274.
- ❖ Vacacela, V.M., Tipos de micorrizas. Universidad de Pinar del Río “Hnos Saíz Montes de Oca”.
- ❖ Vandenkoornhuysen, P., Husband, R., Daniell, T.J., Watson, I.J., Duck, J.M., Fitter, A.H., Young, J.P.W. 2002. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology* 11:1555-1564.
- ❖ van der Heijden, M.G.A., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R. 1998a. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79:2082-2091.
- ❖ van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R. 1998b. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69-72
- ❖ Van der Heijden MGA; JN Klironimos, M Ursic, P Moutoglis, R Streitwolf-Engle, R Boller, A Weimken y IR Sanders. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- ❖ Varela, Y., González, M.C. 2007. Taxonomía de hongos formadores de micorriza arbuscular. Colegio de Posgrado en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Estado de México: 1-19.

- ❖ Varma RV. 1996. Interaction of VA-mycorrhizal fungi with rhizosphere and rhizoplane mycoflora of forest tree species in arid and semi-arid regions. Pp. 222-231. In: Mohan V, Neelam-Verma; N Verma, KSS Nair y J.K. Sharma (Eds). Impact of diseases and insect pests in tropical forests. Proceedings of the IUFRO Symposium, Peechi, India, 23-26 November 1993. 1996.
- ❖ Walker, C. and Sanders, F.E. 1986. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. *Mycotaxon* 27: 169-182.
- ❖ Walker, C. 1983. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon* 18: 443-455
- ❖ Walker, C. Schüßler A. 2004. Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota. *Mycol. Res.* 108, 979-982.
- ❖ Whitford, W.G. 1986. Decomposition and nutrient cycling in deserts. Pp. 93-118.
- ❖ Whitford. 1990. Biological feedbacks in global desertification. *Science* 127: 1043-1048.
- ❖ Zak J.C, R Sinsabaugh y W.P MacKay. 1995. Windows of opportunity in desert ecosystems: their implications to fungal development. *Canadian Journal of Botany* 73 (supplement 1):1407-1414.

11. Anexos

Fase de Campo



Área muestreada "Viveros de tomate"



Área muestreada "Cultivo de maíz"



Área muestreada "Viveros de tomate"



Área muestreada "Viveros de tomate"



Área muestreada "Cultivo de plátano"



Área muestreada "Cultivo de pimiento"



Área muestreada “Cultivo de pimientó”



Recolección de las sub-muestras “Plátano”



Recolección de las sub-muestras “Plátano”



Recolección de las sub-muestras “Tomate”



Área muestreada “Sin cultivos agrícolas”



Plantas nativas



Comuna Zapotal “Agrofuturo”



Almacenamiento de la muestra



Etiquetado de las sub-muestras



Etiquetado de las sub-muestras



Clasificación de las muestras

Fase de laboratorio



Separación de raicillas del suelo



Raicillas separadas para su posterior análisis



Selección de raíces



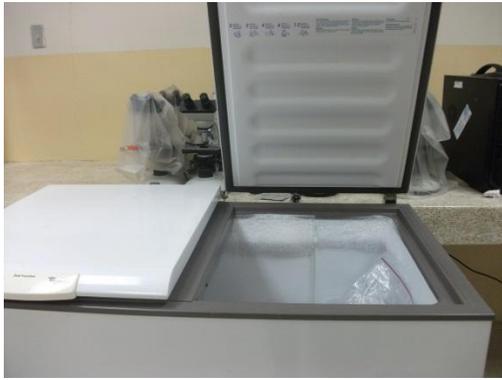
Selección del suelo



Materiales para la separación de raicillas



Muestra de suelo con raicillas



Nevera para el almacenamiento de las muestras



raicillas separadas y codificadas



Preparación del lacto-glicerol



Preparación del Hidróxido de potasio al 10%



Raicillas en pequeños matraces



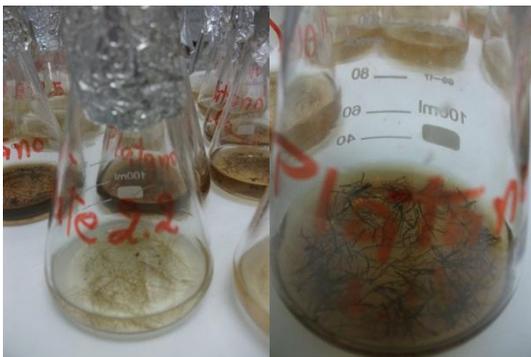
Colocando el hidróxido de potasio a las raicillas



Se cubre las raicillas con hidróxido de potasio



Se espera 24 horas para desechar el KOH



Perdida de pigmentos en raíces



Desechamos el KOH



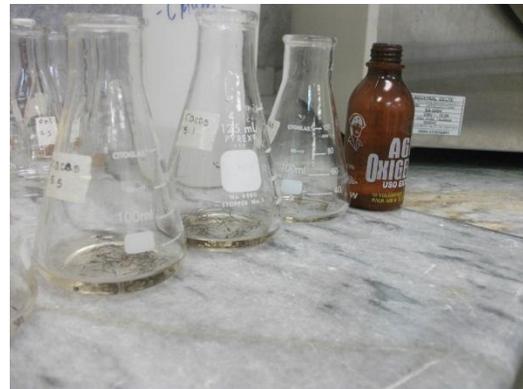
Raicillas con ácido clorhídrico al 10%



Se deja las raicillas con el HCl por 10 minutos



Se desecha el HCl



Raicillas con agua oxigenada



Se pone a baño de María



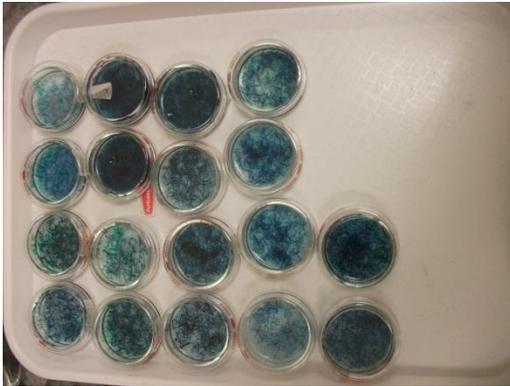
Preparación del colorante para la tinción



Se desecha el agua oxigenada



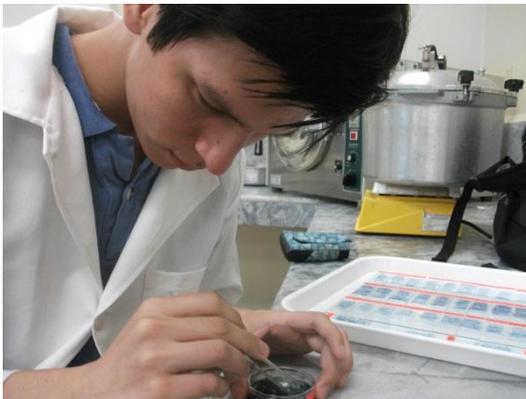
Se coloca el colorante para la tinción



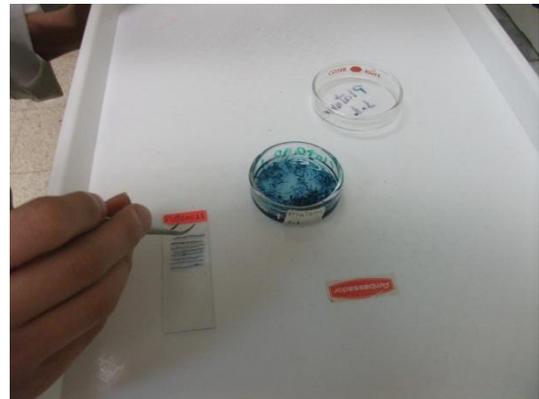
Se quita el exceso de colorante con lacto-glicerol



Raicillas teñidas en cajas de Petri



Montaje de las raicillas en placas porta objetos





Raicillas lista para el análisis de colonización



Observación al microscopio de las placas



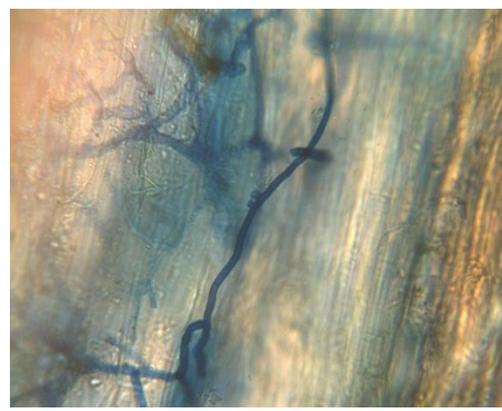
Documentación de los niveles de colonización en las raicillas de los diferentes cultivos



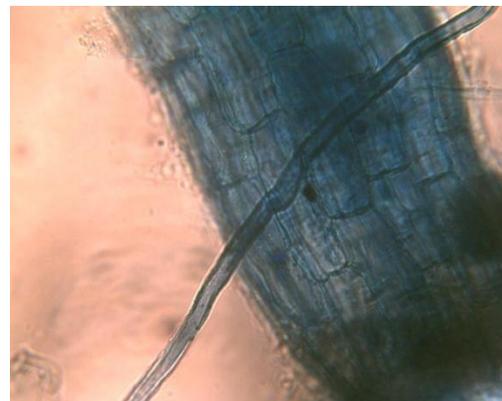
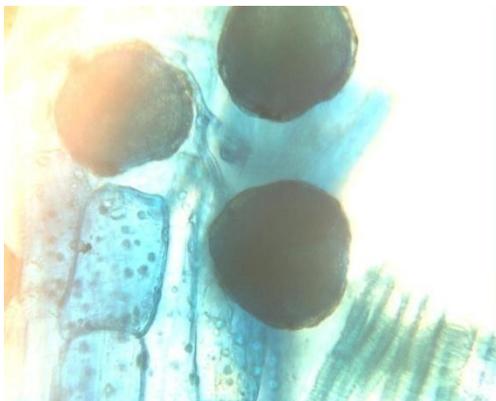
Colonización en raíces de cacao con aumento de 40X



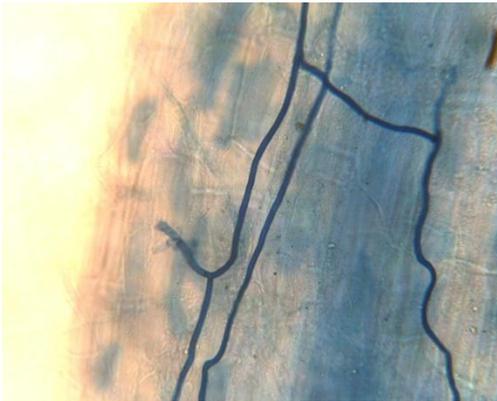
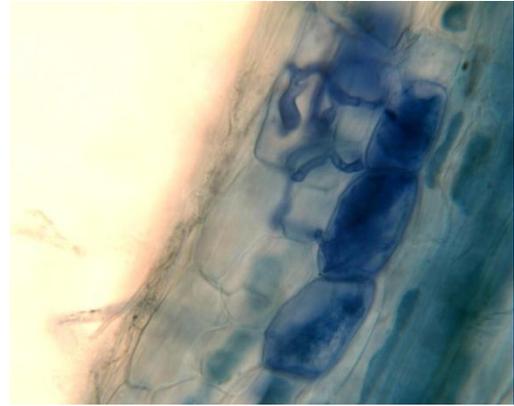
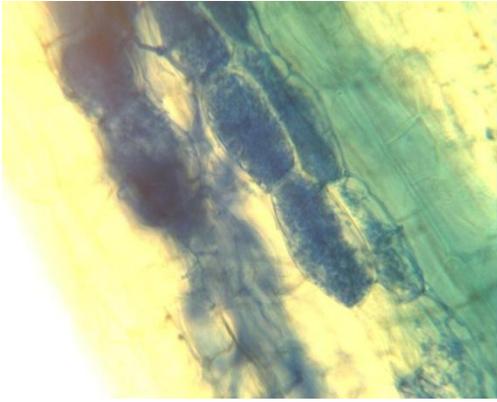
Colonización en raíces de maíz con aumento de 40X



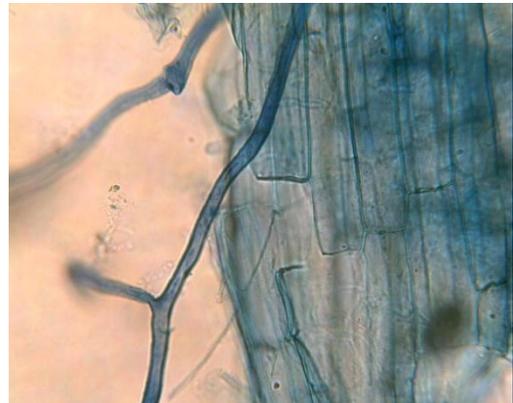
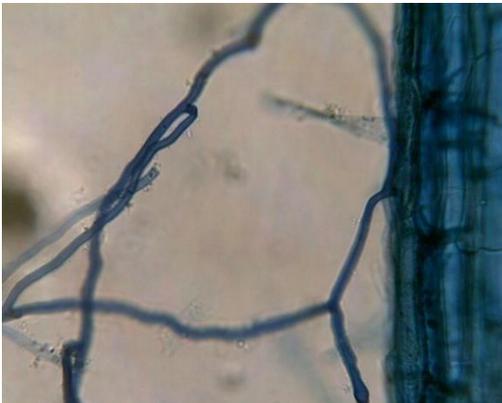
Colonización de raíces de plantas nativas con aumento de 40X



Colonización en raíces de pimiento con aumento de 40X



Colonización en raíces de plátano con aumento de 40X



Colonización en raíces de tomate con aumento de 40X



Preparación de la muestra para análisis de densidad



Se pesa 100g de suelos por cada cultivo

Se disuelve los 100g de suelos en un beaker



Tamices para tamizar la muestra de suelo

Tamizado de la muestra de suelo



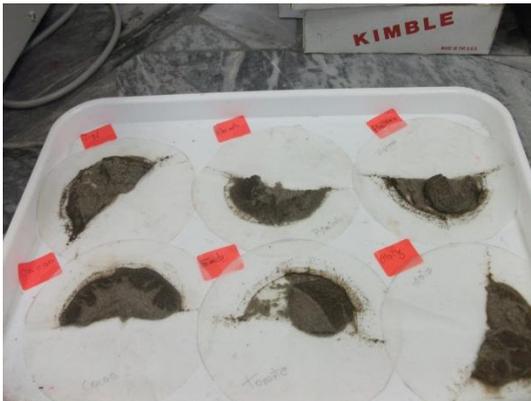
Tamizando la muestra de suelo



Colocando la muestra tamizada en papel filtro



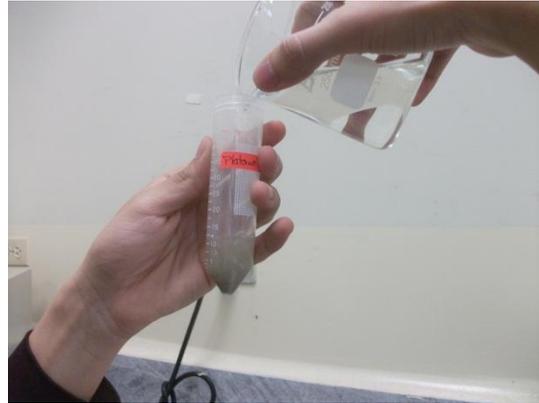
Colocando todo el material que se encuentra en el tamiz sobre el papel filtro



Dejamos secar la muestra de suelo



La muestra se coloca en los tubos para centrifuga



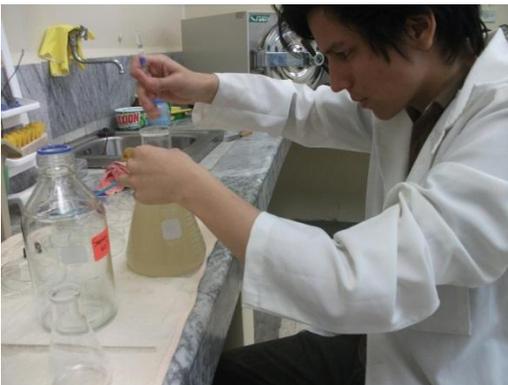
Preparando la muestra para el centrifugado



Pesando sacarosa



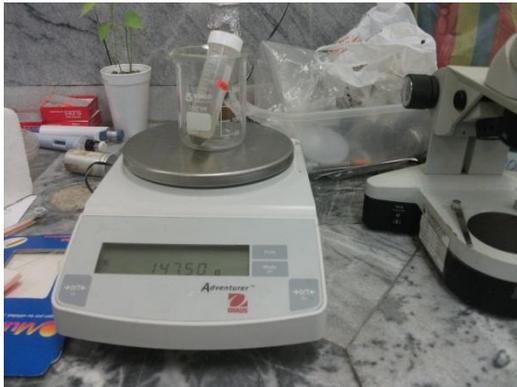
Preparando solución de sacarosa



Sacarosa al 60%



Se agrega la solución de sacarosa a la muestra



Pesar el tubo antes de meter en la centrifuga



Se centrifuga a 3500 rpm por 3 min.



Centrifugamos la muestra



Observamos la interfase



Se extrae el sobrenadante con una jeringa



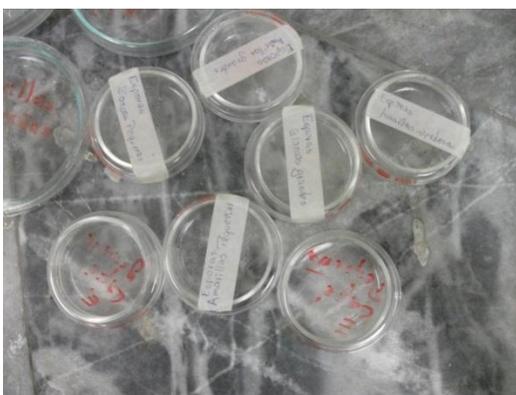
Se tamiza para eliminar el exceso de sacarosa



Caja de Petri rayada para facilitar el conteo de esporas



Observación en el estereoscopio para análisis de densidad y separación de morfoespecies



Morfotipos separados



Preparación del suelo para la inoculación de esporas



Esterilización de la arena



Turba



Sustrato compuesto de arena y turba



Cajas de Petri con sustrato



Plántulas lista para la inoculación



Selección de esporas para la inoculación

Fase de invernadero



Plántulas inoculadas



Riego de las plantas trampa para reproducción del HMA

