

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**Morfotipos de hongos endomicorrizógenos asociado al maíz
amiláceo (*Zea mays* L. amiláceo), y su capacidad antagónica
para el control de *Fusarium oxysporum***

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

PRESENTADO POR:

Mario Darwin Orihuela Ascarza

Ayacucho - Perú

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

Morfotipos de hongos endomicorrizógenos asociado al maíz amiláceo (*Zea mays* L. amiláceo), y su capacidad antagónica para el control de *Fusarium oxysporum*

Expedido : 11 de Agosto del 2016

Sustentado : 21 de Julio del 2017

Calificación : Excelente

Jurados :

.....
Ph. D., Marhleni Cerda Gómez

Presidenta

.....
M. Sc. Roberta Esquivel Quispe

.....
Ing. Walter Augusto Mateu Mateo

.....
Ph. D., Nery Luz Santillana Villanueva

Asesora

.....
Dr. Antonio JERI CHAVEZ

Decano Facultad Ciencias Agrarias

La vida se encuentra plagada de retos, y uno de ellos es la universidad, tras verme dentro de ella, me he dado cuenta que más allá de ser un reto, es la base no solo para mi entendimiento por aquello que me apasiona si no para lo que concierne a la vida y mi futuro, mi trabajo lo dedico a mis padres, a mis hermanas y en especial a ti mi gran amiga.

AGRADECIMIENTOS

La culminación de esta etapa profesional, no hubiese sido posible sin la intervención y el apoyo de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por permitir formarme profesionalmente y abrirme las puertas a tan distinguida escuela profesional, Agronomía.

La culminación de la presente investigación es en gran medida al apoyo y orientación del comité de tesis:

A la Ph. D. Marhleni CERDA GÓMEZ, por sus comentarios acertados y su impecable ética profesional.

A La Ph. D. Nery L. SANTILLANA VILLANUEVA, por compartir su amplia experiencia y conocimientos, así como su inestimable amistad.

A La M. Sc. Roberta ESQUIVEL QUISPE, por su compromiso y férrea dedicación a la investigación.

Al Ing. Walter MATEU MATEO, por su inconmensurable confianza y alientos de superación.

A los docentes de la escuela profesional de Agronomía, que si bien no puedo agradecerles de manera personal les debo mi formación profesional.

Así mismo, expreso mi agradecimiento a los diferentes laboratorios donde realice el estudio.

A todos mis amigos y compañeros que me han acompañado, y a aquellos que se involucraron para culminar mi trabajo de investigación les doy mis sinceros agradecimientos.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	18
Introducción	20
CAPÍTULO I	
Revisión Bibliográfica	22
1.1. Micorrizas Arbusculares	22
1.1.1. Historia.....	22
1.1.2. Tipos de Micorriza.....	23
1.1.3. Sistemática de los HMA.....	28
1.1.4. Características Morfológicas.....	29
1.1.5. Modo de Desarrollo.....	35
1.1.6. Taxonomía Basada en las Esporas.....	39
1.1.7. Mecanismo y Proceso de Colonización.....	41
1.1.8. Factores que Afectan el Establecimiento de HMA.....	43
1.2. Cultivo de Maíz	46
1.2.1. Centro de Origen.....	46
1.2.2. Clasificación Taxonómica.....	46
1.2.3. Características Morfológicas.....	46
1.2.4. Ecología del Cultivo.....	47
1.3. Agente Patógeno <i>Fusarium oxysporum</i>	48
1.3.1. Generalidades.....	48
1.3.2. Taxonomía.....	48
1.3.3. Reproducción.....	49
1.3.4. Síntomas.....	49
1.4. Control Biológico	50
1.4.1. Generalidades.....	50
1.4.2. Mecanismos De Antagonismo.....	50
1.5. Antecedentes	52
CAPÍTULO II	
Materiales y Métodos	55

2.1. Ubicación	55
2.2. Zonas de Estudio	55
2.3. Análisis de Caracterización	55
2.4. Material Biológico	60
2.5. Variables En Estudio	60
2.6. Procedimiento	61
2.6.1 Extracción de Esporas.....	61
2.6.2 Cuantificación de Esporas.....	62
2.6.3 Caracterización Morfológica de Esporas.....	63
2.6.4 Almacenamiento de Esporas.....	64
2.6.5 Germinación De Esporas.....	64
2.6.6 Cultivo Monoespecífico.....	64
2.6.7 Identificación de Hongos Micorrízicos Arbusculares Simbiontes para <i>Zea Mays</i> L. amiláceo.....	67
2.6.8 Tinción de Raíces.....	71
2.6.9 Determinación de la Colonización en Raíces.....	72
2.6.10 Extracción de Metabolitos Solubles.....	73
2.6.11 Capacidad Antagónica de los HMA, Frente a <i>F. oxysporum</i>	74
2.7 Diseño Experimental	75
2.8 Procesamiento de Datos	76
CAPÍTULO III	
Resultados Y Discusión	77
3.1. Cuantificación de Poblaciones Micorrízicas	77
3.2. Identificación de HMA Simbiontes Para <i>Zea mays</i> L. amiláceo...	81
3.2.1. Glomerales.....	82
<i>Funneliformis Mosseae</i>	82
<i>Glomus Ambisporum</i>	85
<i>Glomus Maculosum</i>	89
<i>Sclerocystis Sinuosum</i>	92
<i>Septoglomus Constrictum</i>	96
<i>Claroideoglomus Etunicatum</i>	99
3.2.2. Diversiporales.....	102

<i>Diversispora Spurca</i>	102
<i>Acaulospora Sp. 1</i>	106
<i>Acaulospora Sp. 2</i>	109
3.3. Evaluación del Nivel de Colonización de HMA	120
3.4. Capacidad Antagónica de los HMA, Frente a <i>F. Oxysporum</i> ...	128
3.4.1. Inhibición Micelial.....	128
3.4.2. Tasa de Crecimiento Micelial y Descripción de la Antibiosis	131
Antibiosis.....	134
3.4.3. Efecto Máximo De La Antibiosis.....	141
 CAPÍTULO IV	
Conclusiones y Recomendaciones	
4.1 Conclusiones	150
4.2 Recomendaciones	152
Referencias Bibliográficas	153
Anexo	177

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Clasificación taxonómica de los Hongos Micorrízicos Arbusculares... 29	29
Cuadro 1.2. Requerimientos términos según ciclo fenológico del maíz..... 48	48
Cuadro 2.1. Análisis de Caracterización. Fundo Wayllapampa-UNSCH, 2557 msnm. Pacaycasa. 2016..... 57	57
Cuadro 2.2. Análisis de Caracterización. Centro Experimental Canaán UNSCH, 2743 msnm. Andrés Avelino Cáceres. 2016..... 58	58
Cuadro 2.3. Análisis de Caracterización. Comunidad de Luyanta, 3217 msnm. Socos. 2016..... 59	59
Cuadro 2.4. Relación objetivo con campo visual del microscopio compuesto modelo MC-300A.....69	69
Cuadro 2.5. Categorías para la micorrización por HMA..... 73	73
Cuadro 3.1. Análisis de varianza para Cuantificación de esporas de HMA..... 78	78
Cuadro 3.2. Diversidad y Densidad poblacional de Hongos Micorrízicos Arbusculares..... 114	114
Cuadro 3.3: Análisis de varianza para la densidad poblacional de hongos micorrízicos arbusculares en época seca..... 115	115
Cuadro 3.4: Análisis de varianza para la densidad poblacional de hongos micorrízicos arbusculares en época de lluvias..... 115	115
Cuadro 3.5. Diversidad y Frecuencia Relativa de Hongos Micorrízicos Arbusculares..... 118	118
Cuadro 3.6. Análisis de varianza para Porcentaje de Micorrización de raíces de maíz amiláceo (hifas), (<i>Zea mays</i> L. amiláceo)..... 120	120
Cuadro 3.7. Análisis de varianza para Porcentaje de Micorrización de raíces de maíz amiláceo (arbúsculos), (<i>Zea mays</i> L. amiláceo)..... 122	122
Cuadro 3.8. Análisis de varianza para Porcentaje de Micorrización de raíces de maíz amiláceo (vesículas), (<i>Zea mays</i> L. amiláceo)..... 122	122
Cuadro 3.9. Análisis de varianza para Inhibición Micelial del Hongo patógeno <i>Fusarium oxysporum</i> 128	128

Cuadro 3.10. Análisis de varianza para Tasa de Crecimiento Micelial, del patógeno <i>Fusarium oxysporum</i> , en medio PDA + MIN + metabolitos inhibitorios solubles.....	132
Cuadro 3.11. Análisis de varianza, para la determinación del Crecimiento Micelial, del patógeno <i>Fusarium oxysporum</i> , en medio PDA+ MIN metabolitos inhibitorios solubles.....	142
Cuadro 3.12 ANVA adicional para el Valor máximo de respuesta, para la inhibición micelial de los aislamientos de HMA sobre el patógeno <i>Fusarium oxysporum</i>	146
Cuadro 3.13. Resumen del Efecto máximo de respuesta.....	148

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 3.1. Prueba de Tukey (0.05) para la cuantificación poblacional de HMA por 100g de suelo, en las tres zonas de estudio para la época seca y de Lluvia.....	79
Gráfico 3.2. Prueba de t-student, para la media de muestras emparejadas, para la cuantificación poblacional de HMA por 100g de suelo, en las tres zonas de estudio, en la época seca y de lluvia.....	80
Gráfico 3.3. Prueba de Tukey (0.05), para la densidad poblacional de esporas de HMA, en la época seca y época de lluvias.....	116
Gráfico 3.4. Nivel de colonización por hifas, arbusculos y vesículas, en cultivo monoespecífico de <i>Zea mays</i> L. amiláceo.....	121
Gráfico 3.5. Prueba de Tukey (0.05), para el porcentaje de colonización de hifas en raíces de maíz amiláceo (<i>Zea mays</i> L. amiláceo), por HMA en cultivos monoespecíficos.....	123
Gráfico 3.6. Prueba de Tukey (0.05), para el porcentaje de colonización de Arbusculos en raíces de maíz amiláceo (<i>Zea mays</i> L. amiláceo), por HMA en cultivos monoespecíficos.....	124
Gráfico 3.7. Prueba de Tukey (0.05), para el porcentaje de colonización de Vesículas en raíces de maíz amiláceo (<i>Zea mays</i> L. amiláceo), por HMA en cultivos monoespecíficos.....	125
Gráfica 3.8. Prueba de Dunnett (0.05), para el porcentaje de Inhibición micelial del patógeno <i>Fusarium oxysporum</i> , in vitro, con metabolitos inhibitorios solubles a partir de HMA.....	130
Gráfica 3.9. Prueba de Dunnett (0.05), para tasa de crecimiento micelial del patógeno <i>Fusarium oxysporum</i> , in vitro, con metabolitos inhibitorios solubles a partir de HMA.....	133
Gráfico 3.10. Análisis de regresión para el crecimiento micelial del hongo patógeno <i>Fusarium oxysporum</i> , en medio PDA + MIN (Potato Dextrosa Agar + Caldo mínimo en Sales 1:1 v/v), más	

metabolitos inhibitorios solubles de HMA.....	145
Gráfico 3.11. Prueba de Tukey (0.05) para el Valor máximo de respuesta, para la inhibición micelial de los aislamientos de HMA sobre el patógeno <i>Fusarium oxysporum</i>	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Esporocarpo y agregado, típico de <i>Funneliformis mosseae</i>	82
Figura 3.2. Características morfológicas de la espora <i>Funneliformis mosseae</i>	83
Figura 3.3. Características sub-celular de la espora <i>Funneliformis mosseae</i>	83
Figura 3.4. Características de la hifa de sostén, de la espora <i>F. mosseae</i>	84
Figura 3.5. Estructuras micorrízicas, en la raíz-aislamiento <i>F. mosseae</i>	85
Figura 3.6. Esporocarpo y tallo monohifal de <i>Glomus ambisporum</i>	86
Figura 3.7. Características morfológicas de la espora <i>Glomus ambisporum</i>	86
Figura 3.8. Características sub-celular de la espora <i>Glomus ambisporum</i>	87
Figura 3.9. Características de la hifa de sostén, de la espora <i>Gl. ambisporum</i>	88
Figura 3.10. Estructuras micorrízicas, en la raíz-aislamiento <i>Gl. ambisporum</i>	89
Figura 3.11. Características morfológicas de la espora <i>Glomus maculosum</i>	90
Figura 3.12. Características sub-celular de la espora <i>Glomus maculosum</i>	90
Figura 3.13. Estructuras micorrízicas, en la raíz-aislamiento <i>Gl. maculosum</i>	92
Figura 3.14. Esporocarpo de <i>Sclerocystis sinuosum</i>	93
Figura 3.15. Características del esporocarpo de <i>Sclerocystis sinuosum</i>	93
Figura 3.16. Características morfológicas de la espora <i>Sclerocystis sinuosum</i>	94
Figura 3.17. Estructuras micorrízicas, raíz-aislamiento <i>Scl. sinuosum</i>	95
Figura 3.18. Características típicas de <i>Septoglomus constrictum</i>	96
Figura 3.19. Características morfológicas de la espora <i>Sp. constrictum</i>	97
Figura 3.20. Características sub-celular de la espora <i>Sp. constrictum</i>	98
Figura 3.21. Estructuras micorrízicas, raíz-aislamiento <i>Sp. constrictum</i>	98
Figura 3.22. Características morfológicas de <i>Claroideoglomus etunicatum</i>	99
Figura 3.23. Características sub-celular de la espora <i>Cl. etunicatum</i>	100
Figura 3.24. Características de la hifa de sostén de la espora <i>Cl. etunicatum</i>	101
Figura 3.25. Estructuras micorrízicas, raíz-aislamiento <i>Cl. etunicatum</i>	102
Figura 3.26. Características morfológicas de la espora <i>Diversispora spurca</i>	103
Figura 3.27. Características Sub-celular de la espora <i>D. spurca</i>	104
Figura 3.28. Características de la hifa de sostén de la espora <i>D. spurca</i>	104
Figura 3.29. Estructuras micorrízicas, raíz-aislamiento <i>D. spurca</i>	105

Figura 3.30. Características morfológicas de la espora <i>Acaulospora sp. 1</i>	107
Figura 3.31. Características sub-celular de la espora <i>Acaulospora sp. 1</i>	107
Figura 3.32. Características del sáculo esporífero de <i>Acaulospora sp. 1</i>	108
Figura 3.33. Estructuras micorrízicas, raíz- aislamiento <i>Acaulospora sp. 1</i>	109
Figura 3.34. Características Morfológicas de la espora de <i>Acaulospora sp. 2</i>	110
Figura 3.35. Características sub-celular de la espora de <i>Acaulospora sp. 2</i>	111
Figura 3.36. Reacción bioquímica de la GW2de <i>Acaulospora sp. 2</i>	111
Figura 3.37. Estructuras micorrízicas, raíz-aislamiento <i>Acaulospora sp. 2</i>	112
Figura 3.38. Colonización de raíces por hifas, arbusculos y vesículas, al interior de la raíz de <i>Zea mays</i> L. amiláceo.....	127
Figura 3.39. Micelio de pigmento carotenoide (izquierda), e hifas sin pigmentación (derecha), típicos para todos los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> , en los diferentes tratamientos.....	135
Figura 3.40 Microconidias, típicos para los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> , en los diferentes tratamientos.....	135
Figura 3.41. Aislamiento <i>Fusarium oxysporum</i> , en medio de cultivo PDA (Potato Agar Dextrosa, fig. a), y medio de cultivo modificado PDA + MIN (Potato Agar Dextrosa + Caldo Mínimo en Sales 1:1 v/v, Fig. b), de características típicas para la colonia <i>in vitro</i> , y medio PDA.....	136
Figura 3.42. Característica del aislamiento <i>F. oxysporum</i> , en MIS, <i>Acaulospora sp. 2</i>	136
Figura 3.43. Característica del aislamiento <i>F. oxysporum</i> , en MIS, <i>Acaulospora sp. 1</i>	137
Figura 3.44. Característica del aislamiento <i>F. oxysporum</i> , en MIS, <i>Septoglomus constrictum</i>	137
Figura 3.45. Característica del aislamiento <i>F. oxysporum</i> , en MIS, <i>Diversispora spurca</i>	138
Figura 3.46. Característica del aislamiento <i>F. oxysporum</i> , en MIS, <i>Glomus mosseae</i>	138
Figura 3.47. Característica del aislamiento <i>F. oxysporum</i> , en MIS, <i>Glomus maculosum</i>	139

Figura 3.48. Característica del aislamiento <i>F. oxysporum</i> , en MIS, <i>Cl. etunicatum</i>	139
Figura 3.49. Característica del aislamiento <i>F. oxysporum</i> , en MIS, <i>Sclerocystis sinuosum</i>	140
Figura 3.50. Característica del aislamiento <i>F. oxysporum</i> , en MIS, <i>Glomus ambisporum</i>	140
Figura 3.51. Crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> , en medio PDA+ MIN+MIS procedentes de <i>Scl. sinuosum</i>	151

ANEXO

ANEXO 1. Simbología utilizada.....	178
ANEXO 2. Preparación de reactivos.....	178
ANEXO 3. Preparación de medios de cultivo.....	180
ANEXO 4. Ubicación de las zonas de estudio.....	182
ANEXO 5. Ubicación de las zonas de recolección de muestras biológicas.....	183
ANEXO 6. Estándar de muestras rizosférica-época.....	184
ANEXO 7. Extracción y desinfección superficial de esporas.....	185
ANEXO 8. Tamizado de suelo rizosférico.....	186
ANEXO 9. Extracción de esporas de la raíz.....	186
ANEXO 10. Tubo de ensayo para centrifuga (izquierda), suspensión de agua y esporas (superior) y sucrosa (50% p/v; inferior); centrifuga y tubos dispuestos (derecha).....	187
ANEXO 11. Esporas de HMA, vista al estereoscopio.....	187
ANEXO 12. Desinfección superficial de esporas.....	188
ANEXO 13. Filtrado del material de los tubos de ensayo.....	189
ANEXO 14. Cuantificación de esporas.....	189
ANEXO 15. Esquema del proceso de tinción de raíces.....	190
ANEXO 16. Especímenes con 100 días desde la inoculación.....	190
ANEXO 17. Lavado y selección de raíces, y homogenización de pesos.....	191
ANEXO 18. Proceso de tinción de raíces.....	191
ANEXO 19. Obtención de raíces teñidas libres de exceso de pigmento.....	192
ANEXO 20. Determinación de colonización en raíces.....	192
ANEXO 21. Observación de estructuras micorrízicas.....	193
ANEXO 22. Contraste de raíces no micorrizadas y micorrizadas (vista a 100x; superior y 40x; inferior).....	194
ANEXO 23. Caracterización morfológica de esporas.....	195
ANEXO 24. Almacenamiento de esporas.....	196
ANEXO 25. Germinación de esporas.....	196
ANEXO 26. Preparación del semillero.....	197

ANEXO 27. Inoculación de raíces a los 10 días desde la germinación.....	197
ANEXO 28. Montaje de esporas.....	198
ANEXO 29. Medición del tamaño del campo visual, objetivo 40x.....	198
ANEXO 30. Medición del tamaño de esporas relación imagen campo visual.	199
ANEXO 31. Medición de tamaño de esporas.....	199
ANEXO 32. Cartilla de colores Pantone ® Color Bridge™ CMYK.....	200
ANEXO 33. Extracción e incorporación de esporas en el medio MIN + Ac. Aspártico.....	201
ANEXO 34. Filtrado del caldo MIN al séptimo día desde la incorporación de HMA y ácido aspártico.....	201
ANEXO 35. Homogenización del medio de cultivo PDA + MIN, conteniendo material filtrado.....	202
ANEXO 36. Placas de Petri con PDA + MIN (material filtrado), corte y Extracción de medio de cultivo PDA con <i>Fusarium oxysporum</i>	202
ANEXO 37. Disposición del disco de PDA con <i>Fusarium oxysporum</i> (edad 7 días), en medio PDA+MIN+MIS.....	203
ANEXO 38. Rutas metabólicas de los tetraterpenoides.....	204
ANEXO 39. Fuente de Ac. Aspártico.....	205
ANEXO 40. Resultado del análisis de caracterización realizado al suelo del Fundo Wayllapampa, Pacaycasa, 2016; certificado por el laboratorio de Análisis de Suelo y Análisis Foliar “Nicolás Roulet” del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNSCH.....	206
ANEXO 41. Resultado del análisis de caracterización realizado al suelo del Centro Experimental Canaán, Andrés Avelino Cáceres, 2016; certificado por el laboratorio de Análisis de Suelo y Análisis Foliar “Nicolás Roulet” del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNSCH.....	207
ANEXO 42. Resultado del análisis de caracterización realizado al suelo de la Comunidad de Luyanta, Socos, 2016; certificado por el laboratorio de Análisis de Suelo y Análisis Foliar “Nicolás Roulet” del Programa de Investigación en Pastos	

y Ganadería de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNSCH.....	208
ANEXO 43. Temperatura máxima, media, mínima, correspondiente a la campaña agrícola 2016, registrado en la Estación Meteorológica INIA – Ayacucho.....	209

RESUMEN

La investigación se realizó con los objetivos de determinar los diferentes morfotipos de hongos micorrízicos arbusculares simbioses para *Zea mays* L. amiláceo, y evaluar la capacidad antagónica de estos hongos para el control de *Fusarium oxysporum*. Las muestras de suelo y raíces de maíz procedieron de los distritos de “Pacaycasa, Fundo Wayllapampa”, “Andrés Avelino Cáceres, Centro Experimental Canaán” y “Socos, Comunidad de Luyanta, del Centro poblado de Santa Rosa de Cochabamba”, de la provincia de Huamanga, Región Ayacucho, las mismas que fueron estudiadas y evaluadas en el “Laboratorio de Microbiología Agrícola y en el Laboratorio de Rizobiología, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga”. Se determinó la densidad poblacional de HMA y su variación en las épocas de lluvia y sequía, determinando los morfotipos de HMA, y porcentajes de colonización de cada uno de los especímenes a partir del cultivo monoespecífico, considerando a *Zea mays* L. amiláceo como cultivo trampa. Los resultados mostraron que la mayor densidad poblacional de esporas/100g de suelo se aprecia en la época seca, en la que se obtuvo promedios de 2393, 3164 y 1421 y 262, 334 y 152 en época de lluvias, para “El fundo Wayllapampa”, “Centro experimental Canaán” y “Comunidad de Luyanta”, respectivamente. Se determinaron 21 morfotipos resumidos a 9 especies, no habiendo diferencia en cuanto a la riqueza de HMA entre épocas de estudio para cada zona, las especies fueron identificadas como *F. mosseae*^{wc}, *Gl. ambisporum*^{wcl}, *Gl. maculosum*^w, *Scl. sinuosum*^{wcl}, *Sp. constrictum*^{wcl}, *Cl. etunicatum*^{cl}, *D. spurca*^{wc}, *Acaulospora sp. 1*^{wcl} (posible *Ac. laevis*) y *Acaulospora sp. 2*^{wc} (posible *Ac. Lacunosa*). Se determinó que *Zea mays* L. amiláceo, es susceptible a la colonización de los HMA, *Sp. constrictum* (80.5%), *Cl. etunicatum* (77.5%), *D. spurca* (60.5%), *Gl. mosseae* (52.0%), *Gl. ambisporum* (47.0%), y *Gl. maculosum* (38.0%), y posee una baja susceptibilidad a los HMA, *Acaulospora sp* (26.5.0%), *Acaulospora sp 1* (17.0%), y *Scl. sinuosum* (13.0%). La capacidad antagónica de los HMA sobre el hongo patógeno *F. oxysporum*, se determinó mediante el “efecto-antibiosis”, extrayendo metabolitos secundarios de los HMA en medio MIN, y desarrollando un medio de cultivo 50% MIN + Metabolitos extraídos

y 50% medio PDA. Los resultados confirman que todos los aislamientos con excepción de *Acaulospora sp 2*, produjeron metabolitos inhibitorios para *F. oxysporum*, los mismos que redujeron la tasa de crecimiento micelial del hongo patógeno, donde *Gl. ambisporum* inhibe el desarrollo micelial del patógeno en un 48.38% con una tasa de crecimiento micelial de 36.0%, (en un periodo de 7 días), este es el mayor valor de inhibición así como el menor valor en cuanto a tasa de crecimiento. El efecto máximo de los metabolitos inhibitorios solubles de HMA, inducen al hongo patógeno a una fase estacional anticipada, formando micelio aéreo blanco carente de pigmentación, y escaso micelio vegetativo, esto se apreció en todos medios con MIS de los HMA que generaron el efecto-antibiosis con excepción de *Scl. sinuosum*. El efecto máximo de antibiosis fue producido por *Gl. ambisporum* a los 8.828 días y un máximo de inhibición de 44.54%.

INTRODUCCIÓN

Los hongos formadores de Micorrizas Arbusculares (HMA) son organismos eucariotas haploides, recientemente reubicados al Phylum Glomeromycota (Redecker et al., 2013) poseen hifas cenocíticas, las esporas son la principal estructura de propagación que utilizan. Pérez (2001), considera que los HMA son simbiontes biótrofos obligados que solo pueden completar su ciclo de vida cuando colonizan las raíces de la planta hospedera. Estos biótrofos establecen asociaciones mutualistas con aproximadamente el 80% de las plantas terrestres vasculares susceptibles a esta simbiosis (Ferrera-Cerrato & Alarcon, 2007).

El entendimiento de la importancia de la diversidad de los hongos micorrízicos arbusculares, en los ecosistemas ha sido un gran reto. El hecho que muchas plantas puedan ser colonizadas por la mayoría de hongos HMA indica una ausencia de especificidad de los hospederos, lo que puede contribuir al mantenimiento de la diversidad fungal en los suelos. Los estudios de la diversidad de los hongos formadores de micorrizas arbusculares y la ecología de la simbiosis se han soportado en datos de la ocurrencia y frecuencia de diferentes tipos de esporas y métodos de clasificación morfológicos, los cuales están limitados por la pequeña cantidad relativa de diversidad morfológica entre especies. Es frecuentemente difícil identificar los taxones en material de campo de los aislamientos por la condición y preservación variables de las esporas (Antoniolli, 1999). Rodríguez et al., (2004) indican que la producción de esporas está influenciada y puede ser afectada por diversos factores, como épocas del año, tipos de suelo, entre otros; asimismo, el porcentaje de colonización varía en diferentes especies.

Los hongos micorrízicos también, participan activamente en la protección de las raíces contra posibles patógenos como el *Fusarium* sp. (Harrier y Watson, 2004). *Fusarium oxysporum* afecta en todos los estados de crecimiento de la planta de maíz en diferentes partes de la misma, desarrollando enfermedades; el hongo puede sobrevivir en estado latente o activo en restos vegetales después de la cosecha (Schulthess., 2002). Presenta una distribución cosmopolita y es endémico en zonas maiceras de todo el mundo (Mendoza et al., 2003), Son saprofitas en algunas de sus fases de crecimiento y pueden o no desarrollar una fase de reproducción sexual según la especie (Finch y Finch, 1983; Alexopoulos & Mims, 2000).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares se hallan ampliamente distribuidas en el globo, nuestra región no es la excepción a esto, sin embargo, en la región, estos simbioses no han sido identificados de manera correcta, dificultando la comprensión y apreciación de la diversidad de estos, así mismo no han sido estudiados a nivel experimental, el potencial antagónico frente a patógenos como el *Fusarium oxysporum*, por lo que se considera una alternativa para hacer frente al estrés biótico en el suelo.

Teniendo en cuenta las consideraciones expuestas, se ha planteado el presente trabajo de investigación, con la finalidad de alcanzar los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Determinar los morfotipos de hongos formadores de Micorrizas Arbusculares asociadas al cultivo de maíz amiláceo (*Zea mays amiláceo* L.), y reconocer su capacidad antagónica para el control de *Fusarium oxysporum*.

Objetivos específicos:

1. Cuantificar las poblaciones de hongos formadores de micorrizas arbusculares, en dos épocas del año (época seca y época de lluvia) para tres zonas de estudio (Fundo Wayllapampa, Centro Experimental Canaán y Comunidad de Luyanta).
2. Identificar los hongos formadores de micorrizas arbusculares simbioses para el

Zea mays L. amiláceo.

3. Determinar la presencia de hongos micorrízicos arbusculares, en las raíces del hospedero, y el grado de colonización en las raíces.
4. Determinar el grado de inhibición micelial del hongo *Fusarium oxysporum*, por los Hongos micorrízicos arbusculares, asociados al cultivo de maíz amiláceo (*Zea mays amiláceo* L.), para reconocer su capacidad antagónica.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. MICORRIZAS ARBUSCULARES

1.1.1. HISTORIA

El término micorriza fue acuñado por el botánico alemán Albert Bernard Frank en 1885, y procede del griego ‘mykos’ que significa hongo y del latín ‘rhiza’ que significa raíz, es decir, que literalmente quiere decir “hongo-raíz”, definiendo así la asociación simbiótica, o mutualista, entre el micelio de un hongo y las raíces de una planta terrestre (Harrison, 1997), él estableció que dicha asociación era mutualista dados los beneficios que reporta la misma para ambos participantes, y comprende la penetración radical por parte del hongo y la carencia de respuesta perjudicial hacia éste, por parte de la planta hospedera.

La relación entre hongos formadores de micorrizas arbuscular (HMA), tiene un registro fósil de alrededor de 460 millones de años, similar al tiempo cuando las plantas colonizaron la tierra (Simon et al., 1993; Wilkinson, 2001; Wang & Qiu, 2006). Por ello, estas asociaciones están presentes en casi todos los grupos de plantas terrestres (Simon, 1996). Aparecen en Briofitos, sobre todo en Hepáticas, muchos Pteridófitos, en todos los grupos de Gimnospermas y en la mayoría de Angiospermas. No están presentes en algunas familias de Angiospermas en las que han desarrollado resistencia, como: Ciperáceas, Juncáceas, Cariofiláceas o Crucíferas (Harley & Harley, 1987; Allen, 1991; López-Sánchez & Honrubia, 1992; Honrubia et al., 1992).

Originalmente los hongos formadores de micorrizas arbusculares se hallaban clasificado en la división Zygomycota, por el Congreso Internacional de Micología de 1994; un consenso la reubicó en la división Glomeromycota, basados en la reconstrucción filogenética que subyace a esta clasificación (Redecker; Schüßler; Stockinger; Stürmer; Morton & Walker, 2013).

1.1.2. TIPOS DE MICORRIZA

Peyronel et al., (1969), propusieron dividir a las micorrizas en tres grupos, según la estructura que la micorriza forma; Ectomicorrizas o formadoras de manto; Ectoendomicorrizas, que incluye arbutoides y monotropoides; y las Endomicorrizas, caracterizadas por la colonización intracelular de las células del córtex de la raíz, y que a su vez se subdividen en Ericoides, Orquidoides y Arbusculares.

- ECTOMICORRIZA

Se presenta en general en las plantas leñosas perennes, coníferas donde la ramificación de la raíz es corta y lignificada, que dificultan la captura óptima de nutrimentos. En este caso, el hongo, además de incrementar la absorción de sales minerales, tiene la capacidad de utilizar fuentes nitrogenadas no disponibles para las plantas y de producir antibióticos (Bruns et al., 2002).

Plantas hospederas: gimnospermas y angiospermas.

División de hongos: Zygomycota, Basidiomycota, Ascomycota y Deuteromycota (Álvarez & Ramos, 2004).

- ECTOENDOMICORRIZA

Los hongos que las producen colonizan de forma dual las raíces; externamente formando un manto cortical e internamente penetrando intracelularmente en el córtex, formando unas estructuras de tirabuzón llamadas coil (Álvarez & Ramos, 2004).

- ENDOMICORRIZA

Es el tipo de asociación hongo-raíz más extendido en la naturaleza, no desarrolla red de Harting y colonizan intracelularmente la corteza de la raíz por medio de

estructuras especializadas denominadas arbusculos, que actúan como órganos de intercambio de nutrimentos entre la célula vegetal y el huésped. Algunos géneros de estos hongos forman también otro tipo de estructuras llamadas vesículas, compuestas principalmente por lípidos las cuales actúan como estructura de reserva y de reproducción asexual. Estas vesículas están presentes intercelularmente en la corteza de la raíz y se consideran reservorios de nutrimentos para el hongo. La presencia tanto de arbusculos como de vesículas, dio lugar a que la simbiosis se conociera originalmente como vesículo-arbuscular (VAM), sin embargo, no todas las especies de hongos forman vesículas, por lo que en la actualidad la asociación se conoce como micorriza arbuscular (HMA), (Corwell et al., 2001; Tang et al., 2001; Strullu & Strullu, 2007; Miransari et al., 2009).

Los micelios del hongo no solo penetran en la capa cortical de la raíz, sino que también se alojan en el interior de sus células, y en parte son digeridas por la planta hospedante, que se beneficia de sus albuminoides y nitrógeno orgánico. Las Endomicorrizas no son tan específicas, por lo que una especie puede colonizar a muchas especies de plantas y se adaptan mejor a las condiciones del medio porque sus esporas crecen con facilidad y pueden sobrevivir sin contacto con las raíces.

Esas son dos causas principales por las cuales abundan más en la naturaleza que el resto de las Micorrizas. Las micorrizas arbusculares (HMA) son más abundantes en climas cálidos con suelos secos, tierras de pastos y bosques caducifolios con alta tasa de renovación de materia orgánica, y donde el aporte de fósforo es limitado (Selosse et al., 2004).

MORFOLOGÍA DEL HONGO DENTRO DE LA RAÍZ

Las esporas de los hongos micorrízicos arbusculares que se encuentran en la rizosfera, penetran a la raíz en un periodo de 20 a 25 días, observándose un desarrollo de los tubos germinales y penetración de la hifa a la planta hospedera. A este primer periodo se le denomina “fase lag”, durante la segunda fase después de 30 a 35 días, la micorriza se desarrolla y extiende en las raíces del hospedero.

Finalmente en la tercera fase el hospedero fructifica y envejece, la proporción de las raíces micorrizadas o no micorrizadas permanecen constantes (Sanders, 2002).

✓ **Esporas y esporocarpos**

Las esporas y esporocarpos son estructuras que contienen en su interior lípidos y glúcidos por lo que son considerados como órganos de reserva y de infección. Estas estructuras pueden conservar su potencial de infección aun después de tres años (Tummerup & Kidby, 1985).

Las esporas son producidas rápidamente en presencia de una planta hospedera, de manera que a los 4 meses en promedio son producidas miles de nuevas esporas del mismo tipo. Las esporas son formadas en el micelio extraradical o intraradical, dependiendo de la especie, o en estructuras más o menos definidas denominadas esporocarpos, aunque en ciertos géneros la presencia de esporocarpos es importante, las características individuales de las esporas son las que principalmente se utilizan para su identificación. Las esporas difieren en forma, estructura, contenido citoplasmático, color, tamaño, número de paredes, vías de germinación y presencia o ausencia de esporocarpos (Mosse et al., 1981; Morton, 1990).

✓ **Hifas**

Las hifas de los hongos micorrízicos arbusculares son aseptadas, presentan dos tipos de redes miceliales; una externa y una interna. La red externa se origina a lo largo de la raíz del hospedero en donde forma puntos de penetración para luego extenderse en forma tridimensional, en la superficie de la rizosfera; la hifa interna por otro lado, forma un apresorio en la raíz del hospedero, invadiendo los tejidos de las células de la corteza, las células epidérmicas de esta por su parte sufren un incremento en el tamaño del núcleo y el citoplasma; este último se desarrolla de manera intracelular formando una vaina delgada.

El nuevo plasmalema que ha sido sintetizado por el hospedero, separa esta vaina de las células que se encuentran alrededor. A poca distancia de los ápices terminales se desarrollan los arbusculos; las hifas nunca penetran en la endodermis, tejidos

vasculares, meristemos, clorofílicos, partes viejas de la raíz, o en meristemos especializados de órganos vivos (Clapp et al., 2002).

✓ **Arbúsculos**

El intercambio de nutrientes del huésped al hongo y viceversa se da por los arbúsculos, siendo éstos, entonces la estructura más importante en la simbiosis. Al principio, el crecimiento de los arbúsculos es similar al de las hifas intercelulares, pero la fina ramificación característica de los arbúsculos puede llenar la célula por completo. La vida media de los arbúsculos es de siete días, y tienen como función principal el intercambiar sustancias nutritivas procedentes del exterior de la raíz. Estos órganos están compuestos por un tronco que ha sido formado por la hifa que ha penetrado en las células de la corteza, (localizada alrededor del cilindro vascular), después de ello la hifa se desarrolla formando una estructura coraloide altamente ramificada; se incrementa el citoplasma de la celular, el almidón desaparece, el núcleo se alarga y divide, y por último los organelos incrementan su número. Después de haberse formado los arbúsculos, estos sufren un proceso de transporte activo, en el que existe un intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo; por último las células y sus estructuras retornan a su estado normal en el que los gránulos de almidón vuelven a reaparecer. Esta célula esta lista para que se forme un nuevo arbúsculos (Clapp et al., 2002).

✓ **Vesículas**

Se definen las vesículas como órganos de reserva del hongo. Posterior o simultaneo a la formación de arbúsculos del hongo, aparecen en las raíces, son de formas globosas y/u ovals. Se forman intracelular o intercelularmente. Estas estructuras actúan como fuente de reserva o como estructura de reproducción asexual (Clapp et al., 2002).

INTERACCIÓN PLANTA HONGO

Las micorrizas funcionan como prolongaciones de las raíces en la rizosfera. El incremento en la absorción del agua, es uno de los principales beneficios que las plantas obtienen en las zonas áridas, mejorando la absorción de agua en el suelo y las raíces, a diferencia de raíces sin micorrizas (Skujins, 1991; Augé, 2000).

Allen (2006), hace referencia a las micorrizas como reservorios de agua durante la noche, cuando la planta no la utiliza. De esta manera, el hongo puede crecer y llegar a nuevos micro depósitos de agua en el suelo. Durante el día, el agua es trasladada hacia las planta para su uso (Pugnaire & Valladares, 1999). Las plantas pueden perder de un 5% a 10% del total de carbohidratos fotosintetizados debido a esta relación (Jakobsen & Rosendahl, 1990).

Por otro lado, se ha visto que el gasto de carbohidratos llega a beneficiar a la planta, ya que el hongo genera una mayor extensión de hifas (Van de Heijden & Horton, 2009), y así el costo-beneficio a largo plazo es positivo. Aun cuando algunos autores mencionan que parte del carbón secuestrado por el hongo podría pasar de planta a planta (Francis y Read, 1984; Lerat et al. 2002; Carey et al. 2004); se han visto casos claros en donde esto no sucede (Zabinski et al. 2002; Pfeffer et al., 2004; Voets et al., 2008), junto con esto se ha visto que un incremento en la temperatura del suelo acelera la respiración de los HMA ocasionando una mayor demanda energética a la planta (Hawkes et al., 2008).

Rodríguez et al. (2008) encontraron que diferentes especies de micorrizas causan efectos diferenciales en la absorción de nitrógeno (N), fosforo (P) y potasio (K) al igual que en la tolerancia al estrés hídrico en el maíz (*Zea mays* L. amiláceo). De igual forma, a menor concentración de P mayor es la colonización de HMA en la rizosfera. Muchos estudios han demostrado los beneficios que otorgan las micorrizas a las plantas en cuanto al P (Pearson & Jakobsen, 1993; Chen et al., 2005), ya que el P es utilizado en mayor medida en ciertas etapas de alta necesidad energética, como cuando la planta es joven o durante la fructificación (Jones, 2005).

Egerton-Waburton et al., (2001) observaron que el enriquecimiento del suelo con N puede favorecer la proliferación de especies del género *Glomus* que sean potencialmente menos mutualistas y más parasíticas. De igual forma, Colins et al. (2003), demostraron que a mayor cantidad de N disminuyen las estructuras de las HMA. Así como se ha observado que las micorrizas son capaces de adquirir N tanto orgánico como inorgánico (Hawkins et al., 2000); incluso de manera directa de la materia orgánica presente en el suelo (Leigh et al., 2008), así mismo se han

observado intercambios de N entre plantas a través de los HMA (He et al., 2003). Otros elementos como el cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn), azufre (S) y hierro (Fe), son transportados de las HMA hacia las plantas (Gray & Gerdemann, 1973; Gildon & Tinker, 1983; Liu et al., 2000; Zhu et al., 2001). Goransson et al., (2008), encontraron toxicidad de las HMA hacia el aluminio. Por lo cual es importante comprender la complejidad de interacción que se dan entre HMA y los elementos disponibles en su medio.

Algunos autores mencionan la importancia que las comunidades vegetales tienen sobre las comunidades de micorrizas y viceversa, siendo determinante la interrelación y coevolución de ambos grupos (Bever et al., 2001; Hart et al., 2003; Lovelock et al., 2003). Klindromos et al., (2001), relacionan de manera directa la diversidad vegetal y su productividad con la presencia de micorrizas. De igual forma participan activamente en la protección de raíces contra posibles patógenos como los *Fusarium*, *Phytophthora* y *Verticillum* (Harrier & Watson, 2004).

MEDIO AMBIENTE Y ESPORULACIÓN

La interacción planta-hongo es mediada por una serie de señales químicas de ambos organismos. Algunos compuestos producidos por las plantas, como los sesquiterpenos, inducen la ramificación de las hifas de los HMA (Akiyama et al., 2005), flavonoides, flavonoles y estringolactonas son importantes en los primeros pasos de colonización del hongo (Gianinazzi-Pearson et al., 1994); así como para el metabolismo y ramificación de la micorrizas (Parniske, 2008). Se han advertido que los hospederos tienen un efecto considerable en el crecimiento y desarrollo de las micorrizas más que en el tiempo de esporulación de las mismas (Bever et al., 1996). Una amplia diversidad de factores bióticos y abióticos tienen influencia en el desarrollo de las micorrizas y por consiguiente su esporulación. De acuerdo a esto es importante considerar estos factores al momento de dilucidar sobre posibles relaciones directas o indirectas que tenga el ambiente con los HMA.

1.1.3. SISTEMÁTICA DE LOS HMA

La sistemática de estos organismos se reestructuró el 2013, considerando los

caracteres morfológicos y tomando en cuenta caracteres que se pudieran interpretar evolutivamente, un consenso la reubico en la división Glomeromycota, basados en la reconstrucción filogenética que subyace a esta clasificación (Redecker; Schüßler; Stockinger; Stürmer; Morton, & Walker. 2013), quienes propusieron la siguiente clasificación.

Cuadro 1.1. Clasificación taxonómica de los Hongos Micorrízicos Arbusculares

PHYLUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENEROS		
Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	Glomeraceae	Glomus		
				Funneliformis		
				Rhizophagus		
				Septoglomus		
					Claroideoglomeraceae	Claroideoglomus
		Paraglomerales	Paraglomaceae	Paraglomus		
		Achaesporales	Archaeosporaceae	Archaeospora		
			Ambisporaceae	Ambispora		
			Geosiphonaceae	Geosiphon		
		Diversisporales	Acaulosporaceae	Acaulospora		
				Entrophospora		
			Gigasporaceae	Cetraspora		
				Dentiscutata		
				Racocetra		
Gigaspora						
Scutellospora						
Diversisporaceae	Diversispora					
	Redeckera					
Pacisporaceae	Pacispora					

Fuente: Redecker et al., (2013). International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal. [INVAM]. Recuperado de <http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification>

1.1.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Las definiciones de los caracteres morfológicos y bioquímicos de las esporas micorrízicas arbusculares que se presentan a continuación se basa en los datos de caracterización realizados por: Walker (1983, 1986); Morton (2002); Blaszkowski et al., (2001); Schüßler et al., (2001); Morton & Redecker, (2001). Morton, (2016); Walker & Schüßler, (2004); Spain et al. (2006).

Según Morton (2016), cada espora, independientemente de la especie, forma una pared de esporas. Además, todas las especies del orden Diversisporales, producen

esporas con 1-3 paredes internas denominadas "paredes germinales". Sin embargo, sólo en *Gigaspora spp.*, la pared germinal está asociada físicamente con la pared de esporas. En las esporas de los otros géneros, las paredes germinales se originan y funcionan independientemente en su pared de esporas.

PARED DE LA ESPORA

La pared de esporas proviene de una hifa esporogénica, ésta se desarrolla en la punta de esta hifa, (*Diversispora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Pacispora* y *Paraglomus spp.*), o dentro de ésta, como el caso de 'Entrophospora', algunas especies de *Glomus* producen esporas intercalares, o de un mismo lado (*Acaulospora*, *Ambispora*, y *Archaeospora spp.*). Esta capa se desarrolla y diferencia sus componentes junto con el diámetro creciente de una espora. La diferenciación de los componentes de la pared de las esporas se detiene cuando la espora ha dejado de expandirse. Posteriormente, se pueden observar algunos pequeños cambios en el color, grosor y rigidez de esta pared, la pared de esporas de las especies de hongos arbusculares reconocidos consiste en al menos dos capas (Morton & Redecker, 2001). Las capas de una pared de esporas y paredes germinales pueden diferir tanto en propiedades fenotípicas como bioquímicas. Hasta la fecha se reconocieron siete fenotipos de capas de pared de esporas.

a) Capa mucilaginosa

Esta capa forma la superficie de esporas de algunos *Glomus spp.*, e. g. *Gl. claroidesum*, *Gl. mosseae* y *Gl. multiforum*. En las esporas juveniles, esta capa es lisa o algo rugosa. Cuando está presente, se tiñe intensamente de color rojo en el reactivo de Melzer. Sin embargo, se deteriora rápidamente y se desprende, incluso en esporas jóvenes, por lo que su presencia en esporas maduras es poco común (Morton, 2016).

b) Capa semiflexible

Una capa semiflexible es lisa cuando no se deteriora, suele ser delgada, pero algo menos flexible que las capas delgadas y flexibles presentes en las paredes germinales internas de algunas especies o de los géneros *Acaulospora* y *Gigaspora*.

En muestras trituradas, la capa semiflexible se separa frecuentemente de una capa adherente y no se arruga como una capa flexible. Cuando la capa semiflexible cubre una capa laminar de pared de esporas, su longevidad es mayor que la de una capa mucilaginosa, aunque esta capa rara vez está presente intacta en esporas maduras. En todas las especies reconocidas por tener una capa semiflexible en la estructura de sus esporas, esta capa no reacciona en el reactivo de Melzer (Morton, 2001 & Redecker, 2001).

c) Capas de deterioro y desprendimiento

Estas capas forman la superficie de algunas esporas y son más o menos persistentes. En esporas jóvenes y a veces en esporas maduras, estas capas se asemejan a una capa unitaria. Sin embargo, con el tiempo, estas capas siempre se deterioran y frecuentemente están ausentes en las esporas más viejas. En *Acaulospora*, *Archaeospora* y *Entrophospora*, la capa de desprendimiento es continua con la pared del cuello de un sáculo esporífero (Blaszkowski et al., 2001; Morton, 2016).

d) Capa unitaria

Esta capa es una estructura uniforme y persistente, según la especie puede o no estar ornamentada. Generalmente esta capa muy delgada (menor a 2 micras) y concoloro a la capa anterior de la espora. En el reactivo de Melzer, la capa unitaria generalmente no es reactiva o su reacción de tinción es menos intensiva que la de otras capas. En las especies reconocidas hasta la fecha, esta capa es la capa exterior de la espora (Blaszkowski et al., 2001).

e) Capa granular

Este fenotipo se observó sólo en la estructura de la pared de las esporas de *Gl. caledonio*, es la tercera capa de cuatro, que son las que conforman a este hongo, se asemeja a una capa unitaria gruesa en esporas moderadamente trituradas. Sin embargo, en esporas vigorosamente trituradas, esta capa se desintegra en fragmentos granulares, similarmente a un vidrio endurecido (Spain et al., 2006).

f) Capa laminada

Una capa laminada es un conglomerado de subcapas estrechamente adherentes, normalmente muy delgadas, de $<0,5 \mu\text{m}$. En esporas vigorosamente trituradas, los grupos de subcapas o la subcapa más interna a veces se separan del conglomerado. Esto puede conducir a una conclusión errónea de la presencia de capas adicionales. En las esporas juveniles, una pared laminada representa una única subcapa. Con el tiempo, las subcapas siguientes se añaden hasta que la espora deja de expandirse. La capa laminada puede ser incolora a lo largo de toda la vida de un hongo, tal como en *Par. laccatum* y *Gl. diaphanum*, o puede oscurecerse gradualmente debido a la adición de subcapas de color. Tanto la superficie superior como la inferior de la capa laminada pueden ser lisas u ornamentadas. En las especies de los géneros *Diversispora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Pacispora* y *Paraglomus*, la capa laminada es continua con la capa laminada de la hifa de sostén o la célula esporogénica. A excepción de los miembros de los géneros *Acaulospora* y *Entrophospora*, la pared de esporas de las especies de los otros géneros de *Glomeromycota* contiene sólo una capa laminada. En la mayoría de los *Acaulospora* spp., la pared de la espora consta de dos capas laminadas internas. (Schüßler et al., 2001; Morton, 2016; Redecker, 2001).

g) Capa flexible

Esta capa es delgada, ca. de $0,5 \mu\text{m}$ de espesor y estructura flexible, usualmente arrugada en esporas aplastadas en PVLG. La capa se asemeja a capas flexibles de paredes germinales de esporas de hongos de los géneros *Acaulospora*, *Ambispora*, *Archaeospora*, *Entrophospora*, *Pacispora* y *Gigaspora*. Sin embargo, se origina desde la superficie interna de la pared de hifas de sostén y es continua con la pared de la espora, y no exclusiva de la pared de esporas, como en las esporas de los géneros enumerados anteriormente. La capa flexible se tiñe de color blanco rosáceo a rojo pastel en el reactivo de Melzer (Morton, 2016).

PARED GERMINAL

La pared germinal es producida por todos los hongos de los géneros *Acaulospora*, *Ambispora*, *Archaeospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Pacispora*. El número de

paredes germinales oscila entre 1 y 3. Cada pared consta de 1 a 3 capas. La primera pared germinal se forma después de que la síntesis de la pared de esporas ha terminado y no tiene conexión física con esta pared. La siguiente pared se origina de manera similar, pero sólo después de que la primera haya completado la diferenciación de todas sus capas, las paredes germinales de todas las especies son incoloras. La diferenciación completa de la(s) pared(es) germinal(es) es la condición para la adquisición de la capacidad de una espora para germinar. En los miembros del género *Gigaspora*, un tubo germinal se origina directamente desde la pared germinal estrechamente adherente a su pared (Schüßler et al.; Morton; Redecker, 2001).

a) Capa delgada, suave y flexible

Esta capa es lisa, delgada, ca. 0,5 μm de espesor, y se arruga en montajes de PVLG. En la mayoría de los hongos arbusculares, esta capa coincide con una segunda capa fuertemente adherente. Por lo tanto, tal estructura de 2 capas se puede interpretar erróneamente como una capa, se tiñe pálida en el reactivo de Melzer (Schüßler et al.; Morton; Redecker, 2001).

b) Capa ornamentada, fina y flexible

Se tiene conocimiento de dos fenotipos de capas ornamentadas, finas y flexibles, una capa rebordeada y una capa nudosa. La capa rebordeada comúnmente se da en la estructura de la pared germinal más interna de las esporas del género *Acaulospora*. Es delgada, ca. de 0,5 μm de espesor, y se cubren con excrescencias granulares (perlas) que se dispersan frecuentemente en esporas trituradas, se aprecia una coloración rojiza con el reactivo de Melzer. La capa nudosa es la más externa en la pared germinal interna, esta capa está uniformemente adornada con pequeñas perillas. Las perillas no se dispersan en esporas trituradas, no se aprecia reacción con el reactivo de Melzer (Morton, 2016).

c) Capa delgada, semiflexible

En contraste con una capa flexible, la capa semiflexible es algo más rígida y no arruga en esporas trituradas. La capa semiflexible ocurre sola o se adhiere a otra

capa semiflexible (Morton, 2016).

d) Capa gruesa y flexible

Esta capa se da, en el centro de la tercera pared germinal más interna de la espora, tiene la apariencia de cuero, no se arruga en los montajes de PVLG, se mancha tenue en el reactivo de Melzer (Walker, 1986).

e) Capa de plástico

Se describe como una capa de pared amorfa. Esta capa es altamente plástica con presión aplicada a esporas trituradas en bases lácticas. La capa de plástico siempre es la capa más interna en la estructura sub-celular de las esporas y manchas de color rojo oscuro a rojo-morado en el reactivo de Melzer. Está presente en muchas especies de los géneros *Acaulospora* y *Gigaspora* (Morton, 2016).

f) Capa delgada - rígida

Una capa delgada y rígida, se puede formar en la primera o segunda capa de la pared germinal, estas capas son lisas, a diferencia de todas las otras especies de hongos arbusculares que producen esporas con paredes germinales flexibles o semiflexibles, este tipo de capa es frágil (Morton, 2016).

ESTRUCTURAS PRE-GERMINACIÓN

Hasta la fecha se reconocieron tres tipos de estructuras de pre-germinación, de las que surgen los tubos germinales.

a) Orbe de Germinación

Un orbe de germinación está formado por una hifa enrollada de manera centrifuga, es hialina o de colores claros. El orbe es generalmente circular o algo elíptico en una vista plana y situado en la superficie superior de la pared germinal más interna cuando se observa en una vista transversal. Con el tiempo, se descompone y puede ser irreconocible en las esporas más viejas. Se encontraron orbes de germinación sólo en algunas especies del género *Acaulospora* (Morton, 2016).

b) Escudo de germinación

Propios del género *Acaulospora* son lóbulos delgados, uniformes, elípticos o cardioides, hialinos a coloreados con un margen más o menos incurvado. La formación de esta estructura se da en la superficie superior de la pared germinal más interna y concluye el desarrollo ontogenético de la espora, los escudos de germinación no se deterioran con la edad (Kramadibrata et al., 2000).

c) Pared germinal

Una pared germinal es una capa semiflexible de la que emerge un tubo germinal. Esta capa está adornada con perillas distribuidas en su superficie interior, esta estructura está presente en las familias del orden Diversisporales (Morton, 2016).

1.1.5. MODO DE DESARROLLO

a) Acaulosporaceae

Todas las especies pertenecientes forman esporas en o dentro del cuello de la hifa de sostén de un ‘Sáculo esporífero’ (*Acaulospora* y *Entrophospora* spp.), forman dos paredes germinales (GW-1 y GW-2), que reaccionan ante el reactivo de Melzer, una pared hialina flexible bicapa externa (GW-1) y una pared hialina bicapa interna (GW-2), en esta última se origina el **Orbe de Germinación**, una vez que la espora ha concluido con el desarrollo de sus paredes, la pared de germinación no tiene contacto físico con la pared de la espora.

El sáculo se forma mediante la expansión terminal de una hifa, tomando una forma abocinada, al concluir su desarrollo se da la formación de esporas, en el sáculo esporífero se distinguen de 1 a 2 capas rígidas. La capa externa de la espora (L1), consiste en la pared de la hifa de sostén proveniente del sáculo, que se degrada con el tiempo y libera a la espora, estas esporas son sésiles. La segunda capa (L2), de la pared de la espora es la que da integridad estructural a la espora, laminada, esta capa es la que varía de coloración y ornamentación; algunas especies poseen una tercera capa (L3), que es discernible con una reacción al reactivo de Melzer. En esta familia se reconocen dos géneros, *Acaulospora* y *Entrophospora* (Morton 2016; Morton & Benny, 1990).

b) Ambisporaceae

Las especies de esta familia son hongos dimórficos, que producen esporas acaulosporoides y glomóide (Morton & Redecker, 2001; Spain et al.; 2006; Walker, 2008), las esporas acaulosporoides se dan solitarias y las glomóide pueden darse solas o en racimos sueltos en el suelo, en contraste con las esporas acaulosporoides sésiles del género *Acaulospora*, las esporas de *Ambispora* se generan por expansión blástica en un ‘apéndice o pedicelo’ en la parte distal del cuello del sáculo esporífero, estos sáculos se originan terminalmente de hifas esporógenas continuas con las hifas extra-radicales; las esporas glomóides, se originan desde una terminal hifal de paredes delgadas, donde se desarrollaran tubos germinales ramificados (Spain et al., 2006). Las esporas son típicamente globosas o sub-globosas, su estructura sub-celular consiste en una pared de esporas de 3 capas y dos paredes germinales internas, la pared más externa (IW-1) consta de dos capas generalmente adherentes. La segunda pared germinal interna (IW-2) está formada por 3 capas adherentes, la capa media es finamente laminada y más gruesa que las dos capas restantes, la pared externa de la espora completa el desarrollo posterior a la formación de la capa externa de la primera pared de germinación interna, la primera pared interna de germinación (IW-1), es continua con la pared del pedicelo; las estructuras que forma típicamente son arbuscúlos, vesículas, hifas extra e intraradicales, sin embargo todas ellas se tiñen débilmente en reacciones acidas de tinción; se reconoce un género *Ambispora* (Morton & Redecker, 2001; Spain et al., 2006; Walker et al., 2007).

c) Archaeosporaceae

Esta familia tiene un desarrollo similar al del género *Acaulospora* y *Entrophospora*, desarrollando esporas sésiles a un lado o dentro del cuello del sáculo esporífero, sin embargo la estructura interna es exclusiva de esta familia, no desarrollando paredes germinales, la pared de la espora es formada por 3 capas hialinas, ninguna de ellas reacciona frente al reactivo de Melzer. Micorrización, desarrolla estructuras tales como arbuscúlos distribuidos de manera irregular en la raíz, hifas extra e intraradicales, esta última se desarrolla en espiral fácilmente confundible con arbuscúlos senescentes, todas ellas se tiñen débilmente en reacciones ácidas. La

identificación morfológica de esta familia es dificultosa, se reconoce un género *Archaeospora* (Morton & Redecker, 2001; Schüßler et al. 2001).

d) Claroideoglomeraceae

Las especies de esta familia desarrollan esporas de manera idéntica a la familia Glomeraceae, por expansión blástica de una hifa, las especies de esta familia fueron separadas de la inclusión previa en *Glomus* para agruparlos en un clado basado en secuencias de SSU y LSU. (VanKuren et al., 2012). La estructura sub-celular consta de una pared de tres capas de espora: una capa exterior de desprendimiento de reacción dextrinoide en el reactivo de Melzer, una capa de laminado intermedia, y una capa interna delgada que llena el lumen de la hifa de sostén y forma así un "tabique". Las especies se diferencian por el tamaño de las esporas y el color de la capa laminada media. Se forman estructuras micorrízicas tales como arbuscúlos, vesículas e hifas extra e intraradicales, todas ellas se tiñen de manera intensa, se reconoce un género *Claroideoglossum* (Schüßler & Walker, 2010).

e) Diversisporaceae

El desarrollo de esporas es típico al de la familia Glomeraceae, esta familia se construyó únicamente basándose en su secuencia del gen de divergencia de otros clados, una secuencia SSU y LSU; se reconocen dos géneros *Diversispora* y *Redeckera* (Walker & Schüßler, 2004).

f) Gigasporaceae

Las especies que lo conforman forman esporas grandes (mayores a 200 μm), la pared de la espora consiste en dos capas, una capa externa permanente que encierra una capa laminada, con propiedades que diferencian a cada especie; las esporas de esta familia se desarrollan por expansión blástica desde una hifa fértil que se hincha y convierte en "Célula esporógena", luego que esta célula alcanza su tamaño completo (25 a 50 μm), la espora empieza a desarrollarse en el extremo, la capa exterior y la capa laminar se desarrollan en simultaneo (Bentivenga & Morton, 1995; Walker & Sanders, 1986), al final de la ontogenia se forma una pared de germinación verticilada o nudosa de la cual surgen los tubos germinales, esta pared

se adhiere firmemente a la superficie interior de la capa laminar; estos géneros desarrollan estructuras conocidas como células auxiliares, las cuales son equinulados con espinas, una última etapa sucede en los géneros *Dentiscutata*, *Scutellospora*, *Racocetra* y *Cetraspora*, que desarrollan un “Escudo de germinación”, en la pared de germinación más interna (Morton & Benny, 1990).

g) Glomeraceae

El desarrollo de estas esporas se da por expansión blástica a partir de la terminal de una hifa, desarrollan una sola pared de espора que incluye al menos dos capas, una capa externa mucilaginosa que reacciona frente al reactivo de Melzer, que recubre una capa estructural (laminada), las características de la “Hifa de sostén” y la síntesis de la pared de la espора son consideradas para la caracterización de esta familia, no desarrolla paredes internas, algunas de especies desarrollan un manto de hifas denominadas “peridio”, o crecen en esporocarpos, desarrolla estructuras micorrízicas tales como arbusculos, vesículas, hifas extra e intraradicales, todas ellas se tiñen de manera intensa en tinciones ácidas; se reconocen cuatro géneros *Funneliformis*, *Glomus*, *Rhizophagus* y *Septoglomus* (Morton, 2016; Schüßler et al. 2001).

h) Pacisporaceae

El desarrollo de estas esporas es idéntico al descrito en el *Glomeraceae*, la pared de la mayoría de las esporas juveniles suele estar formado por una sola capa ‘SW-L1’, continua con la pared de la hifa de sostén, de superficie lisa, una capa laminada ‘SW-L2’, acompaña el desarrollo en conjunto con la primera capa, al concluirse el desarrollo de estas dos capas se desarrolla una tercera capa ‘SW-L3’, esta capa es delgada concoloro y fuertemente adherente a la capa laminada.

La siguiente etapa de desarrollo es el origen de una pared interior de germinación de tres capas, la capa L1 es flexible y hialina, la capa L2 es relativamente gruesa, coriácea, q reacciona con el reactivo de Melzer, y una capa L3 delgada, hialina, flexible y fuertemente adherente a la capa L2, esta pared de germinación no tiene contacto físico con la pared de la espора (similar a *Acaulosporaceae*). El desarrollo

de la espora concluye con la formación de un escudo de germinación en la pared interior de germinación, el cual origina un tubo germinal, las estructuras en la raíz que desarrollan son arbusculos, vesículas, hifas extra e intraradicales, así como células auxiliares, que se tiñen de manera intensa en medio ácido, se reconoce a un género *Pacispora* (Oehl & Sieverding, 2004).

i) Paraglomaceae

Estas esporas se desarrollan por expansión blástica a partir de las terminales de las hifas extra-radicales, de forma globosa a irregulares, la estructura sub-celular consta de una pared de dos a tres capas todas continuas a su hifa de sostén, la capa externa se degrada y desprende en esporas adultas, estas esporas germinan por tubos germinales originadas desde el lumen de la hifa de sostén como de la pared de la espora, se reconoce un género *Paraglomus* (Morton & Redecker, 2001).

1.1.6. TAXONOMÍA BASADA EN LAS ESPORAS

El desarrollo de esporas es uno de los principales criterios utilizados para definir los diferentes géneros de hongos Glomeromycetes (Morton, 2016).

a) Disposición de las esporas

Las esporas de hongos micorrízicos arbusculares se pueden producir individualmente, en racimos o esporocarpos, este último a menudo contiene materiales del suelo, pueden estar cubiertos por una red de hifas denominadas peridio. Muchas especies de HMA, esporulan en agregaciones, sin embargo para que esto suceda en cultivos trampa debe de pasar varias generaciones de cultivo, por la demanda de energía que representa, es decir géneros de HMA que se cree producen esporas solitarias pueden ser encontradas a futuro en agregados o esporocarpos (Brundrett, 1995).

b) Forma de las Esporas

Las esporas de HMA, en su mayoría son globosos (esféricos), pero algunas especies tienen esporas ovales, oblongas, troncocónicas, sub-globosas e irregulares, para la caracterización se toma en cuenta el típico de la población y se describe de adicional la segunda forma típica (en caso de apreciarse), la hifa

de sostén que permanece fiel a las esporas pueden ser cilíndricas, ensanchadas, globosas, achatadas, abocinadas o hinchadas, y pueden ser solitarias o ramificadas (Morton, 1988).

c) Tamaño de las Esporas

El parámetro de tamaño se considera como el menos útil en comparación a muchos otros criterios taxonómicos debido a su variabilidad (Morton, 1988), pero las diferencias sustanciales en el tamaño de las esporas pueden ayudar a distinguir géneros y especies. Los HMA tienen esporas que caen una gama de tamaños desde muy pequeños (20 a 50 μm), pequeños (50 a 120 μm), medianas (120 a 250 μm), a grandes (mayor a 250 μm), (Morton, 2016).

d) Color de las Esporas

El color varía entre y en los aislamientos sin embargo, son una herramienta útil dado que la variación se da en la misma gama de color. Los colores de esporas deben ser identificados mediante el uso de una carta de colores que defina los colores CYMK como porcentajes (Cian, Amarillo, Magenta y Negro), para estandarizar el color se recomienda el uso de “Pantone® Process Color System Guide”, (Morton, 1992).

e) Ornamentación de las Esporas

Las características de la superficie de las capas de la pared de la espora o de sus paredes internas-germinales, incluye depresiones, retículos, espinas, perlas y papilas, la correcta caracterización de la ornamentación, es una útil herramienta para la identificación de géneros (Morton, 1992).

f) Capas de la pared y Reacciones de tinción

Las paredes de las esporas de HMA como se ha descrito en anteriormente pueden ser paredes de la espora o paredes internas - germinales, estas pueden estar formadas por una o varias capas, que varían en grosor, estructura, aspecto y coloración frente ciertos reactivos, pueden ser descritos usando terminología estandarizada o diagramas (Walker, 1983; Morton, 1988).

g) Germinación de la Espora

Las tipos de germinación son esencialmente útiles para diferenciar géneros HMA, estas estructuras de germinación y pre-germinación se han descrito anteriormente, (Morton, 2016; Kramadibrata et al., 2000).

h) Estructuras asociadas con las hifas del suelo

Son vesículas auxiliares también llamados órganos auxiliares o células auxiliares, se agrupan en estructuras producidas por las hifas del suelo de la familia Gigasporaceae, su fin es la de servir como estructura de reserva o propagación (Morton, 2016).

1.1.7. MECANISMO Y PROCESO DE COLONIZACIÓN

Las esporas pueden considerarse solamente uno de los tipos de propágulos de los HMA debido a que las raíces de las plantas se colonizan también por trozos de micelio activo que se ramifica para desarrollar la infección. En las micorrizas arbusculares existen dos fases del sistema micelial: un micelio interno en la corteza de la raíz de la planta y un micelio externo en el suelo, que varía en extensión y volumen (Harley & Smith, 1983).

El inicio de la colonización de la planta y con ello la formación de la simbiosis comienza con la germinación de las esporas de resistencia en el suelo cuando las condiciones de temperatura y humedad son favorables (Bolan & Abbott, 1983) o bien mediante el crecimiento de hifas a partir de propágulos del suelo que se encuentran cerca del sistema radical susceptible. El crecimiento del micelio se incrementa algunas veces debido a que los exudados de la raíz pudieran proporcionar sustratos adecuados para el desarrollo de las hifas después de que las reservas de nutrimentos sobre todo en las esporas, se hubieran agotado. Sin embargo, a pesar del crecimiento micelial en presencia de raíces, las hifas no parecen tomar una dirección hacia ellas, sino hasta que se encuentran muy cerca, es decir unos pocos milímetros. La hifa finalmente tiene contacto con la célula epidérmica o un pelo radical y produce un apresorio ligeramente engrosado, a partir del cual se desarrollan ramificaciones infectivas cortas.

Posteriormente se produce la penetración de la epidermis o del pelo radical mediante la presión ejercida por la hifa en crecimiento sobre la pared celular, lo cual hace que esta última se combe alrededor de la hifa y se vuelva mucho más delgada en las células corticales. No se sabe si está involucrada la producción de enzimas por el hongo, pero parece probable que ocurra una alta actividad hidrolítica y se ha sugerido también que la entrada de la hifa a la raíz se facilita por la presencia de pectinasas (Harley y Smith, 1983; Bonfante et al., 2004).

Una vez que la hifa penetra la raíz, generalmente entre las células epidérmicas, se dispersa también intercelularmente a lo largo de la corteza, alcanzando la segunda capa de células corticales.

La colonización se vuelve intracelular (Safir, 1987); cuando la hifa degrada la pared de la célula e invagina la membrana para ramificarse luego dicotómicamente muchas veces y formar una estructura parecida a un arbusto, denominada arbusculo, dentro de la célula. Este es el sitio donde se lleva a cabo el intercambio de nutrimentos entre ambos simbioses (Harley & Smith, 1983).

Otras ramificaciones de las hifas intraradicales en algunos géneros de hongos endomicorrízicos, forman vesículas intercelulares que parecen ser reservorios de nutrimentos dado que presentan gran cantidad de lípidos (Bowen, 1987). La vida media de un arbusculo en actividad es muy corta y varía entre dos y quince días, al cabo de los cuales se colapsa y permanece rodeado por el plasmalema de la célula vegetal, siendo encapsulado por material depositado en la zona interfacial proveniente presumiblemente del hospedero (Harley & Smith, 1983). Este continuo proceso de degradación de arbusculos a la vez que se forman otros nuevos es ventajoso para la planta, un arbusculo en degradación, lleno de nutrimentos puede liberar su contenido a la célula de la raíz y a partir de allí distribuirse a toda la planta (Salazar-García, 2002).

La colonización del hongo puede extenderse también mediante hifas por la superficie de la raíz y penetrar en ésta a intervalos irregulares (Sieverding, 1991).

a. Colonización

Primera etapa

Se produce la diferenciación de la espora, propagación del hongo e identificación mutua entre la planta y el hongo, y viceversa, en la rizósfera, o en regiones próximas a las raíces nutricias o pelos radicales. Este reconocimiento lo facilitan, al aparecer, sustancias exudadas o emitidas por la raíz, que provocan el crecimiento del micelio y un biotropismo positivo del mismo hacia la raíz, al igual que ocurre con las interacciones planta – microorganismo con especies de los géneros *Rhizobium* (Walker, 1983).

Segunda etapa

Consiste en el acercamiento y acoplamiento progresivo y gradual del micelio y la raicilla produciéndose el contacto intercelular, al formarse una estructura que adhiere a ambos especímenes (apresorio), (Walker, 1983).

Tercera etapa

Se realiza la colonización, produciéndose cambios morfológicos y estructurales tanto en los tejidos colonizados por el hongo, como en la organización de la pared celular de la raíz. Posteriormente se produce la integración fisiológica de ambos simbioses (hongo-raíz), y por último se produce una alteración de las actividades enzimáticas, que se coordinan entre los simbioses para integrar sus procesos metabólicos; una de las respuestas simbióticas de la planta con el hongo, es destinar fotosintatos en forma de sacarosa, para que el hongo pueda nutrirse heterotróficamente y para que pueda sintetizar azúcares propios tales como manitol, trehalosa, glicógeno, etc. (Harley, 1971).

1.1.8. FACTORES QUE AFECTAN EL ESTABLECIMIENTO DE HMA

a) Luz y temperatura

Cuando las plantas micorrízicas se exponen al sol la infección y la producción de las esporas se incrementa. A menor cantidad de luz, la fotosíntesis se realiza de forma inadecuada en la planta, resultando en una disminución de los azúcares que son secretados por ella; de allí que exista una disminución en el número de

esporas, ya que necesitan más tiempo para madurar; las altas temperaturas (30 a 35°C), estimulan la infección y el desarrollo de las esporas; en raíces de poas los arbusculos se desarrollan mejor a 30°C, el micelio entre 28 y 34°C y las esporas y vesículas a 35°C (Schenk & Schoroder, 1974).

b) Susceptibilidad del hospedero

Gerdemann (1989), indica que la susceptibilidad micorrízica es el grado en el que la planta es dependiente sobre la condición micorrízica para producir un máximo de desarrollo y producción a un nivel conocido sobre la capacidad del suelo, de ahí que algunos hospederos son más dependientes que otros.

c) Microorganismos del suelo

Existen muchos microorganismos que pueden beneficiar a la micorriza y en consecuencia estimular el crecimiento de la misma. Un ejemplo son las bacterias fijadoras de nitrógeno, microorganismos solubilizadores de fosforo y otros; estos microorganismos pueden producir compuestos que incrementan la permeabilidad de la membrana, la síntesis de fitoalexinas, fitohormonas y vitaminas (Gray & Gerdemann, 1973; Gildon & Tinker, 1983; Liu et al. 2000; Zhu et al. 2001).

d) Fertilizantes

Los fertilizantes provocan una reacción negativa en los HMA, las grandes cantidades de fosforo, impiden que las micorrizas se extiendan en el suelo para absorber los nutrientes necesarios, siendo tóxicos para ellos. Se ha reportado que a mayor cantidad de fertilizante, las micorrizas sufren una reducción de su peso seco (extensión y colonización) de hasta un 50% (Gray y Gerdemann, 1973).

e) Pesticidas

Generalmente son dañinos para los microorganismos benéficos que se encuentran en la rizosfera, incluyendo a los HMA; el mecanismo que ejerce en el hospedero influye en el desarrollo de las micorrizas, aquellos que incrementan la exudación de los carbohidratos en las raíces pueden incrementar la infección

micorrízicas, mientras que los que la reducen pueden disminuir o eliminar la infección (Gerdemann, 1975). Por otra parte las plantas que son altamente dependientes sufren deficiencias extremas de nutrientes lo que ocasiona el debilitamiento de la misma, al erradicarse o disminuirse severamente la infección de los hongos HMA. (Gray & Gerdemann, 1973).

Algunos fungicidas pueden evitar la infección del hospedero con micorriza arbusculares. Estos son: Arazan, Benomyl, Botran, Mylone y Thiabendazole. Otros fungicidas mostraron, en estudios con especies de HMA conocidas, poco o ningún efecto negativo en el desarrollo de esta en los hospederos. Estos son: Ethoprop, Funsophotian, Ethazoe, Captan, Maneb, Rido- mil, Aliette, Pyroxiclor y Thiophanate. Algunos fungicidas como Ethazoles pueden estimular la infección si se aplican en pocas cantidades (10-40 ppm) entre 30 y 60 días después la inoculación. (Smith, 1978; Dehne, 1982), contra nemátodos se aplica Temik (0.25 g/4 kg suelo), que no produce efecto alguno sobre la infección (CIAT, 1983).

1.2. CULTIVO DE MAÍZ

1.2.1. CENTRO DE ORIGEN

Valadez (1994) & Janick (1962), identifican como centro de origen geográfico y de domesticación, para el maíz amiláceo (*Zea mays amiláceo* L.), “El centro sur de México” a una altitud de 2500 msnm.

1.2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según Cabrerizo (2012), la posición taxonómica del maíz es la siguiente:

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Liliopsida
Subclase	:	Commelinidae
Orden	:	Poales
Familia	:	Poaceae
Subfamilia	:	Panicoideae
Tribu	:	Andropogoneae
Género	:	<i>Zea</i>
Especie	:	<i>Zea mays</i> L. spp. amiláceo

1.2.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

La planta de maíz es de porte alto, con abundantes hojas y un sistema radicular fibroso, normalmente con un solo tallo que tiene hasta 30 hojas. Algunas veces se desarrollan una o dos yemas laterales en la axila de las hojas en la mitad superior de la planta; estas terminan en una inflorescencia femenina la cual se desarrolla en una mazorca cubierta por hojas que la envuelven; esta es la parte de la planta que almacena reservas.

La parte superior de la planta termina en una inflorescencia masculina o panoja; esta tiene una espiga central prominente y varias ramificaciones laterales con flores masculinas, que producen abundantes granos de polen (Ritchie & Hanway, 1992).

1.2.4. ECOLOGÍA DEL CULTIVO

a) Suelo

El maíz se adapta muy bien a todos los tipos de suelo, pero en suelos de textura franca, franco-arcilloso y franco-limoso, con pH de 6,5 a 7,5 es donde se aprecia el mejor desarrollo. Requieren además suelos profundos, ricos en materia orgánica con buen drenaje (INFOAGRO, 2012), para impedir el encharque y consecuente asfixia de las raíces (Yanez, et al., 2005).

b) Clima

La FAO (2016), indica que el maíz requiere una temperatura que está entre 15 y 30 °C; menciona además, que el maíz puede soportar temperaturas mínimas de 8 °C y a partir de los 30 °C pueden aparecer problemas de mala absorción de nutrientes minerales y agua. Se menciona además que la temperatura ideal para el desarrollo de la mazorca está entre los 20 a 32 °C.

Manual Agropecuario, (2001), menciona que el maíz requiere de un porcentaje de humedad que está entre 80 y 90%, una pluviosidad que va desde los 700 a 1300mm. También, menciona un cuadro resumen de las temperaturas ideales para cada etapa fenológica que se presentan a continuación:

Cuadro 1.2. Requerimientos térmicos según ciclo fenológico del maíz

Proceso Fisiológico	Temperatura en °C		
	Mínima	Optima	Máxima
Germinación	10	20-25	35
Crecimiento	15	20-30	35
Floración	20	21-30	30

Fuente: MANUAL AGROPECUARIO, 2001

1.3. AGENTE PATÓGENO *Fusarium oxysporum*

1.3.1. GENERALIDADES

El organismo es el hongo perteneciente a la clase Deuteromycete denominado *Fusarium oxysporum*. Por ser esta clase de los llamados hongos imperfectos, carece de fase sexual o es atípica, *Fusarium oxysporum* cae en esta última categoría, porque sí presenta una fase sexual llamada teleomorfo, o forma perfecta, muy difícil de encontrar en la naturaleza y se requieren condiciones especiales para observarla in vitro. Por lo general se presenta como saprófito en el suelo. Este presenta numerosas estructuras llamadas esporodocios donde se agrupan las esporas. Existen dos tipos de conidios, los macroconidios que son hialinos, tabicados, generalmente con más de tres tabiques y microconidios más pequeños hialinos, unicelulares. Posee células de paredes engrosadas que actúan como estructuras de resistencias denominadas clamidiosporas pueden ser terminales o intercalares (Kedera, 1994).

Es un hongo de temperatura cálida, el desarrollo óptimo se presenta a 20 °C, el rango va de 12 a 28°C. Esta temperatura acompañada de alta humedad relativa, días cortos de baja intensidad lumínica favorecen el desarrollo de la enfermedad. Otros factores son los suelos ácidos, arenosos, con bajo pH, pobres en nitrógeno y alto suministro de potasio. Las heridas ocasionadas a las raíces por maquinaria o nematodos como es el caso de *Melodogyne incognita* aumentan la susceptibilidad del hospedero. Las características y la morfología de la colonia varían de acuerdo con el medio de cultivo. Por ejemplo, en agar papa-dextrosa el micelio es blanco, al inicio, y forma pigmentos que van desde gris hasta violeta (Bacon, 1989).

1.3.2. TAXONOMÍA

La taxonomía del *Fusarium*, es sumamente compleja. De ahí que ha sido tema de debate durante muchos años, dado que el concepto de especie ha cambiado dentro de un género dependiendo del grupo de investigador, un trabajo en la taxonomía de este género fue el tratado de Wollenweber & Reinking (1935), en el que se identificaron 65 especies agrupadas en 15 secciones. El *Fusarium sp.* se distribuye por todo el mundo y con alta frecuencia es aislada del maíz en cualquier

órgano de la planta. Es el principal patógeno del cultivo y limitante de su productividad; según BAYER[®], la clasificación taxonómica del hongo *Fusarium oxysporum*, es la siguiente:

Reino	:	Fungi
Phylum	:	Deuteromycota
Clase	:	Sordariomycetes
Orden	:	Hypocreales
Familia	:	Nectriaceae
Género	:	<i>Fusarium</i>
Especie	:	<i>Fusarium oxysporum</i> F. (Franz Schltdl, 1958)

1.3.3. REPRODUCCIÓN

Murillo (1999), identifica y describe tres clases de esporas:

- ✓ Microconidias, Esporas generalmente unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados. Las microconidias tienen 5- 12 μm de largo por 2.5- 3.5 μm de ancho.
- ✓ Macroconidias: Esporas de paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; las macroconidias tiene un tamaño de 27 a 46 μm de largo por 3.0 a 4.5 μm de ancho.
- ✓ Clamidosporas: Esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias, de paredes gruesas. Se forman simples o en pares. Gracias a ellas el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes.

1.3.4. SÍNTOMAS

Las enfermedades causadas por *Fusarium oxysporum*, invade la planta bien sea de forma activa a través de las raíces o pasivamente a través de orificios en la zona

callosa de esquejes jóvenes. Después de la penetración el patógeno se desarrolla dentro del sistema vascular de la planta. Los vasos, en especial del xilema son bloqueados y destruidos de manera que el transporte del agua y nutrientes se dificulta, lo que conduce al marchitamiento, que con frecuencia es parcial en la planta. Externamente los síntomas comprenden decoloración de las hojas, sobre todo de un lado de la planta, donde el patógeno ha penetrado. Las hojas se tornan amarillas y la parte superior de la planta se enrolla hacia abajo. En estados posteriores la planta se marchita totalmente, se amarilla y finalmente mueren. Internamente puede observarse una decoloración café en los tejidos vasculares cuando la planta es atacada por *Fusarium oxysporum*, las raíces permanecen inicialmente intactas, en contraposición a los ataques por otras especies de *Fusarium* que destruyen la base del tallo o las raíces (Murillo, 1999).

1.4. CONTROL BIOLÓGICO

1.4.1. GENERALIDADES

En un sentido amplio y según la definición de Cook y Baker (1983), el control biológico involucraría todas aquellas prácticas tendientes a disminuir la incidencia de enfermedades excluyendo el control químico. En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que no haya enfermedad en la mayoría de los casos; es decir, el control biológico funciona naturalmente.

En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas. La alteración de este medio por inadecuadas prácticas agrícolas como el control químico prematuro, y desinfección de suelos, entre otras, favorecen el desarrollo de los patógenos (Rollán et al., 1998).

1.4.2. MECANISMOS DE ANTAGONISMO

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta o en las heridas. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es una característica a seleccionar en un antagonista. Esto se debe

a que los riesgos de seleccionar al patógeno por resistencia al antagonista se reducen al actuar éste último por varios mecanismos.

El riesgo de resistencia se reduce también mediante el uso de combinaciones de antagonistas de diferente modo de acción.

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos en la flora (Cook y Baker, 1983), estos mecanismos son:

a) Antibiosis

Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros microorganismos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10ppm). Es deseable que la antibiosis no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista, esto se debe a que, existe el riesgo de la aparición de colonias resistentes al antibiótico (Valdebenito, 1998).

Un antagonismo-antibiosis, poseen afinidad para receptores propios para los agonistas, al unirse interrumpen la interacción e inhiben la función de un agonista, bloqueando su acción (Bernal et al., 2004).

b) Competencia

Se refiere al desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que se de la competencia es que exista **escasez**, de uno de los elementos, de haber excesos no hay competencia (Wilson et al., 1996).

c) Interacción directa con el patógeno

Existen dos tipos de interacciones directas entre los antagonistas y los patógenos, estos son:

- **Parasitismo**, el término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. El parasitismo consiste en la utilización del

patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, Beta-1-3-glucanasas y proteasas que lisan las paredes de las hifas, conidios o esclerocios (Melgarejo, 1989; Ulhoa, 1996).

- **Predación**, En caso de la predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno, no ha sido un mecanismo de acción muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol (Campbell, 1989).

d) Inducción de resistencia

Los organismos han pasado por un proceso evolutivo desde su aparición sobre la tierra, que los ha llevado a desarrollar mecanismos de defensa (bioquímicos, físicos estructurales de resistencia), contra los patógenos; de esta forma se postula que la resistencia es la regla mientras que la susceptibilidad es la excepción (Wilson et al., 1996).

1.5. ANTECEDENTES

Faggioli, et al., (s.f.), indican que el porcentaje de micorrización de HMA, en suelos sin abonamiento va de 29% a 65%, así mismo los suelos disturbados presentan una menor diversidad de especies de HMA en comparación a los suelos no disturbados, con una relación de 1 a 2.

Egerton-Waburton, et al., (2001), mencionan que el enriquecimiento con N, a niveles de contaminación a partir de la actividad agrícola, tiene repercusiones en la diversidad y funcionamiento de las comunidades de HMA. Ellos observaron que los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* tienen a disminuir en cuanto a producción de esporas y micorrización, mientras algunas especies del género *Glomus* adoptan características parasíticas e incrementan su número.

Fredis, et al., (2014), bajo la metodología de tamizado en húmedo modificado por Sieverding, el conteo de esporas, separación de morfotipos e identificación de

morfotipos a nivel de géneros de HMA, mediante claves taxonómicas propuestas por INVAM, encontraron entre 640 a 1100 esporas/ 100 g de suelo, identificando 31 morfotipos clasificados en 11 posibles géneros (Claroideoglosum, Viscospora, Glomus, Ambispora, Gigaspora, Funneliformis, Intraspora, Tricispora, Acaulospora, Diversispora y Simigliomus), de las cuales 48% corresponden al género Glomus, seguido por los géneros Claroideoglosum y Diversispora con un 10%, Gigaspora en un 7%.

Medina, et. al., (2010) encontraron una densidad poblacional de 800 a 1700 esporas/100g de suelo, en condiciones nativas de la zona de las Caobas, Holguín, identificándose 28 morfotipos de HMA de los cuales 74% pertenece al género Glomus, 18% a Acaulospora, 4% al género Gigaspora y 4% al género Scutellospora.

Guadarrama & Álvarez - Sánchez (1999) citados por Alfonso (2011), afirman que el mayor número de esporas y especies se observan durante la época seca, dichos autores argumentan que la desaparición de raicillas de absorción durante el estiaje provoca mecanismos para la producción de esporas en contra parte durante las lluvias la humedad provoca el incremento de micelio así como la germinación de esporas presentándose un escaso número de estas en el suelo.

Durante las lluvias, el efecto de la humedad tiene consecuencias en el número de esporas, pues en esta temporada el crecimiento del micelio limita la esporulación en micorrizas. Moreira, et al., (2006), mencionan que cuando el hongo se encuentra en proceso de micorrización o crecimiento, la producción de esporas es mínima. Este comportamiento es común en plantas perennes y estacionales, ya que el crecimiento de raíces es hasta cierto punto, constantemente a lo largo del año, como se da en cultivos de maíz y trigo.

Alfonso (2011), obtuvo conteos de 1333 esporas/100g de suelo en la época de estiaje, y 100 esporas/100g de suelo en época de lluvias, en muestras de suelo rizosférico de 20cm de profundidad y una diversidad de 3 morfotipos de HMA,

todas pertenecientes al género *Glomus*, estos mismos se encontraron en ambas épocas de evaluación.

Heriberto (2012), mediante la metodología de tamizado en húmedo y decantación presentada por Gerdemann & Nicholson (1963) y modificada por Daniels y Skipper (1982), encontró entre 1400 y 700 esporas/100g de suelo en época de seca y de lluvia respectivamente, las zonas en estudio mostraron diversidad de HMA similares, determinó 26 especies de HMA, con un 19% de similitud entre zonas.

Guillermo (2002), emplea medio mínimo en sales (MIN), para el cultivo monoxénico de *Agave salmiana* inoculada con *Gl. intraradices*, no demostrando efectos adversos o antagónicos en la formación de hifas extra-radicales, en este mismo estudio, reporta un 85% de colonización de HMA *Gl. intraradices*. Mediante la tinción de raíces con fucsina acida 0.05% (Merryweather y Fitter, 1991).

Fernández, et al., (2002), pregerminan esporas de *Gl. clarum* en medio MIN (medio mínimo en sales), presentando 100% de porcentaje de pre-germinación y tubos germinativos cuyos largos oscilaban entre 20 y 40 μm , luego de 30 días.

Golsing et al., (2006); Franken et al., (2007); Akhtar & Siddiqui, (2008); Kapoor et al., (2008); Franco, (s.f.) & Newsham et al., (1995), mencionan que los hongos pertenecientes al género *Glomus*, tales como *Gl. mosseae*, *Gl. clarum*, *Gl. intraradices*, *Gl. claroideum*, *Gl. etunicatum* y *Gl. versiforme*, entre otros accionan mecanismos en el maíz (*Zea mays* L.), para hacer frente al estrés biótico causado por especies como *Phytophthora* y *Fusarium*, (producen la podredumbre de las raíces), produciendo una resistencia por exclusión competitiva del patógeno, así mismo, se producen inhibidos bioquímicos, inducidos como reacción a la invasión por parte del HMA al hospedero.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en dos sedes. La caracterización de los HMA, se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola, de la Escuela Profesional de Agronomía – UNSCH, ubicado en el campus de la ciudad universitaria, distrito de Ayacucho, Provincia de Huamanga, Región de Ayacucho, a una altitud de 2792 msnm, encontrándose en las coordenadas UTM, E 584300 y N 8546685.

El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Rhizobiología, del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería - UNSCH, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias situado en el distrito de Jesús Nazareno, provincia de Huamanga, región Ayacucho, a una altitud de 2750 msnm, Jr. Abraham Valdelomar N° 249.

2.2. ZONAS DE ESTUDIO

El material biológico (suelo y plantas de maíz) se recolectó de tres distritos de la provincia de Huamanga; del distrito de Andrés Avelino Cáceres, específicamente del Centro Experimental Canaán, propiedad de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a una altitud de 2743 msnm; del distrito de Pacaycasa, específicamente el Fundo Wayllapampa, propiedad de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga a una altitud de 2557 msnm; del distrito de Socos, específicamente la Comunidad de Luyanta, del Centro poblado de Santa Rosa de Cochabamba a una altitud de 3210 msnm.

Las muestras se obtuvieron en dos épocas (lluvias y sequía), a partir de campos con cultivo de maíz amiláceo (con cultivo presente) y de más de 4 meses de edad, en agosto por al menos un mes. Obtenidas de las siguientes coordenadas UTM:

Centro Experimental Canaán

Muestra 01: E 586307 – N 8544168; H 2743 msnm

Muestra 02: E 586260 – N 8544222; H 2743 msnm

Fundo Wayllapampa

Muestra 01: E 585119 – N 8554175; H 2558 msnm

Muestra 02: E 584896 – N 8554283; H 2557 msnm

Muestra 03: E 584859 – N 8554588; H 2564 msnm

Comunidad de Luyanta

Muestra 01: E 575070 – N 8543457; H 3217 msnm

Muestra 02: E 574993 – N 8543168; H 3200 msnm

2.3. ANÁLISIS DE CARACTERIZACIÓN

Las muestras de suelo se tomaron en zigzag a lo largo de los terrenos, a una profundidad de 20 cm, las cuales fueron homogenizadas y resumidas a 1 kg de suelo que se llevó al Laboratorio de Análisis de Suelo y Análisis Foliar Nicolás Roulet, del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería, de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, para su análisis, obteniendo los siguientes resultados:

Cuadro 2.1. Análisis de Caracterización. Fundo Wayllapampa-UNSCH, 2557 msnm.
Pacaycasa. 2016

	Propiedad	Unidad	Contenido	Método	Interpretación
Muestra 01	Arena	(%)	39.40	Hidrómetro de Bouyoucos	Franco Arcilloso
	Limo	(%)	24.60		
	Arcilla	(%)	36.00		
	Potencial Hidrógeno	pH	7.20	Potenciometría	Ligeramente alcalino
	Conductividad Eléctrica	dS/m	0.50	Extracto de Saturación	Muy ligeramente Salino
	M.O.	(%)	1.10	Walkley y Black	Bajo
	P-disp.	ppm	10.10	Bray-Kurtz I	Bajo
	K-disp.	ppm	98.60	Extracción con acetato de sodio	Bajo
	Al+3	(cmol+)/kg	0.00	Extracción con K CIN	-
	H+	(cmol+)/kg	0.00		-
Muestra 02	Arena	(%)	40.10	Hidrómetro de Bouyoucos	Franco Arcilloso
	Limo	(%)	23.50		
	Arcilla	(%)	36.40		
	Potencial Hidrógeno	pH	7.30	Potenciometría	Ligeramente alcalino
	Conductividad Eléctrica	dS/m	0.20	Extracto de Saturación	Muy ligeramente Salino
	M.O.	(%)	1.10	Walkley y Black	Bajo
	P-disp.	ppm	10.10	Bray-Kurtz I	Bajo
	K-disp.	ppm	97.40	Extracción con acetato de sodio	Bajo
	Al+3	(cmol+)/kg	0.00	Extracción con K CIN	-
	H+	(cmol+)/kg	0.00		-
Muestra 03	Arena	(%)	45.40	Hidrómetro de Bouyoucos	Franco Arcillo Arenoso
	Limo	(%)	22.60		
	Arcilla	(%)	32.00		
	Potencial Hidrógeno	pH	7.90	Potenciometría	Moderadamente alcalino
	Conductividad Eléctrica	dS/m	0.20	Extracto de Saturación	Muy ligeramente Salino
	M.O.	(%)	0.90	Walkley y Black	Bajo
	P-disp.	ppm	9.50	Bray-Kurtz I	Bajo
	K-disp.	ppm	112.40	Extracción con acetato de sodio	Medio
	Al+3	(cmol+)/kg	0.00	Extracción con K CIN	-
	H+	(cmol+)/kg	0.00		-

Fuente: Elaboración propia en base a los resultados del análisis del suelo.

En base a la propuesta de interpretación de Ibáñez y Aguirre (1983), la clase textural de los suelos 1 y 2 es Franco arcilloso, así como el pH de estos es Ligeramente alcalino, mientras el suelo 3 es Franco arcillo arenoso, y con pH moderadamente alcalino, los tres suelos son muy ligeramente salinos y el contenido de materia orgánica, fosforo y potasio disponible es bajo, con excepción del suelo 3 que tiene una clasificación media sobre su contenido de potasio disponible, mientras que los cationes cambiables para Al³⁺ e H⁺, son nulos.

Cuadro 2.2. Análisis de Caracterización. Centro Experimental Canaán UNSCH, 2743 msnm. Andrés Avelino Cáceres. 2016

	Propiedad	Unidad	Contenido	Método	Interpretación
Muestra 01	Arena	(%)	44.60	Hidrómetro de Bouyoucos	Franco Arcilloso
	Limo	(%)	24.50		
	Arcilla	(%)	30.90		
	Potencial Hidrógeno	pH	7.61	Potenciometría	Ligeramente alcalino
	Conductividad Eléctrica	dS/m	0.62	Extracto de Saturación	Muy ligeramente Salino
	Materia Orgánica	(%)	2.49	Walkley y Black	Medio
	P-disp.	ppm	12.80	Bray-Kurtz I	Medio
	K-disp.	ppm	168.90	Extracción con acetato de sodio	Medio
	Al ³⁺	(cmol+)/kg	0.00	Extracción con K CIN	-
	H ⁺	(cmol+)/kg	0.00		-
Muestra 02	Arena	(%)	44.50	Hidrómetro de Bouyoucos	Franco Arcilloso
	Limo	(%)	25.00		
	Arcilla	(%)	30.50		
	Potencial Hidrógeno	pH	7.60	Potenciometría	Ligeramente alcalino
	Conductividad Eléctrica	dS/m	0.60	Extracto de Saturación	Muy ligeramente Salino
	Materia Orgánica	(%)	2.51	Walkley y Black	Medio
	P-disp.	ppm	12.80	Bray-Kurtz I	Medio
	K-disp.	ppm	169.30	Extracción con acetato de sodio	Medio
	Al ³⁺	(cmol+)/kg	0.00	Extracción con K CIN	-
	H ⁺	(cmol+)/kg	0.00		-

Fuente: Elaboración propia en base a los resultados del análisis del suelo.

En base a la propuesta de interpretación de Ibáñez y Aguirre (1983), la clase textural de los suelos 1 y 2 es Franco arcilloso, así como el pH de estos es Ligeramente alcalino, estos suelos son muy ligeramente salinos y el contenido de materia orgánica, fosforo y potasio disponible es de clasificación media, mientras que los cationes cambiables para Al³⁺ e H⁺, son nulos.

Cuadro 2.3. Análisis de Caracterización. Comunidad de Luyanta, 3217 msnm. Socos. 2016

	Propiedad	Unidad	Contenido	Método	Interpretación
Muestra 01	Arena	(%)	66.70	Hidrómetro de Bouyoucos	Franco Arenosa
	Limo	(%)	14.60		
	Arcilla	(%)	18.70		
	Potencial Hidrógeno	pH	8.59	Potenciometría	Fuertemente alcalino
	Conductividad Eléctrica	dS/m	0.47	Extracto de Saturación	Muy ligeramente Salino
	Materia Orgánica	(%)	1.90	Walkley y Black	Bajo
	P-disp.	ppm	15.20	Bray-Kurtz I	Media
	K-disp.	ppm	166.80	Extracción con acetato de sodio	Media
	Al ³⁺	(cmol+)/kg	0.00	Extracción con K CIN	-
	H ⁺	(cmol+)/kg	0.00		-
Muestra 02	Arena	(%)	64.30	Hidrómetro de Bouyoucos	Franco Arenosa
	Limo	(%)	17.20		
	Arcilla	(%)	18.50		
	Potencial Hidrógeno	pH	8.43	Potenciometría	Fuertemente alcalino
	Conductividad Eléctrica	dS/m	0.45	Extracto de Saturación	Muy ligeramente Salino
	Materia Orgánica	(%)	1.90	Walkley y Black	Bajo
	P-disp.	ppm	15.00	Bray-Kurtz I	Medio
	K-disp.	ppm	167.20	Extracción con acetato de sodio	Medio
	Al ³⁺	(cmol+)/kg	0.00	Extracción con K CIN	-
	H ⁺	(cmol+)/kg	0.00		-

Fuente: Elaboración propia en base a los resultados del análisis del suelo.

En base a la propuesta de interpretación de Ibáñez y Aguirre (1983), la clase textural de los suelos 1 y 2 es Franco Arenosa, así como el pH de estos es Fuertemente alcalino, estos suelos son muy ligeramente salinos y el contenido de materia orgánica

es bajo, el contenido de fósforo y potasio disponible es de clasificación media, mientras que los cationes cambiables para Al^{+3} e H^{+} , son nulos.

2.4. MATERIAL BIOLÓGICO

Las muestras (suelo y plantas de maíz) fueron colectadas en los meses de mayo (época de lluvia) y julio (época seca). Se tomaron tres sub-muestras por cada muestra de suelo, siendo nueve sub-muestras procedentes del Fundo Wayllapampa, seis sub-muestras del Centro experimental Canaán, y seis sub-muestras de la Comunidad de Luyanta; haciendo un total de veintiún sub-muestras.

2.5. VARIABLES EN ESTUDIO

En el presente trabajo de investigación, se consideró cuatro factores en estudio:

A. Cuantificación de poblaciones de HMA

- Densidad Poblacional (n° de esporas/100 gr suelo).
- Diversidad (o densidad) de esporas (Zona y época).

B. Identificación de HMA, simbiontes para *Zea mays* L. amiláceo

- Forma de esporas.
- Tamaño de esporas (micras, μm).
- Color de la espora (% CMYK).
- Reacción bioquímica (positivo o negativo, frente al reactivo de Melzer).
- Germinación de la espora.
- Estructura sub-celular de la espora.
- Estructuras micorrízicas en la raíz (Hifas, arbusculos, vesículas, células auxiliares).

C. Niveles de Colonización de HMA en raíces del hospedero

- Colonización de Hifas (% de colonización).
- Colonización de Arbusculos (% de colonización).
- Colonización de vesículas (% de colonización).

D. Prueba de Antagonismo

- Inhibición Micelial de *F. oxysporum* (% de inhibición).

- Tasa de Crecimiento Micelial de *F. oxysporum* (%) y Antibiosis (características del aislamiento).
 - Forma.
 - Elevación
 - Coloración
 - Borde
- Efecto máximo (% inhibición).

2.6. PROCEDIMIENTO

2.6.1 EXTRACCIÓN DE ESPORAS

Las esporas fueron extraídas a partir de raíces y suelo rizosférico de campos de cultivo, muestreadas durante los meses de mayo (época de lluvia) y julio (época seca) en base a la apreciación de la planta hospedante, siendo éste un ejemplar. Las muestras se tomaron en zigzag, extrayendo la totalidad de la zona de raíces más suelo (suelo rizosférico), a una profundidad de 20 cm, prestando especial atención a los primeros 10cm, que es la zona donde se dispone la mayor parte de raíces jóvenes. Las raíces y los suelos se depositaron en bolsas plásticas debidamente rotuladas, indicando la zona de recolección, el número de muestra y el número de sub-muestra. Estas sub-muestras de suelo rizosférico, se pusieron a refrigeración por un periodo máximo de 24 horas y a una temperatura de 4C°, para así preservarlas.

La técnica empleada para la extracción de esporas a partir de suelo rizosférico y raíces fue tomada del procedimiento de Tamizado Húmedo, propuesto por Gerdemann y Nicolson, (1963), y modificado por Daniels y Skipper, (1982), que consiste en lo siguiente: 100 g. de suelo rizosférico y raíces, se colocó en un envase con capacidad de 3.5 litros, se agregó 3lt de agua corriente y se agitó manualmente por un periodo de 5 minutos, asegurándose de no tener agregados, se dejó reposar por un periodo de 30 minutos, para permitir que las partículas de arcilla sedimenten, se tamizó el sobrenadante sobre una columna de tamices graduados de mayor a menor (500, 200 y 45 μm , de diámetro de poro), repitiéndose este procedimiento dos veces, la fracción retenida en el tamiz de 45 μm se puso en suspensión de agua corriente y se colocó en tubos de ensayo de 14 ml de capacidad, se puso 5ml de la suspensión en los tubos y

con la ayuda de una jeringa se adicionó sucrosa al 50% (p/v), al fondo del tubo, hasta completar 10ml, se llevaron a una etapa de centrifugación, a 3000 rpm por un periodo de 4 minutos, para eliminar detritus orgánicos y partículas de arcilla, al cabo de este tiempo se retiró el sobrenadante con ayuda de una jeringa y se depositó en el tamiz de 45 μm , para lavar las esporas con agua destilada hasta eliminar la sucrosa, el material lavado ahora se destina para la desinfección superficial de las esporas (Bago et al., 1998).

En tubos de ensayo esterilizados y sellados se colocó 5 ml de la suspensión de esporas en agua destilada y esterilizada, se agregó hipoclorito de sodio para una concentración final de 0.5%, y se centrifugó a 1500 rpm por 3 minutos, se extrajo el sobrenadante para aplicar una solución de 200mg.lt-1 de estreptomina (Sulfato de Estreptomina 160mg/2ml)y 100 mg.lt-1 de gentamicina (Gentamicina Braun 80mg/2ml), se centrifugó a 1500 rpm por 3 min, se extrajo el sobrenadante y se aplicó una solución de Tween 40 (20 gotas por litro), se centrifugó a 1500 rpm por 3 minutos, se extrajo el sobrenadante, y se le añadió agua destilada estéril, se agitó manualmente una vez, y se centrifugó a 1500 rpm por 3 minutos, repitiéndose este último paso cuatro veces, estas esporas finalmente se extrajeron con la ayuda de una jeringa, y se depositaron en placas de Petri esterilizadas con papel filtro estéril y humedecido con agua destilada esterilizada, y se almacenaron a 4°C en oscuridad. Las raíces retenidas en el tamiz de 500 y 200 μm se colectaron para ser trituradas en una licuadora por un periodo no mayor a 20 segundos con la finalidad de extraer las posibles esporas intraradicales, se repitió el procedimiento ya descrito con este material.

2.6.2 CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS

Para determinar el número de esporas, se utilizó el método de tamizado y decantación en húmedo propuesto por Gerdemann y Nicolson, (1963) y modificado por Morton, (2016), International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal (INVAM, 2016); y la centrifugación en sacarosa por Daniels y Skipper, (1982).

Las esporas aisladas y desinfectadas a partir de 100 g de muestra, fueron suspendidas en 15ml de agua destilada esterilizada. A partir de esta suspensión se tomaron 4

muestras de 1 ml, cada una de ellas fue colocada en una placa de Petri con papel filtro estéril (cuadrulado 0.5”), esto para facilitar el conteo de campos con la ayuda de un microscopio estereoscópico binocular Carl Zeiss Jena y aumentos de 50x y 70x, acondicionada con una lámpara de tungsteno. Se contabilizó cada placa de manera individual, se promediaron los conteos y se multiplicó por 15 para obtener la suspensión original.

Para la caracterización, instalación del cultivo monoespecífico y futura prueba de antagonismo, las esporas aisladas y desinfectadas se extrajeron directamente de la placa de Petri, sin suspensiones previas, con la ayuda de una aguja hipodérmica, las esporas se contabilizaron, en un microscopio estereoscópico binocular a un aumento de 50x, con lámpara de tungsteno y previa inspección de sus características, como tamaño, forma y color, así como la apariencia de ornamentaciones de la pared. Cada espora de caracteres aparentemente similares se colocó en una placa de Petri debidamente rotulada, indicando lugar de la muestra, número de sub muestra y nombre código de la espora.

2.6.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPORAS

Los morfotipos de HMA, se evaluaron en dos momentos, la primera caracterización se dio a partir de los aislamientos procedentes del campo de cultivo de los lugares seleccionados, la segunda caracterización se dio a partir de los cultivos monoespecíficos, esto para comprobar la continuidad de las características de los aislamientos y para la corroboración de la presencia de HMA.

La identificación de los morfotipos de HMA se realizó en base a las siguientes características morfológicas de las esporas: tamaño (diámetro en μm), color (usando una tabla de colores en base a la saturación de CMYK, Pantone® Process Color System Guide CMYK), forma, pared de la espora, pared germinal, estructura de pre-germinación, germinación de la espora e hifa de sostén, así como la reacción bioquímica de las capas de las paredes de la espora frente al reactivo de Melzer.

Las esporas caracterizadas fueron comparadas con los catálogos ilustrados de

International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal (INVAM, 2016), y del Department of plant Pathology of the Agricultural University of Szczecin (Blaszkowski, 2016), que sirvió para hacer la comparación a nivel de especies, en algunos casos.

2.6.4 ALMACENAMIENTO DE ESPORAS

Las esporas caracterizadas en los aislamientos se guardaron en placas de Petri con papel filtro estéril y humedecido con 2ml de agua destilada esterilizada, cada 7 días, las placas se dispusieron en un refrigerador a 4°C por un periodo de 45 días hasta su uso, las cuales no perdieron viabilidad.

2.6.5 GERMINACIÓN DE ESPORAS

Con la finalidad de apreciar las estructuras que se forman al momento de la germinación de la espora, se tomaron 30 esporas adultas por cada morfotipo (carentes de la capa L1 o sin capa L1, degradada), previamente desinfectadas superficialmente y se transfirieron a un papel filtro estéril, bajo un estereoscopio se distribuyeron homogéneamente sin contacto entre sí, en una maceta con arena y suelo agrícola esterilizado (4:1 v/v), el papel se dobló a la mitad dos veces, para ser enterrado en el sustrato humedecido, se cubrió el envase con una película plástica para limitar la evaporación, y se dejó a temperatura ambiente (17.5°C), al cumplirse 21 días, se examinaron las esporas y sus estructuras de germinación en un microscopio estereoscópico y un microscopio compuesto.

2.6.6 CULTIVO MONOESPECÍFICO

Se estableció un cultivo monoespecífico bajo las consideraciones propuestas por Brundrett et al., (1996), con el fin de apreciar la interacción de los especímenes aislados (simbiosis HMA y colonización), en las raíces del hospedero (*Zea mays* L. amiláceo), así como para la apreciación de la continuidad de las características identificadas de los morfotipos aislados en campo, las plantas se mantuvieron por 100 días, en condiciones de laboratorio a una temperatura media de 17.5°C y una humedad relativa de 51.6% , durante los meses de agosto, septiembre, octubre y noviembre (10 de agosto, 2016, instalación del cultivo monoespecífico; al 18 de noviembre, 2016,

extracción de raíces del cultivo monoespecífico), con suspensión del riego en las tres últimas semanas, esto para someter a las plantas a estrés y con ello estimular la esporulación.

a) Preparación del sustrato

Se utilizó suelo agrícola propio de la zona de recolección de muestras de suelo rizosférico, tamizado (tamiz de 500 μm) y mezclado con arena fina de río en una proporción de 4:1 (4 volúmenes de arena fina y 1 volumen de suelo agrícola), y esterilizados en autoclave a 121°C ó 15lb/pulg², durante una hora por tres días. Se llenaron las macetas desinfectados con hipoclorito de sodio al 2%, con 900g de sustrato y se sellaron con una película plástica para evitar su contaminación.

La capacidad de campo, se determinó por el método gravimétrico, se pesó 100g de suelo seco, y se agregó agua, se dejó drenar completamente, se pesó nuevamente y se estableció volumen de agua; siendo este del 21%. Sánchez et al., (2010), recomiendan mantener la capacidad de campo al 60% en macetas o recipientes sin drenaje; por lo tanto la cantidad de agua empleada fue de 12.6% en función al peso de sustrato.

b) Desinfección de semillas

La superficie de las semillas de *Zea mays* L. amiláceo, se desinfectaron con el uso de alcohol de 70°, en agitación constante por 2 minutos, se enjuagaron con agua estéril y destilada, para luego ser lavadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1%, en agitación por 2 minutos, y dejándose reposar por otros 3 minutos, en este punto las semillas que flotan se descartan por el riesgo de integridad de la semilla. Las semillas luego se enjuagaron cuatro veces con agua destilada esterilizada.

c) Preparación del semillero

La preparación del semillero se realizó diez días antes del establecimiento del cultivo monoespecífico, en una maceta sin drenaje con sustrato estéril y 7cm de profundidad se dispusieron 50 semillas de maíz amiláceo desinfectadas, y se cubrieron con 1cm de sustrato, se regó a capacidad de campo, (14 kg de sustrato, regados con 1.8lt), se

cubrió con papel kraft, para evitar la evapotranspiración y dar condiciones de oscuridad a las semillas.

d) Inoculación

Se prepararon suspensiones de 75 esporas/2ml de agua destilada estéril, por cada uno de los aislamientos, regando los contenedores con 110ml agua destilada estéril, con la ayuda de una varilla de vidrio desinfectada en alcohol de 70°C, se realiza un agujero en el sustrato de cada contenedor de 900g, se tomaron 3 plantas del semillero de tres hojas, por cada aislamiento, con una edad de 10 días y raíces seminales de 12 cm y radícula de 15cm.

La extracción de las plantas se realizó manualmente removiendo cuidadosamente el sustrato y evitando lesionar las raíces, con ayuda de una jeringa y una aguja hipodérmica (18G – ϕ 1.2mm), se inoculó la radícula al total de su longitud, el exceso o goteo de este procedimiento se dejó caer sobre los agujeros de los contenedores, las plantas se trasplantaron inmediatamente al agujero de los contenedores y se cubrieron con el mismo sustrato, los contenedores con plantas se cubrieron con una película de plástico, por tres días para reducir el estrés por trasplante, momento en el cual se limita la película de plástico a la altura del cuello de la planta, esto para reducir las pérdidas de agua por evapotranspiración y evitar la contaminación del sustrato.

e) Fertilización

Sánchez et al., (2010), recomienda una fertilización de: 12.5 kg/ha de fósforo, 50 kg/ha de potasio, evitando fertilizar con nitrógeno por el riesgo del carácter parasito que puedan desarrollar las esporas Glomeraceae, para este tipo de sustrato. Los cálculos en base al análisis de caracterización fueron:

Fundo Wayllapampa

Muestra 1:	60.1 kg/ha P_2O_5 – 307.6 kg/ha de K_2O
Muestra 2:	60.1 kg/ha P_2O_5 – 303.9 kg/ha de K_2O
Muestra 3:	56.6 kg/ha P_2O_5 – 350.7 kg/ha de K_2O

Centro Experimental Canaán

Muestra 1: 60.1 kg/ha P₂O₅ – 307.6 kg/ha de K₂O

Muestra 2: 60.1 kg/ha P₂O₅ – 303.9 kg/ha de K₂O

Comunidad de Luyanta

Muestra 1: 90.5 kg/ha P₂O₅ – 520.4 kg/ha de K₂O

Muestra 2: 89.3 kg/ha P₂O₅ – 521.7 kg/ha de K₂O

2.6.7 IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES SIMBIONTES PARA *Zea mays* L. amiláceo

La identificación se realizó tanto de las esporas colectadas en campo, así como de las propagadas en los cultivos monoespecíficos, para ello, la caracterización de esporas HMA se realizó en montajes de portaobjetos y observadas en un microscopio compuesto (modelo Mc-300A). Se utilizaron las claves de identificación, propuestas por Morton & Redecker, (2001), para la identificación de la pared de la espora y sus capas; Schüßler et al.; Morton; Redecker, (2001), proponen las claves de identificación de paredes germinales; las estructuras de pre-germinación cuyas características son detalladas por Morton, (2002) & Kramadibrata et al., (2000); las características de desarrollo específicas de cada Familia y sus géneros, se detalla para: Acaulosporaceae por Morton, (2000); Morton & Benny, (1990); Ambisporaceae por Morton & Redecker, (2001); Spain et al., (2006); Walker et al., (2007); Archaeosporaceae por Morton & Redecker, 2001; Schüßler et al. (2001); Claroideoglomeraceae por Schüßler & Walker, (2010); Diversisporaceae; Walker & Schüßler, (2004); Gigasporaceae por Morton & Benny, (1990); Bentivenga & Morton, (1995); Walker & Sanders, (1986); Glomeraceae por Morton, (2001); Schüßler et al. (2001); Pacisporaceae por Oehl, & Sieverding, (2004); Paraglomaceae por Morton & Redecker, (2001).

Estas descripciones se contrastaron con las descripciones realizadas a los morfotipos aislados de los suelos en estudio y se compararon con las ilustraciones de las especies proporcionadas por el Dr. Joseph Morton en la INVAM (Colección Internacional de hongos micorrizógenos arbusculares, West Virginia University, W.V., USA, sitio web

[http:// http://invam.wvu.edu/](http://invam.wvu.edu/)), y por Dr. Janusz Blaszkowski (Department of Plant Pathology of the Agricultural University of Szczecin, Poland, sitio web <http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/index.html>) así como las publicaciones originales de las especies.

Las características macroscópicas que se apreciaron en el microscopio estereoscópico binocular fueron: color (% saturación CMYK), forma, presencia de hifa de sostén y sáculo esporífero; mientras en el microscopio compuesto (modelo Mc-300A) se pudo apreciar características taxonómicas tales como: el tamaño (μm), la presencia y tipo de ornamentación sobre la pared de la espora, reacción de las capas frente al reactivo de Melzer, número de capas de las paredes, número de paredes germinales y grosor de la pared de la espora. El método para hacer los montajes se basó en lo establecido por Schenck & Pérez, (1990).

a. Observación y separación de morfotipos

Las esporas que fueron extraídas del suelo por los métodos antes mencionados, se colocaron en una placa de Petri con papel filtro humedecido, en agua estéril y destilada, para examinarlas en luz reflejante bajo el microscopio estereoscópico en aumentos de 50x y 70x. En este punto se tomó en cuenta el color de la espora, presencia de hifa, superficie, forma, tamaño, etc.

b. Montaje de esporas

Las muestras se prepararon con 50 esporas intactas, por cada uno de los morfotipos aislados, tal y como se explica a continuación.

- En un portaobjetos, se coloca una gota de PVLG y una gota de la disolución de PVLG : Reactivo de Melzer (1/1; v/v), procurando una distancia para que estas no entren en contacto.
- Con la ayuda del borde filo de la aguja hipodérmica (18G – 1.2mm), se toman las esporas de los aislamientos y se colocan al centro de la gota en el portaobjetos, procurando romper la tensión superficial (25 esporas para PVLG y 25 esporas para PVLG + Reactivo de Melzer).

- Las muestras se dejan secar por 15 minutos, para que el medio del montaje se tornen más viscosas.
- Con sumo cuidado se coloca el cubre-objetos con en un ángulo de 45° sobre la gota de PVLG y otro cubre-objetos sobre la gota de PVLG + Reactivo de Melzer.
- Con la ayuda de una aguja hipodérmica se rompen las esporas aplicando presión sobre el cubre-objetos, para poder exponer las paredes germinales y sus capas.
- Se etiquetan los montajes, incluyendo el número de muestra (suelo), procedencia, nombre código de la spora y fecha.
- Los montajes se guardaron a temperatura ambiente en un ambiente oscuro y sellado.

c. Secado del montaje

Los montajes se dejaron secar, al medio ambiente por 5 días, en un espacio oscuro, esto para disminuir el espacio entre el cubreobjetos y el portaobjetos, permitiendo la documentación fílmica de las estructuras sub-celulares de las esporas montadas.

d. Observación de esporas

Las esporas fueron examinadas a diferentes aumentos en el microscopio compuesto (modelo Mc-300A), iniciando de menor a mayor aumento (4x-10x- 40x y 100x), con un ocular de 10x.

Cuadro 2.4. Relación objetivo con campo visual del microscopio compuesto modelo MC-300A

	Objetivos			
Unidades	4x	10x	40x	100x
mm	4.5	1.8	0.45	0.18
Micras	4500	1800	450	180

Fuente: Microscopia-Biología. Disponible en: <http://files.ariel-biologia.Webnode.es/200000137-1163a125de/1%20Microscop%C3%ADa.pdf>. Accesado 25 marzo, 2017.

Se fotografiaron las esporas y con el uso de programa PS-CS5 Extended, se midió el diámetro de la espora, ancho de las capas y paredes, etc. Así mismo, se tomaron fotografías a cada espécimen colectado para tenerlos de referencia.

Con lo anterior, se determinó la riqueza específica (S), la frecuencia relativa (Fr), índice de equidad (H'), índice de dominancia (c), e índice de similitud (CCj), de las especies micorrízica asociadas a *Zea mays* L. amiláceo, de los campos evaluados.

- Riqueza específica (Moreno, 2001)
Es el número total de especies obtenidas en el muestreo.
- Frecuencia Relativa (Moreira et al., 2007)

$$Fr = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de individuos de la especie micorrizica}}{\text{N}^\circ \text{ total de individuos de todas las especies micorrizicas}} \times 100$$

- Índice de equidad de Shannon-Wiener (Moreno, 2001)
Este índice expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra y se expresa mediante la siguiente formula:

$$H' = \sum (p_i * \ln p_i)$$

Dónde: $p_i = \frac{n_i}{N}$

Donde, n_i es el valor de importancia de cada especie y N es el número total de individuos.

- Índice de Dominancia (Simpson, 1949)
Este índice manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar sean de la misma especie (Moreno, 2001) y su fórmula es:

$$C = \sum (n_i/N)^2$$

Dónde, n_i es el número de individuos de cada especie y N es el numero total de individuos en todos los tratamientos.

- Índice de similitud de Jaccard entre bioensayos (Moreno, 2001)

Expresa el grado en el que dos muestras son semejantes por las especies presentes en ellas, su fórmula se expresa:

$$CC_j = \frac{c}{a + b - c}$$

Dónde, a y b son el número de especies en los ecosistemas 1 y 2; c es el número de especies comunes en los dos ecosistemas

2.6.8 TINCIÓN DE RAICES

Las raíces se tomaron de los contenedores del cultivo monoespecífico al cabo de 100 días desde la inoculación, las raíces a evaluar debían ser jóvenes y de un diámetro no mayor a 1 mm. Estas se lavaron con abundante agua corriente hasta eliminar todo el material mineral, este paso se realizó con extremo cuidado a fin de no dañar la estructura radical, las muestras de raíz se estandarizaron a 0.5g por tubo de ensayo a fin de permitir el paso rápido de los reactivos entre las muestras, se perforaron tubos de ensayo plásticos con agujas hipodérmicas (24G – ϕ 0.56mm), con la finalidad de permitir el drenaje de reactivos en los tubos sin permitir que se pierdan las muestras de raíz.

La metodología empleada para apreciar la simbiosis fue propuesta por Merryweather & Fitter (1991), teniendo los siguientes pasos:

- Se precalentó el baño maría a 90°C, con los recipientes de KOH 10%, H₂O₂ 10%, HCl 2% y Fucsina ácida al 0.05%.
- Se depositan las raíces en los tubos de ensayo perforados, el **clareamiento** en KOH 10%, se da con el fin de eliminar el contenido citoplasmático, por diez minutos, al cabo de este tiempo se retiran los tubos y enjuagan las raíces con agua destilada a temperatura ambiente, se sumergen los tubos en H₂O₂ 10% por un minuto para eliminar el exceso de pigmento, se enjuaga una vez.
- Para realizar el **blanqueamiento** y **acidificación** de las muestras, los tubos se sumergieron en HCl 2%, por cinco minutos (neutralizar el KOH), se elimina el

HCl 2%, no se enjuaga, debido a que estas deben estar acidificadas para una tinción adecuada. En este punto las raíces se toman transparentes o blanqueadas.

- Para la **Tinción de raíces**, se sumergieron los tubos en la solución de Fucsina ácida 0.05%, por 5 minutos.
- **La eliminación del exceso de pigmento**, se dio con la inmersión de los tubos de ensayo en lacto-glicerol por 12 horas; luego de esto se transvasaron a otro recipiente con Lacto-glicerol, para su preservación.

2.6.9 DETERMINACIÓN DE LA COLONIZACIÓN EN RAÍCES

La metodología utilizada fue propuesta por Mosse (1980), para determinar el porcentaje de colonización se cuadrículó un papel (0.5" x 0.5"), en una placa de Petri de 18cm de diámetro, la longitud total de raíces para analizar se calculó con la siguiente formula:

$$R = \frac{\pi An}{2H}$$

Dónde:

R: Longitud total de las raíces.

π : 3.14.

A= área en que las raíces están distribuidas (área de la placa de Petri).

n: Número de intersecciones entre raíces y líneas.

H: longitud de las líneas rectas (Total horizontal y vertical).

Dando como resultado 39.81, siendo más práctico trabajar con 40 cm de longitud de raíz, el propósito es tener tantas intersecciones como centímetros de raíz.

Entonces las raíces teñidas con fucsina ácida, se disponen en la placa logrando 40 intersecciones, se contaron las intersecciones micorrizadas con la ayuda del estereoscopio, identificando alguna estructura micorrízica (hifas, arbusculos, vesículas o esporas). El porcentaje de colonización se calculó con la siguiente formula:

$$\% \text{ Colonización} = \frac{\text{Intersecciones colonizadas}}{\text{Intersecciones de raiz total}} \times 100$$

Para la clasificación según el grado de colonización de las raíces por hongos formadores de micorrizas arbusculares, se empleó la categorización propuesta por Trouvelot et al., (1986).

Cuadro 2.5. Categorías para la micorrización por HMA

Categoría	0	1	2	3	4	5
Porcentaje	0%	<1%	<10%	<50%	>50%	>90%

Donde la categoría 0, es nula; categoría 1, muy pobre; categoría 2, pobre; categoría 3, media; categoría 4, buena y categoría 5, excelente.

2.6.10 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SOLUBLES

Para esta prueba se produjo metabolitos inhibitorios solubles a partir de los nueve aislamientos de HMA, las esporas de los aislamientos de HMA se tomaron de las placas de Petri, en condiciones asépticas, y la ayuda de una jeringa se mantuvo en una suspensión de agua destilada estéril (75 esporas/ml).

Se tomó un envase de vidrio estéril para cada uno de los aislamientos de HMA, conteniendo 50ml de medio MIN (Caldo Mínimo en Sales – ver anexo 2), y 50 mg de ácido aspártico, se adicionó la suspensión de esporas a cada envase, estos fueron encubados a 25°C por 7 días, con agitación diaria de 5 minutos. Posteriormente las esporas y cualquier estructura que hayan formado fueron removidas por filtración, con la ayuda de papel filtro estéril, se extrajo 15 ml del filtrado y se adicionó un volumen igual de PDA con 3% de agar (ver anexo 2) y se vertió en placas de Petri (100 x 15mm).

En el centro de cada placa se colocó un disco de PDA (6 mm de diámetro), con micelio del patógeno *Fusarium oxysporum*, de una edad de crecimiento de siete días y a una temperatura constante de 25°C; se trabajó con tres repeticiones por filtrado y las placas se encubaron a 25°C por 7 días.

Para los controles se preparó, el medio MIN y PDA (50% v/v), y PDA, sin el material filtrado procedente de los HMA. La inhibición micelial de *Fusarium oxysporum*, se

registró como la diferencia entre la media del crecimiento radial en la presencia y ausencia de filtrado de HMA.

2.6.11 CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE LOS HMA, FRENTE A *Fusarium oxysporum*

Inhibición micelial (% de Inhibición)

Se tomaron mediciones del crecimiento micelial del patógeno *Fusarium oxysporum*, a los 7 días, momento que el control fue colonizado por completo, el porcentaje de inhibición micelial fue determinado por el promedio de la diferencia de la media del control (\bar{Y} control) con la media del tratamiento conteniendo los metabolitos inhibitorios solubles (\bar{y} metabolitos) con respecto al control (\bar{Y} control).

$$\% \text{ de inhibicion} = \frac{(\bar{Y} \text{ control} - \bar{y} \text{ metabolitos})}{\bar{Y} \text{ control}} \times 100$$

Tasa de Crecimiento Micelial

Se tomaron mediciones del crecimiento micelial del patógeno *Fusarium oxysporum*, durante 7 días, cada 24 horas, momento que el control fue colonizado por completo, la tasa de crecimiento micelial fue determinado por la siguiente fórmula.

$$\text{Tasa de Crecimiento} = \left[\left(\frac{\bar{X} \text{ colonizacion final}}{\bar{x} \text{ lonizacion inicial}} \right)^{\frac{1}{n}} - 1 \right] \times 100$$

Dónde:

- Colonización final : media de la colonización a los 7 días.
- Colonización inicial : media de la colonización inicial día 0.
- n : número de días o periodo.

Antibiosis

Se describieron macroscópicamente a los aislamientos que presentaron el Efecto-Antibiosis.

Efecto máximo de la Antibiosis

Se tomaron medidas del diámetro de los aislamientos del hongo patógeno *Fusarium oxysporum*, respecto al control, para determinar el porcentaje de crecimiento

micelial, hasta el momento que dejó de haber crecimiento micelial, hecho que ocurrió al noveno día, únicamente en los aislamientos que presentaron Efecto-Antibiosis, se realizó análisis de regresión para determinar, el modelo de crecimiento micelial, para determinar el Efecto máximo del antagonismo.

2.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el análisis estadístico de Cuantificación de población de HMA, se empleó el diseño completamente aleatorio (DCR), con 6 tratamientos y 3 repeticiones; Infección de Raíces, Inhibición micelial y Tasa de Crecimiento Micelial, se empleó el Diseño completamente Aleatorio (DCR) con 9 tratamientos, 3 repeticiones y 2 testigos, los tratamientos consisten en 75 esporas/ml como inóculo o Metabolitos inhibitorios solubles procedentes de 75 esporas/ml. Para la prueba de antagonismo, se cuenta con un control (sin Medio MIN) y un testigo de contraste (PDA + MIN).

Efecto máximo de la antibiosis, se empleó el Diseño completamente Aleatorio (DCR) con 8 tratamientos y 3 repeticiones; El tratamientos modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

- Y_{ij} : Variable respuesta de j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento.
- μ : Media general.
- τ_i : Efecto del tratamiento i.
- ϵ_{ij} : Error experimental aleatorio.

Sub índice:

- i : 1, 2, ... 8 tratamientos.

Análisis de varianza del modelo

- H_0 : $\tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_8$
- H_a : Al menos un efecto de un tratamiento es diferente de los demás.

2.8 PROCESAMIENTO DE DATOS

Los resultados de las variables evaluadas, se ordenaron en cuadros y luego se realizó el Análisis de varianza (ANVA). Al encontrar significación estadística, se procedió a realizar las pruebas correspondientes (prueba de Tukey o Dunnett y Análisis de regresión).

Para la cuantificación de poblaciones de HMA, la interacción de medias entre las zonas de estudio y las épocas, se realizó la prueba de Tukey ($p=0.05$), mientras que para la comparación entre épocas se realizó a través de la prueba de t-student.

La evaluación del nivel de colonización de HMA, se desarrolló en DCR, con prueba de Tukey (0.05), al encontrarse diferencia estadística.

La identificación de hongos micorrízicos arbusculares simbiotes para maíz se desarrolló, con un análisis de varianza para la densidad poblacional por especies, y un análisis de población y diversidad (Índice de dominancia, Índice de diversidad de Shannon y Similitud) entre zonas de estudio.

En la prueba de inhibición micelial y tasa de crecimiento, se empleó la prueba de Dunnett (0.05), al encontrarse diferencia estadística entre los valores de inhibición.

Para el efecto máximo de la antibiosis, se realizó el análisis de varianza y análisis de regresión para describir el crecimiento micelial, así como el efecto máximo del antagonismo; el efecto máximo de la antibiosis se analizó con la prueba de Tukey (0.05).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CUANTIFICACIÓN DE POBLACIONES MICORRÍZICAS

En el cuadro 3.1, se presenta el análisis de varianza para el número de esporas en la interacción de zona y época, resultando en una alta significación estadística, por lo que se realizó la prueba de Tukey (0.05), para las comparaciones múltiples de medias, (gráfico 3.1).

La densidad poblacional de esporas de HMA, entre las zonas de estudio y las épocas del año, muestran diferencias estadísticas significativas, se observó un mayor número de esporas en la época seca en comparación a la época lluviosa, en las tres zonas de estudio, (gráfica 3.1), los valores promedio de esporas por 100g de suelo en la época seca fue de 3164, 2393 y 1421 esporas, mientras en la época de lluvias el número de esporas en promedio fue de 334 , 262 y 152; para Centro Experimental Canaán , El fundo Wayllapampa y Comunidad de Luyanta, respectivamente.

Al comparar el número de esporas entre las dos épocas, mostraron diferencias estadísticas (grafica 3.2); Centro Experimental Canaán (n: 9; t: 2.67; p: 0.03), registró 3164.2 esporas/100g de suelo en la época seca y 334.8 esporas/100g de suelo en la época de lluvias; El fundo Wayllapampa (n: 9; t: 2.49; p: 0.04), registró 2393.0 esporas/100g de suelo en la época seca y 262.1 esporas/100g de suelo en la época de lluvia; ; Comunidad de Luyanta (n: 9; t: 1.83; p: 0.10), registró 1421.3 esporas/100g de suelo en la época seca y 152.5 esporas en la época lluviosa.

Cuadro 3.1. Análisis de varianza para Cuantificación de esporas de HMA

<i>Fuentes de variación</i>	<i>G.L</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>Fc</i>
Tratamientos	5	15946118	3189223.6	316.06	< .0001**
Error	6	60541.7	10090.3		
Total	11	16006660			

C.V = 7.83 %

En la gráfica 3.1, resultado de la prueba de Tukey (0.05), se aprecia diferencia estadística para las tres zonas de estudio en cuanto a la densidad poblacional de esporas de HMA en la época seca, sin embargo no se aprecia diferencia estadística entre las tres zonas de estudio en la época de lluvias.

La densidad media de esporas de HMA es de 3164, 2393 y 1421 por 100g de suelo en la época seca y de 334, 262 y 152 por 100g en la época de lluvias, para el centro Experimental Canaán, Fundo Wayllapampa y Comunidad de Luyanta respectivamente, estos valores son superiores a los encontrados por Alfonso, (2011) quien obtuvo conteos de 1333 y 100 esporas/100g de suelo en la época seca y de lluvias respectivamente; Fredis et al. (2014) quien obtuvo entre 640 y 1100 esporas/100 g de suelo, asociados al pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) y Heriberto, (2012) quien obtuvo conteos de 1400 y 700 esporas/100g de suelo en la época seca y de lluvias respectivamente.

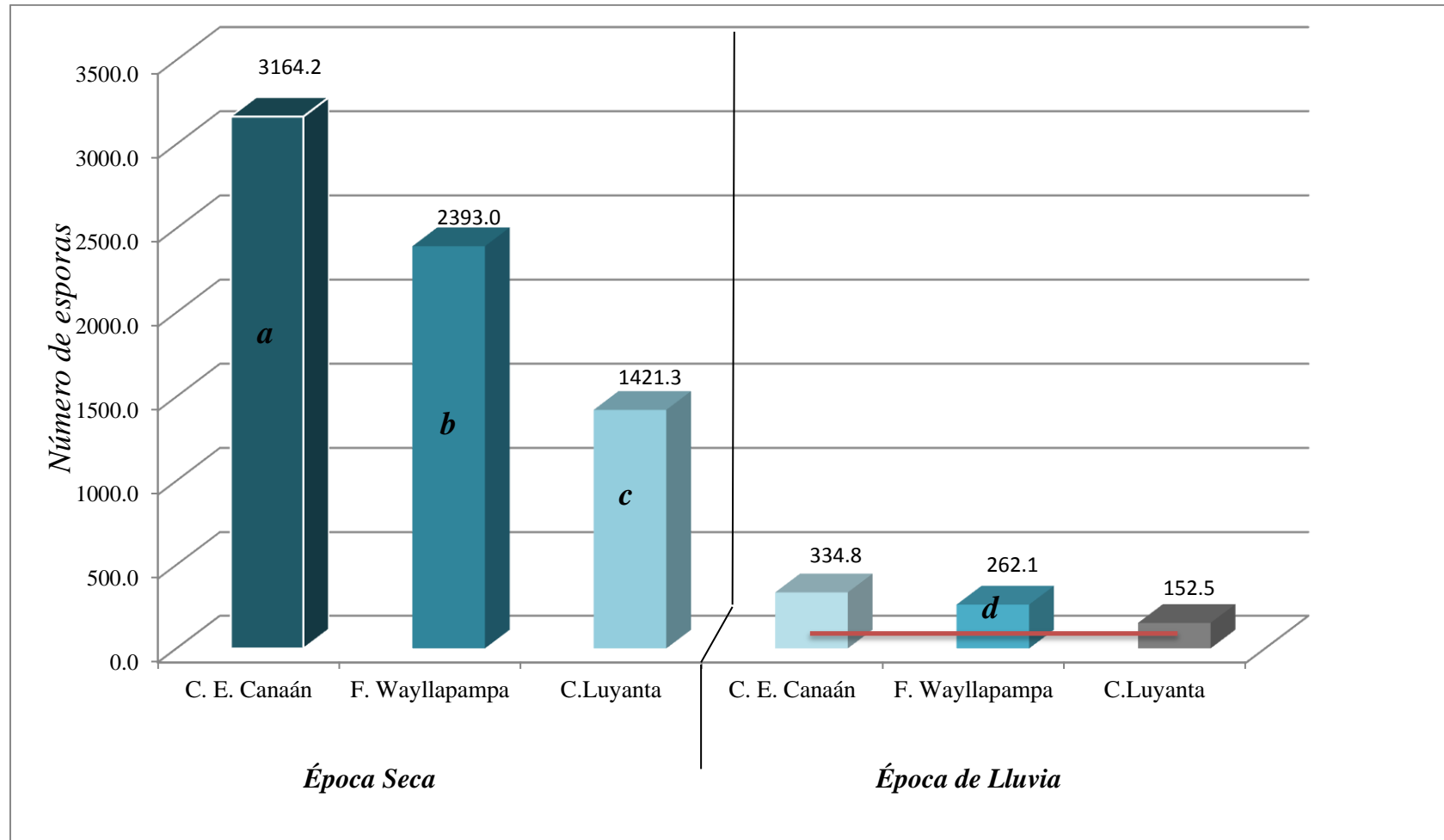


Gráfico 3.1. Prueba de Tukey (0.05) para la cuantificación poblacional de HMA por 100g de suelo, en las tres zonas de estudio para la época seca y de lluvia

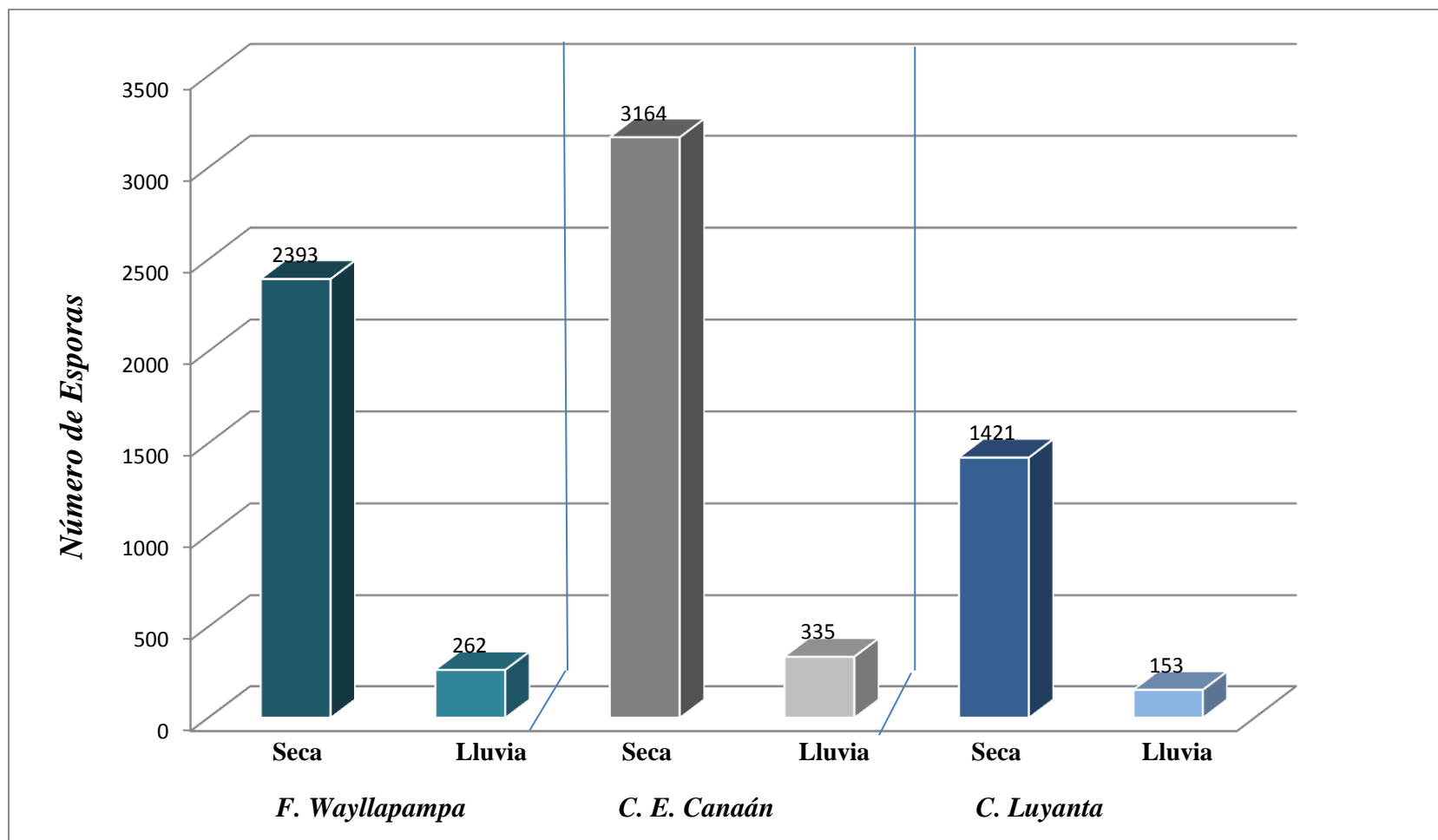


Gráfico 3.2. Prueba de t-student, para la media de muestras emparejadas, para la cuantificación poblacional de HMA por 100g de suelo, en las tres zonas de estudio, en la época seca y de lluvia

La densidad poblacional de esporas de HMA en estos suelos es muy variable y depende en gran medida de los factores ambientales y estacionales (Yuan et al., 2011) esto se observó en las tres zonas de estudio, donde las poblaciones de HMA, difieren en su densidad poblacional entre cada época del año. Moreira, (2006) menciona que durante la micorrización la producción de esporas es mínima, lo cual explicaría la baja densidad de esporas encontradas durante la época de lluvias, mientras el cultivo se encuentra presente. En la literatura, se ha documentado que el agua es un factor importante que determina la abundancia de esporas, exponen que existe una mayor densidad poblacional al final de la estación seca y disminuye conforme aumenta las tasas de precipitación (Guadarrama & Álvarez, 1999; Mangan & Adler, 2002).

La respuesta de los HMA frente al pH del suelo es muy variable (Serralde & Ramírez, 2004) encontrándose respuesta positiva en función a la densidad de esporas, a pH ácido en Acaulosporaceae, Diversisporaceae, Entrophospora y Gigasporaceae, y respuesta positiva a pH alcalino en Glomeraceae; El efecto del pH está relacionado con la disponibilidad de P, lo cual puede afectar la función del HMA y el proceso de micorrización, aunque se considera que los HMA toleran condiciones adversas de pH por modificación de la micorrizósfera durante el proceso de toma de nutrientes. Se considera que los HMA se adaptan al pH del suelo de su origen; en base los resultados de caracterización, todos los suelos presentan pH que va de ligeramente alcalino a fuertemente alcalino, esto indicaría una predominancia de HMA de la familia Glomeraceae, los niveles de P-disp. son clasificados en niveles que van de bajos a medios (no mayores a 18ppm; consideración propuesta por Rodríguez et al., 2008, para efectos de supervivencia y abundancia de los HMA); Goransson et al., (2008) demuestra la toxicidad del aluminio (Al^{+3}), para los HMA, a nivel de micorrización y esporulación, este efecto no se aprecia en el presente estudio, debido al nivel de pH.

3.2. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES SIMBIONTES PARA *Zea mays* L. amiláceo.

A partir de las muestras evaluadas se encontraron en total 21 morfotipos de esporas de HMA, estos finalmente se resumen a 9 especies identificadas asociadas a *Zea mays* L. amiláceo, las que se describen a continuación:

3.2.1. GLOMERALES

GLOMERACEAE

Funneliformis

Funneliformis mosseae (T. H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & Schüßler

La caracterización de este espécimen, fue contrastada con las descripciones realizadas por Nicolson, y Gerdemann, (1968); Schüßler y Walker, (2010); Blaszkowski, (2016) y Morton, (2016).

Esporocarpos

Forma esporocarpos, con un tamaño de 100 a 140 μm , conteniendo de 10 a 15 esporas, rodeadas de un peridio grueso de color marrón(C:20 M:45 Y:95 K:0), este peridio tiene un espesor de 10 a 20 μm , con hifas de 2 a 4 μm de diámetro.

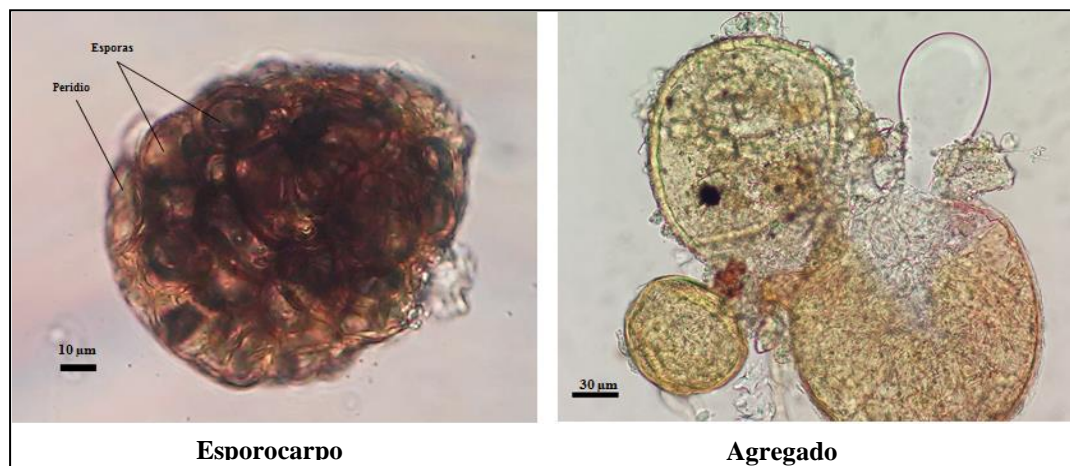


Figura 3.1. Esporocarpo y agregado, típico de *Funneliformis mosseae*

Esporas

Se forman en el suelo, en agregados o en esporocarpos compactos.

Color: pajizo (C:0 M:5 Y:25 K:5) a amarillo ocre (C:0 M:10 Y:60 K:10).

Forma: de forma globosa, sub-globosa e irregulares.

Tamaño de la distribución: de 90 a 280 μm , media de 199 micras (n = 50).

Estructura Sub-celular de la Espora

Pared de la espora

Formada por tres capas (L1, L2 y L3). En la mayoría de los casos, las capas L1 y L2

se desprenden con la edad, dejando únicamente la capa L3.

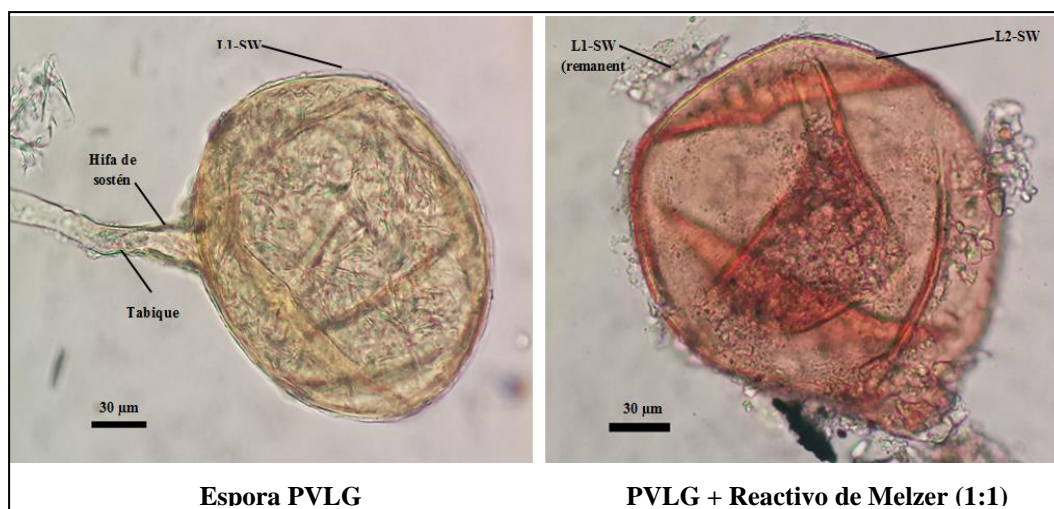


Figura 3.2. Características morfológicas de la espora *Funneliformis mosseae*

Capa L1: capa mucilaginosa, hialina, de 1 a 3 µm de espesor, tinción rojiza en el reactivo de Melzer (C:20 M:60 Y:20 K:5), esta capa se desprende con facilidad en los montajes, adoptando una apariencia granular.

Capa L2: es semiflexible lisa y hialina, de color pajizo (C:10 M:15 Y:35 K:0), lisa por ambas superficies de 1 a 3 µm de espesor, no es fuertemente adherente a la capa L3, no presenta tinción frente al reactivo de Melzer.

Capa L3: capa laminada de 3 a 5 µm de espesor, de color amarillo marrón (C:0 M:10 Y:80 K:0), a amarillo pálido (C:0 M:25 Y:75 K:5).

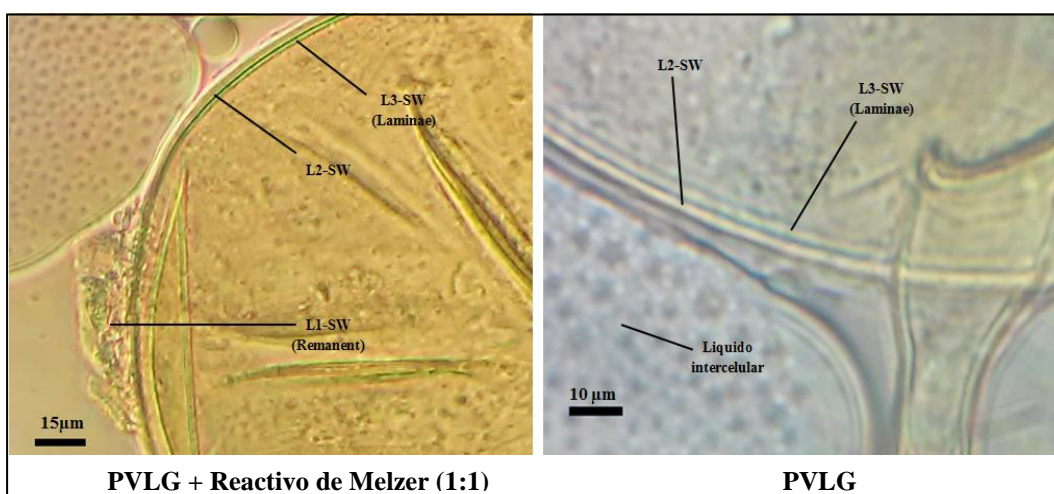


Figura 3.3. Características sub-celular de la espora *Funneliformis mosseae*

Hifa de Sostén

Forma: en forma de embudo.

Ancho: de 20 a 30 micras, en la base de la espora.

Estructura de la pared: se observa que es continua con las capas L1, L2 y L3 de la pared de la espora, y concoloro a estos, un espesor de 3 a 5 micras.

Oclusión: se aprecia un tabique, continuo con la lámina más interna de la capa L3.

Germinación

Un tubo germinal emerge desde el lumen de la hifa de sostén.

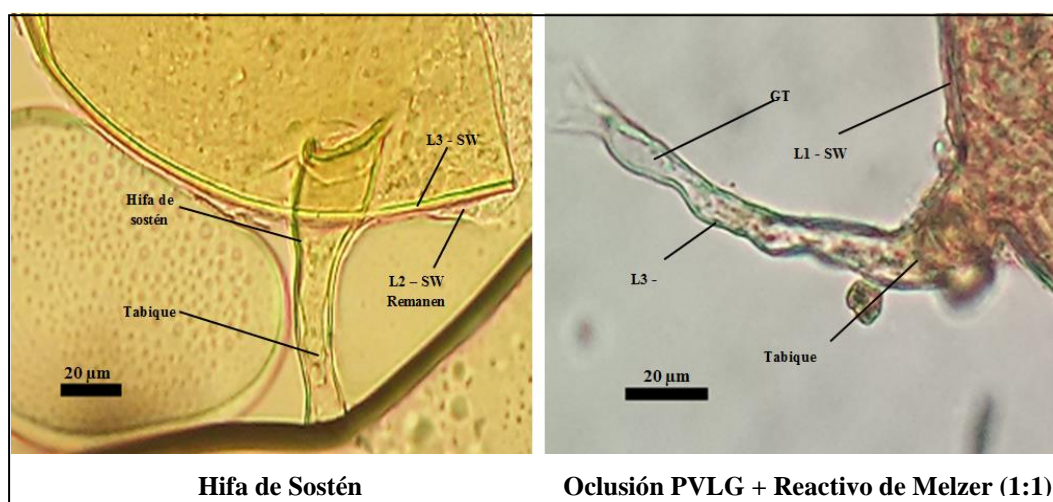


Figura 3.4. Características de la hifa de sostén, de la espora *F. mosseae*

Micorrización

Se aprecian estructuras tales como arbuscúlos, vesículas e hifas intraradicales, la tinción es de un magenta oscuro (C:20 M:40 Y:90 K:10), en Fucsina ácida 0.05%.

Colonización

Se observó en promedio 52% de colonización para una longitud de 40 cm de raíz micorrizadas y 40 puntos de intersección.

Micorrización a los 100 días en maíz

Las esporas que comparten semejanza con *Funneliformis mosseae*, son *Gl. caledonio*, *Glomus Hoi*, y *Gl. versiforme*; *Gl. caledonio*, posee 4 capas en la pared celular, de las cuales solo la capa L1 es la capa que se pierde en esporas adultas; *Glomus Hoi*, es una

espora con dos capas que conforman la pared de la espora, ninguna de ellas reacciona frente al reactivo de Melzer, Gl. versiforme, posee dos capas en la pared de la espora, la capa L1 se pierde en esporas maduras, mientras la capa L2 es permanente y semiflexible, sin embargo ninguna de ellas reacciona frente al reactivo de Melzer (Morton, 2016).

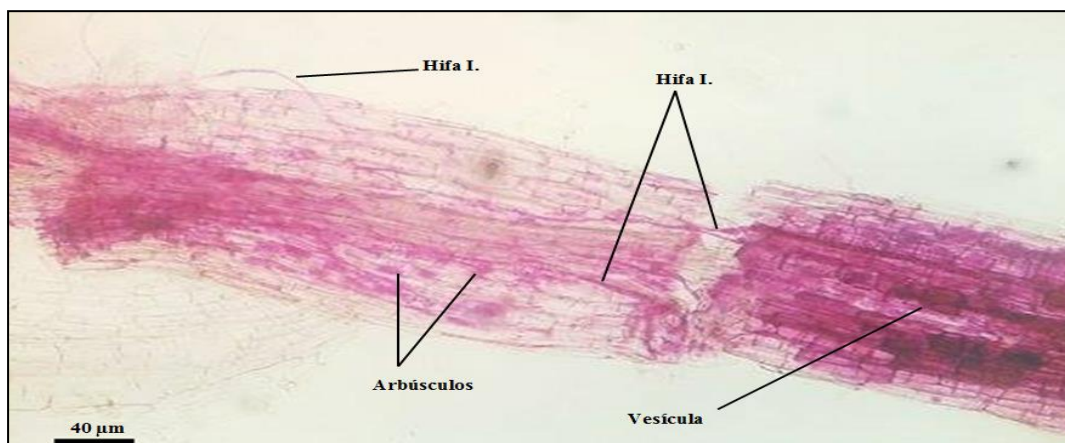


Figura 3.5. Estructuras micorrízicas, en la raíz-aislamiento *F. mosseae*

Glomus

Glomus ambisporum G.S. Smith & N.C. Schenck.

La caracterización de este espécimen, fue contrastada con las descripciones realizadas por Smith, y Schenck, (1985); Blaszkowski, (2016) y Morton, (2016).

Esporocarpos

De color marrón-oscuro (C:13 M:80 Y:100 K:60) a negro (C:56 M:56 Y:53 K:92), de forma sub-globosa a irregular, con tamaños variables de 440-360 a 390-280 micras (ancho x largo), el esporocarpo consiste en una capa de esporas originadas a partir de un núcleo central de hifas entreteljadas y gruesas (plexo), que desarrolla un tallo monohifal, el peridio es ausente.

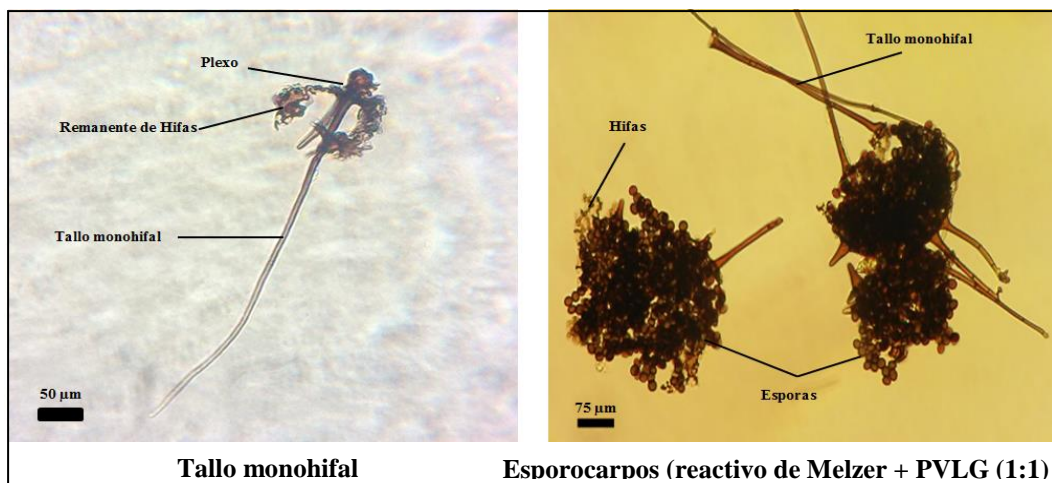


Figura 3.6. Esporocarpo y tallo monohifal de *Glomus ambisporum*

Esporas

Las esporas se producen en los esporocarpos o a partir de hifas esporógenas.

Color: de color naranja-marrón (C:6 M:61 Y:84 K:1) a marrón oscuro(C:13 M:80 Y:100 K:60).

Forma: las esporas son de forma globosa a sub-globosa de 80 a 150 micras de diámetro.

Tamaño de la distribución: de 80 a 145 micras, media de 132 micras (n = 50) .

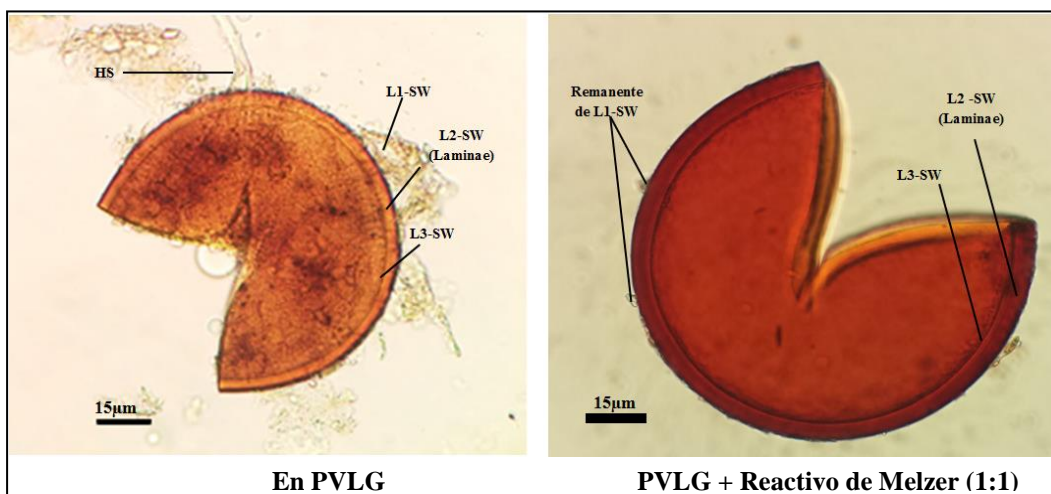


Figura 3.7. Características morfológicas de la spora *Glomus ambisporum*

Estructura Sub-celular de la Espora

Pared de la spora

La pared de esporas consta de tres capas, que se tiñen en conjunto frente al reactivo

de Melzer, obteniendo un color marrón rojizo(C:21 M:89 Y:99 K:11).

Capa L1: esta capa es hialina (C:0 M:5 Y:35 K:0), con un espesor de 3 a 5 micras, que se extiende por la superficie de toda la espora, la hifa de sostén hasta el esporocarpo, se aprecia una superficie reticulada con una disposición ordenada de placas hexagonales de 5 a 10 micras de ancho, esta capa se pierde en esporas maduras.

Capa L2: capa media, se conforma de sub capas finas y adherentes (laminadas), de 4 a 14 micras de espesor, esta capa es de color marrón oscuro (C:13 M:80 Y:100 K:60).

Capa L3: es la capa más interna, esta capa es delgada y flexible (<1 micra de espesor), inmediatamente colindante con la capa L2, y concoloro a este.

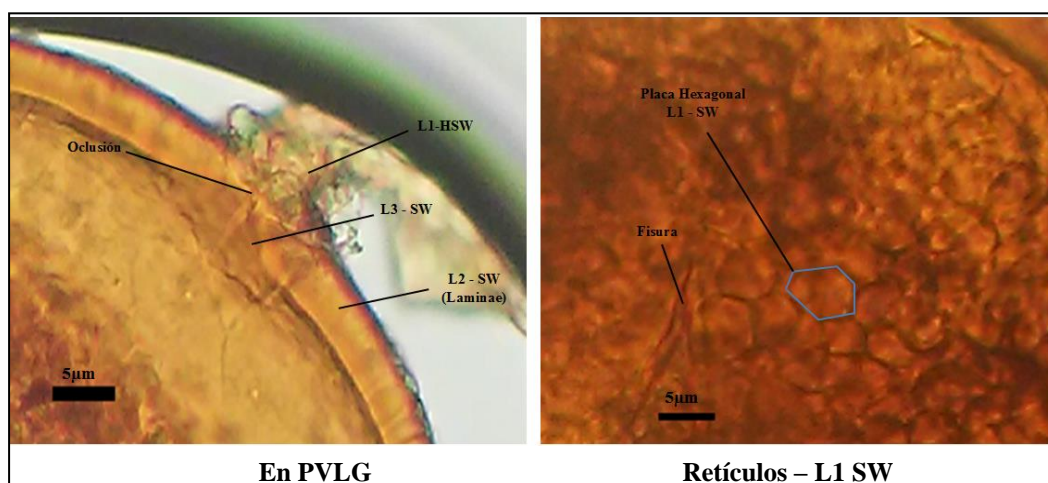


Figura 3.8. Características sub-celular de la espora *Glomus ambisporum*

Hifa de Sostén

Forma: la hifa de sostén es de forma cilíndrica-oblonga.

Ancho: 10-20 micras.

Estructura de la pared: se conforma de las capas L1 y L2 de la espora, concoloro en la hifa de sostén.

Oclusión: consiste en el engrosamiento de las capas L2 y L3, este último limita la hifa de sostén del interior de la espora.

Germinación

Un tubo germinativo se hace desde la hifa de sostén, originándose a partir del punto de oclusión.

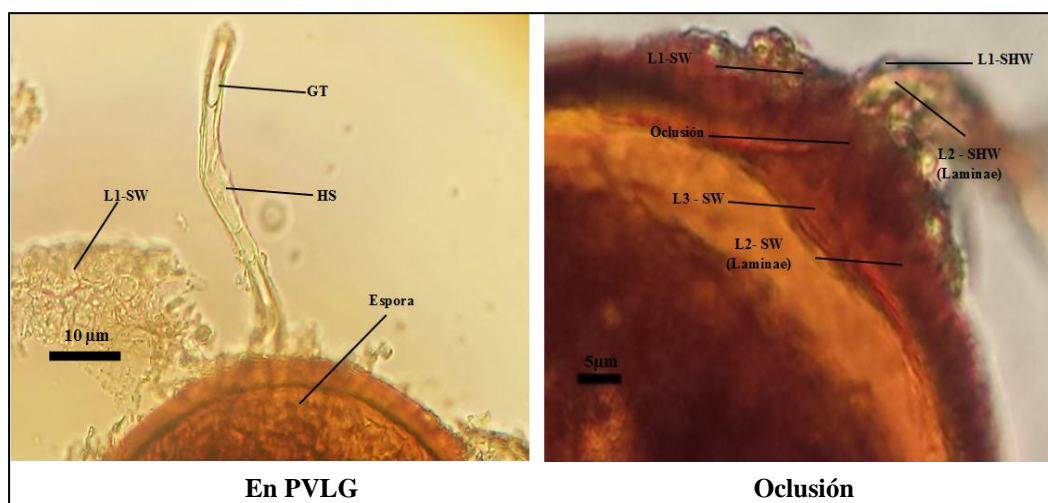


Figura 3.9. Características de la hifa de sostén, de la espora *Gl. ambisporum*

Micorrización

El desarrollo de los arbuscúlos en las raíces del cultivo trampa de maíz amiláceo (*Zea mays*), tiene una distribución homogénea, todas las estructuras se tiñen de un color magenta intenso (C:18 M:93 Y:46 K:5), con la Fucsina ácida, se aprecian vesículas de forma globosa y sub-globosa, las hifas intraradicales tienen un diámetro de 3 a 6 micras, se desarrollan en paralelo con uniones de forma “H” y patrones de ramificación “h”.

Colonización

Se observó en promedio 47% de colonización para una longitud de 40 cm de raíz micorrizadas y 40 puntos de intersección.

Micorrización a los 100 días en maíz

Glomus ambisporum, comparte características similares con las esporas simples de *Gl. Multiforum*, *Gl. macrocarpum*, *Gl. Geosporum* y *Gl. verruculosum*, son similares en tamaño y color. Sin embargo, las esporas de *Glomus ambisporum* se disponen en esporocarpos sin peridio, al igual que *Gl. macrocarpum*, la pared de la espora de este último, está formado por dos capas, ninguna de ellas reacciona frente al reactivo de Melzer, a diferencia de la pared de la espora de *Gl. ambisporum*, que está formada por 3 capas, y tienen una reacción conjunta al reactivo de Melzer (Blaszkowski et al. 2002).

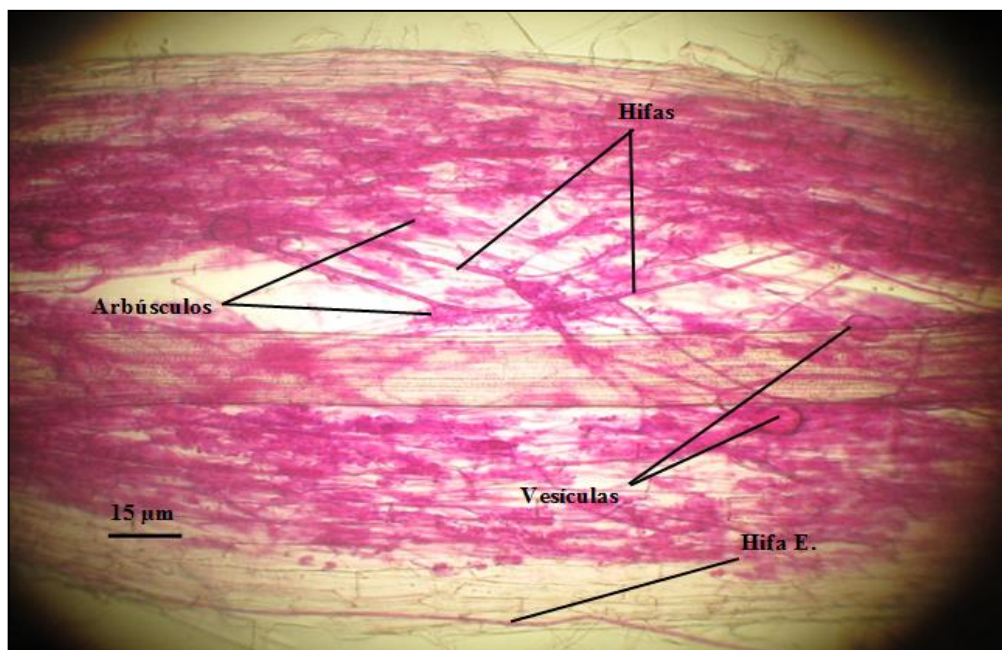


Figura 3.10. Estructuras micorrízicas, en la raíz-aislamiento *Gl. ambisporum*

Mientras que los de *Gl. Geosporum* y *Gl. verruculosum* producen esporas simples en el suelo sin esporocarpos. Las esporas *Gl. Multiforum*, tienen ornamentación consistente en fosas uniformemente distribuidas en la capa de la pared 3. Adicional a esto, *Glomus ambisporum*, es la única especie conocida cuya capa L1, forma una superficie reticulada uniforme de placas hexagonales.

Glomus

Glomus maculosum D.D. Mill. & C. Walker.

La caracterización de este espécimen, fue contrastada con las descripciones realizadas por Miller y Walker, (1986) y Morton, (2016).

Esporas

Las esporas se producen a partir de hifas esporógenas en el suelo.

Color: de color naranja-pajizo (C:13 M:40 Y:82 K:4) a ocre (C:14 M:57 Y:98 K:4).

Forma: las esporas son de forma globosa y sub-globosa.

Tamaño de la distribución: de 95 a 210 micras, media de 189 micras (n = 50).

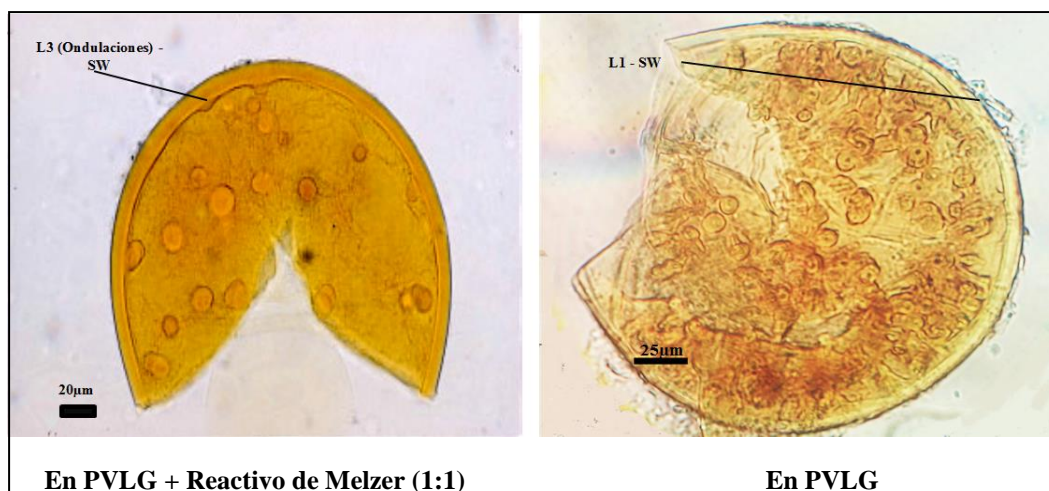


Figura 3.11. Características morfológicas de la espora *Glomus maculosum*

Estructura Sub-celular de la Espora

Pared de la espora

La pared de esporas consta de tres capas, ninguna de ellas tiene reacción frente al reactivo de Melzer.

Capa L1: esta capa es hialina (C:1 M:14 Y:56 K:0), con un espesor menor a 2 micras, fuertemente adherente a la capa L2, se pierde en esporas maduras.

Capa L2: capa media, se conforma de sub capas finas y adherentes (laminadas), de 4 a 13 micras de espesor, esta capa es de color naranja pajizo (C:13 M:40 Y:82 K:4) a ocre (C:14 M:57 Y:98 K:4).

Capa L3: es la capa más interna, esta capa es delgada (<1 micra de espesor) y concoloro a la capa L2, de la cual se desprende, forma ondulaciones de entre 5 y 10 micras de profundidad, que se desarrollan hacia el interior de la espora.

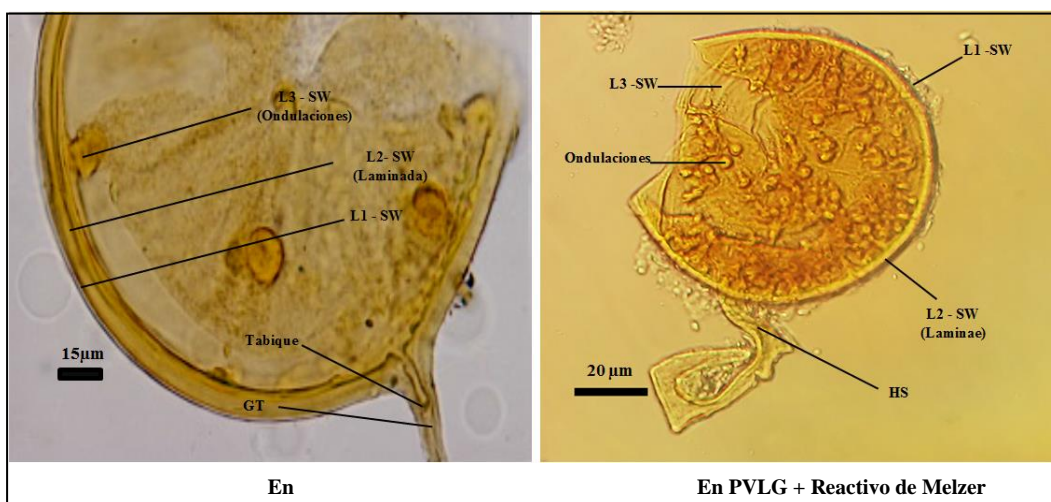


Figura 3.12. Características sub-celular de la espora *Glomus maculosum*

Hifa de Sostén

Forma: tiene forma de embudo o cilíndrico.

Ancho: 10 a 14 micras en la parte proximal y de 5 a 7 micras en el punto más alejado.

Estructura de la pared: conformada por la capa L2 de la espora y concoloro a esta misma.

Oclusión: se distingue la formación de un tabique, procedente de la capa más interna L3.

Germinación

Un tubo germinativo se origina desde la hifa de sostén, originado a partir del tabique.

Micorrización

Obtenido en las raíces del cultivo trampa de maíz amiláceo (*Zea mays*), las estructuras del hongo se tiñen de magenta oscuro (C:20 M:90 Y:45 K:15), en Fucsina ácida (0.05%), los arbuscúlos se distribuyen de manera aleatoria en las raíces, las hifas intraradicales son de 2 a 5 micras de diámetro, no se aprecian vesículas, las hifas crecen en ramificaciones con forma de “H”.

Colonización

Se observó en promedio 38% de colonización para una longitud de 40 cm de raíz micorrizadas y 40 puntos de intersección.

Micorrización a los 100 días en maíz

Glomus maculosum comparte características similares con las esporas de los géneros *Gl. claroideum*, *Gl. luteum*, *Gl. geosporum*, *Gl. clarum*, *Gl. caledonio* y *Gl. etunicatum*, todas estas especies forman esporas de color amarillo (jóvenes), a amarillo marrón cuando adultas, así como esporas en un rango de tamaños muy similar (en torno a 140µm). Las esporas de *Gl. luteum*, forman esporas con una capa mucilaginosa que reacciona frente al reactivo de Melzer (Kennedy et al., 1999).

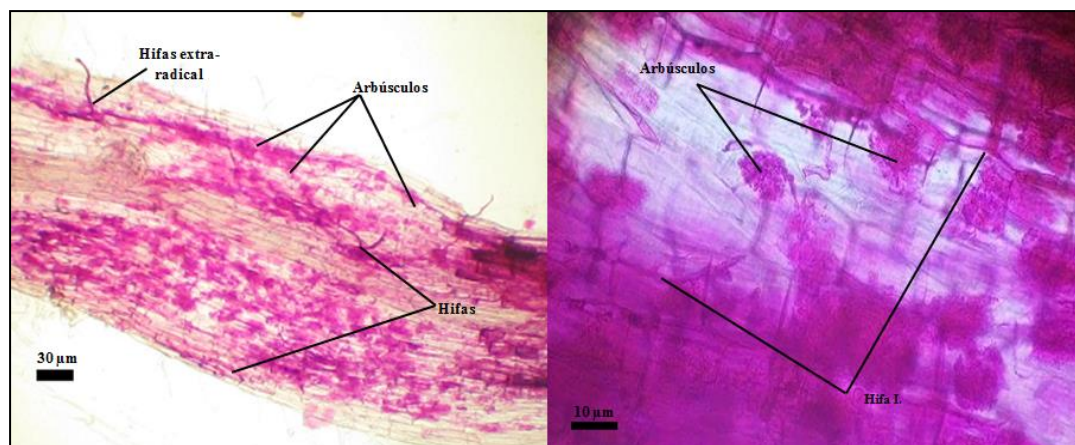


Figura 3.13. Estructuras micorrízicas, en la raíz-aislamiento *Gl. maculosum*

Gl. claroideum y *Gl. etunicatum* producen una capa mucilaginosa que si reacciona al reactivo de Melzer, sin embargo en el primero forma una capa L4, la cual se desprende bajo presión, el segundo solo forma dos capas; Para *Glomus maculosum* la característica diferencial es la formación de ondulaciones profundas en la capa más interna L3, no se han descrito esporas dentro de Glomeraceae que compartan una característica similar (Blaszkowski, 2003; Morton, 2016; Walker y Schüßler, 2004).

Rhizophagus

Sclerocystis sinuosum Gerd & B. K. Bakshi

La caracterización de este espécimen, fue contrastada con las descripciones realizadas por Almeida y Schenck, (1990); Gerdemann, y Bakshi, (1976); Blaszkowski, (2016) y Morton, (2016).

Esporocarpos

Forma una capa de esporas a partir de un plexo central, las esporas se mantienen unidas a esta estructura por un denso peridio que las recubre.

Color: de color naranja-marrón oscuro (C:0 M:65 Y:100 K:4).

Forma: la forma de los esporocarpos va de globoso, subgloboso a pulvinado, con una superficie irregular, debido a las esporas que sobresalen cubiertos por un denso peridio.

Tamaño de distribución: 210 a 340 micras, y una media de 271 micras (n=18), que contienen entre 11 y 17 esporas.

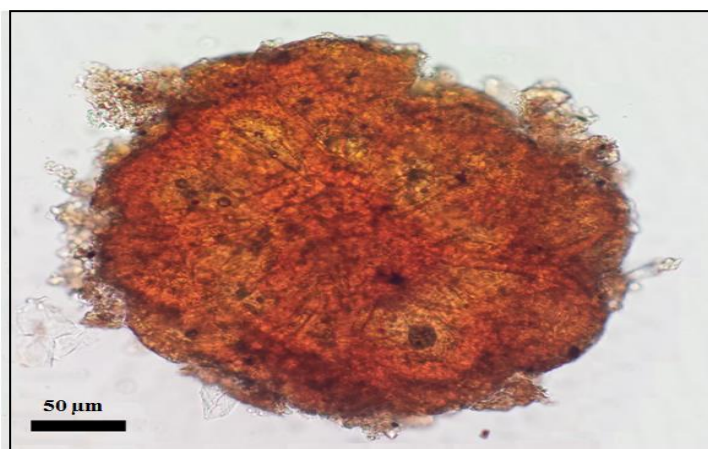


Figura 3.14. Esporocarpio de *Sclerocystis sinuosum*

Peridio

Se desarrolla una densa capa de hifas de manera aleatoria y entrelazada, con un espesor de 7 a 17 micras, este peridio mantiene el esporocarpio unido y a las esporas en él.

Esporas

Color: de color naranja-marrón pálido (C:0 M:8 Y:48 K:0).

Forma: las esporas son de forma ovada, elíptica o irregular, organizados en una capa simple de un plexo central de hifas (Gerdemann, 1976).

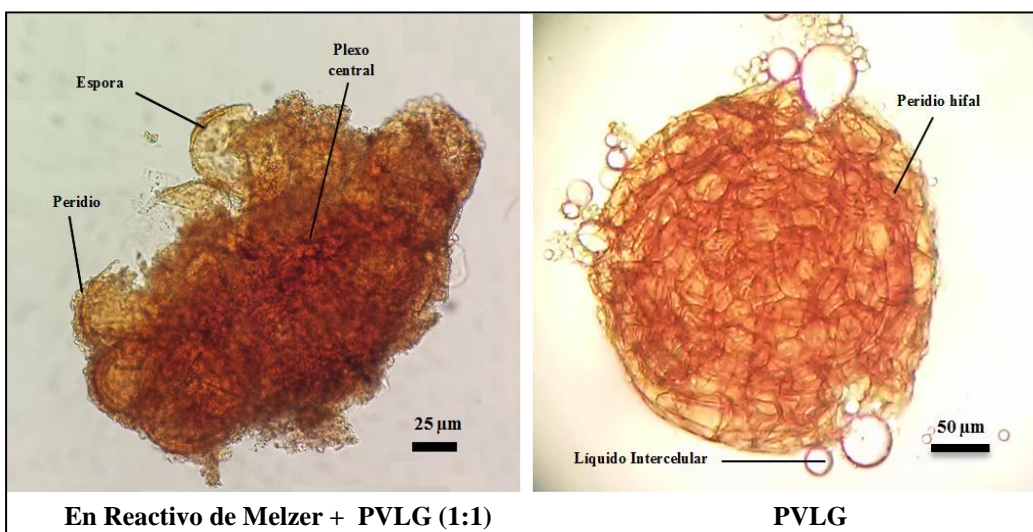


Figura 3.15. Características del esporocarpio de *Sclerocystis sinuosum*

Tamaño: 50 a 80 micras (ancho x largo).

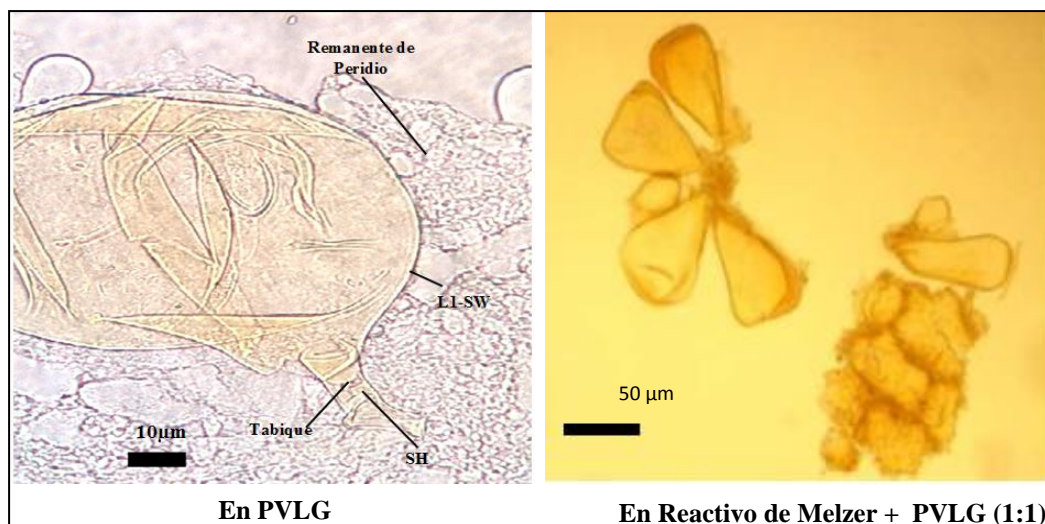


Figura 3.16. Características morfológicas de la espora *Sclerocystis sinuosum*

Estructura Sub-celular de la Espora

Pared de la espora, Una capa 'L1', rodeada por un denso peridio.

Capa L1: formado por láminas, siempre adherente de color naranja-pálido (C:0 M:8 Y:48 K:0). Espesor varía considerablemente en una sola espora, 1 - 4 micras, siendo más gruesa en la base cerca de la hifa de sostén.

Hifa de Sostén

Forma, cilíndrica a ligeramente acampanados, su identificación se hace dificultosa debido al plexo hifal central del esporocarpo.

Ancho, 5-8 micras, siendo más ancho en la proximidad con la espora.

Estructura de la pared

una capa continua a la pared de la espora concoloro, 1.5 a 4 micras de espesor.

Oclusión: se observa un tabique delgado.

Germinación

No observada, según Almeida y Schenck, (1990), la germinación se da en el plexo central de hifas del esporocarpo.

Micorrización

El desarrollo de micorrizas en las raíces del cultivo trampa de maíz amiláceo (*Zea mays*), tiene una distribución aleatoria, no se observan esporocarpos mientras se forman los arbusculos y vesículas.

Colonización

Se observó en promedio 13% de colonización para una longitud de 40 cm de raíz micorrizadas y 40 puntos de intersección.

Micorrización a los 100 días en maíz

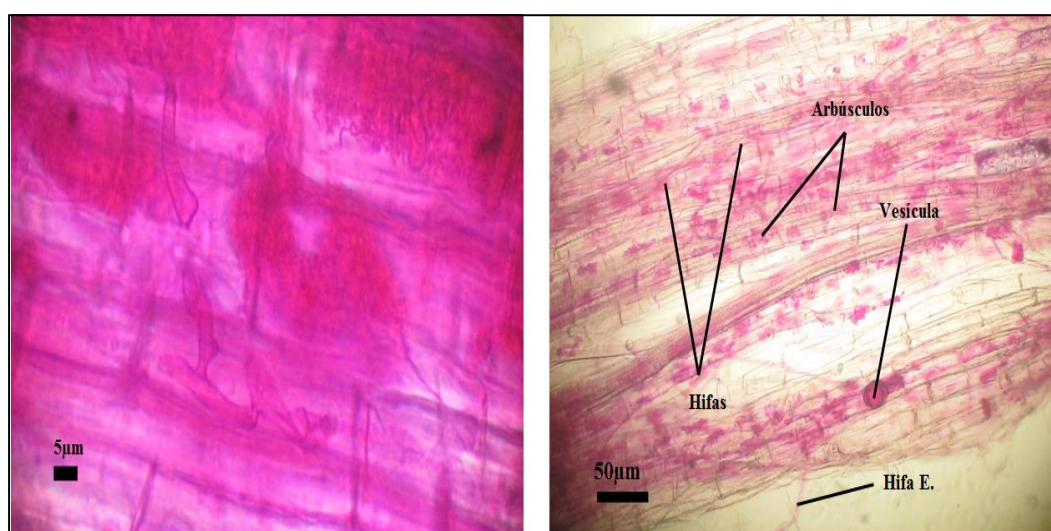


Figura 3.17. Estructuras micorrízicas, raíz-aislamiento *Scl. sinuosum*

El principal carácter a comparar entre *Sclerocystis sinuosum* y otros géneros, fue el del esporocarpo, otros *Glomus* como *Gl. ambisporum*, *Gl. pansihalos* forman esporocarpos sueltos sin peridio, los esporocarpos que forma *D. epigea* se son supermasivos de más de 2cm de diámetro e irregular, *D. globífera* forma esporocarpos en racimos sueltos, *D. tortuosa* forma esporocarpos compactos y cubierto con peridio, con no más de 6 esporas y de una coloración pajiza, el género *Redeckera*, forma esporocarpos con más de 500µm de diámetro en estructuras irregulares y de color hialino (Redecker et al., 2007), *Sclerocystis sinuosum*, es la única espóra en comparación a otras que forman esporocarpos, cuya pared de la espóra está formada por una única capa (L1 laminada), los miembros del género *Sclerocystis*, como *Scl. clavisorum* o *Scl. rubiformis*, forman esporocarpos similares a *Sclerocystis sinuosum*, pero estas estructuras contienen no menos de 23 esporas en torno a un

plexo central, no forma tabique en la oclusión, solo se compone del engrosamiento de la capa L2 (INVAM, 2016).

Septoglo mus

Septoglo mus constrictum (Trappe). C. Walker & Schüßler

La caracterización de este espécimen, fue contrastada con las descripciones realizadas por Trappe, (1977); Blaszkowski, (2016) y Morton, (2016).

Esporas

Las esporas se producen tanto en la zona de la rizosfera como en las raíces de la planta hospedante (*Zea mays* L. amiláceo).

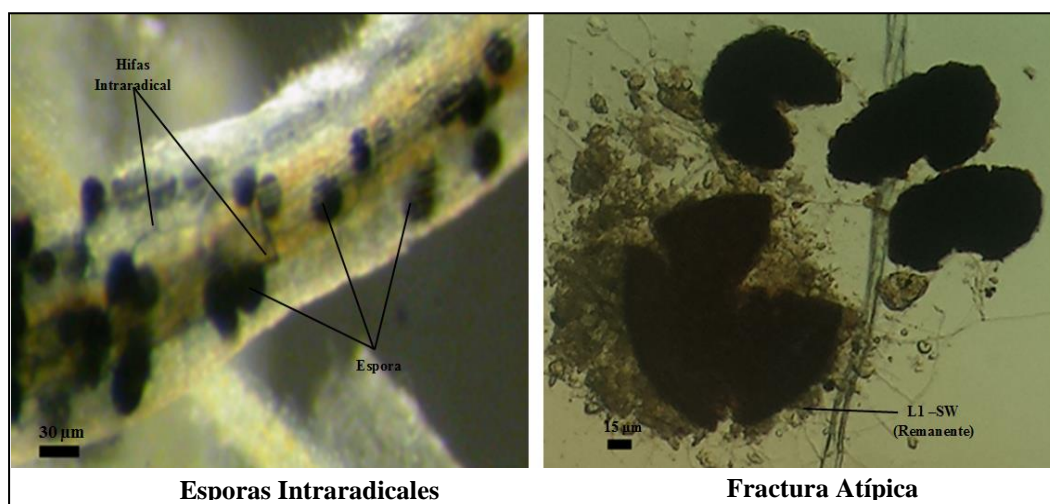


Figura 3.18. Características típicas de *Septoglo mus constrictum*

Estructura Sub-celular de la Espora

Pared de la espora

La pared de esporas consta de dos capas, “L1 y L2”, con la capa externa adherente, se degrada y desprende en esporas maduras.

Capa L1: esta capa es hialina (C:22 M:25 Y:56 K:6), de 2 a 5 micras de espesor, no se aprecia reacción con el reactivo de Melzer, esta capa se desprende en esporas maduras, pero persiste en la base de la hifa de sostén.

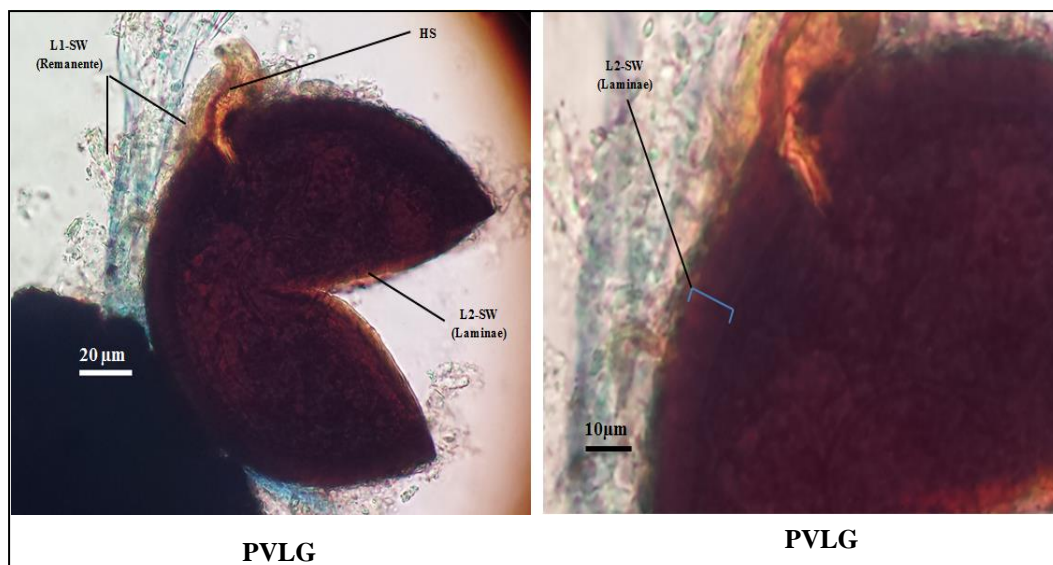


Figura 3.19. Características morfológicas de la espora *Septogloamus constrictum*

Capa L2: es una capa laminada de color marrón-anaranjado (C:25 M:88 Y:100 K:22) a rojo-marrón oscuro (C:15 M:90 Y:40 K:70), esta capa laminada adicionalmente es rígida, se aprecia al aplicarse presión, provoca que la espora se fracture de forma atípica, perdiendo su forma y fracturándose en múltiples puntos, esta capa es de 6 a 10 micras de espesor, constituye la hifa de sujeción, no se aprecia reacción frente al reactivo de Melzer.

Hifa de Sostén

Forma: esta es de forma cilíndrica a constreñida.

Ancho: de 15 a 22 micras, siendo constreñida en la zona proximal a la espora.

Estructura de la pared: se conforma de las capas L1 y L2 de la espora, concoloro en la hifa de sostén.

Oclusión: se aprecia un tabique recurvado, formado por la capa L2.

Germinación

Un tubo germinal emerge desde el lumen de la hifa de sostén.

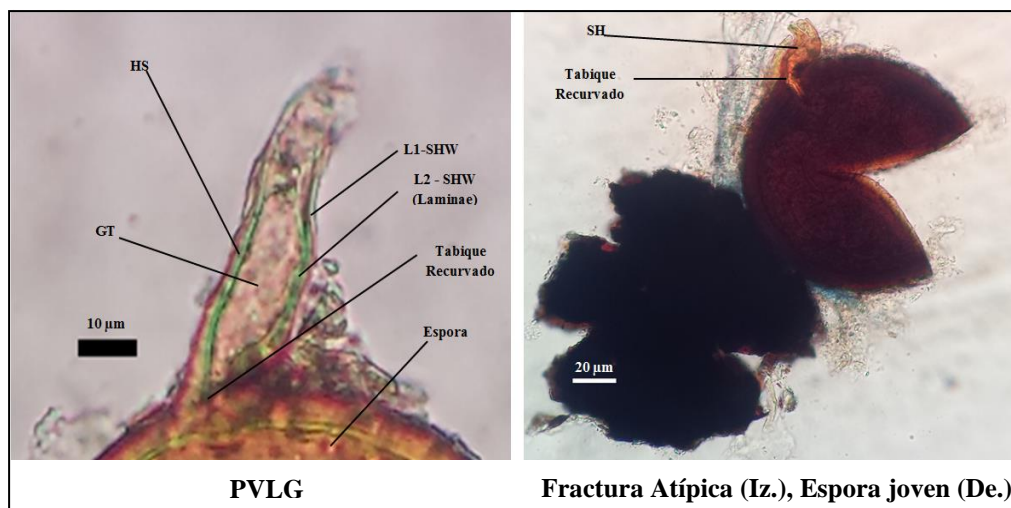


Figura 3.20. Características sub-celular de la espora *Septoglomerum constrictum*

Micorrización

Se aprecian estructuras tales como arbuscúlos, vesículas e hifas intraradicales como extra-radicales, la tinción es de un magenta oscuro, en Fucsina ácida 0.05%.

Colonización

Se observó en promedio 80.5% de colonización para una longitud de 40 cm de raíz micorrizadas y 40 puntos de intersección.

Micorrización a los 100 días en maíz

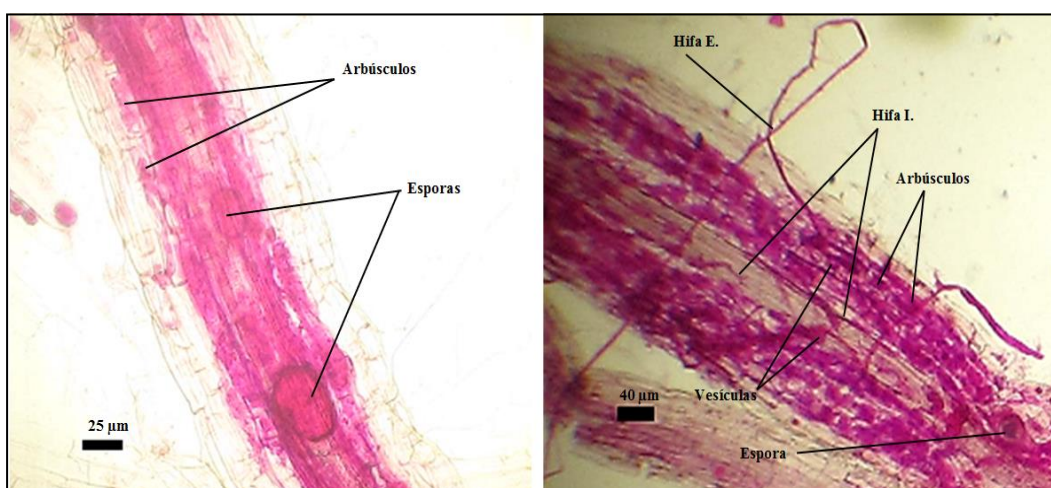


Figura 3.21. Estructuras micorrízicas, raíz-aislamiento *Sp. constrictum*

La identificación de *Septoglomerum constrictum*, resulta relativamente sencilla, debido a que no existen muchas esporas con este color en específico, y ninguna en la familia Glomeraceae, siendo las especies más semejantes por su color *Dentiscutata nigra*,

Dentiscutata reticulata y *Racocetra gregaria*, todas ellas pertenecientes a la familia Gigasporaceae, en el aislamiento no se apreciaron estructuras tales como escudos germinativos o la distintiva Célula esporógena.

CLAROIDEOGLOMERACEAE

Claroideogloimus

Claroideogloimus etunicatum (W. N. Becker & Gerd.) C. Walker & Schüßler

La caracterización de este espécimen, fue contrastada con las descripciones realizadas por Becker, y Gerdemann, (1977), Blaszkowski, (2016) y Morton, (2016).

Esporas

Las esporas se producen solo en el suelo.

Color: el color de las esporas va desde anaranjado (C:8 M:46 Y:94 K:1) a amarillo pálido (C:0 M:16 Y:94 K:0).

Forma: de forma globosa a sub-globosa.

Tamaño de la distribución: de 70 a 180 micras, media de 157 micras (n= 50).

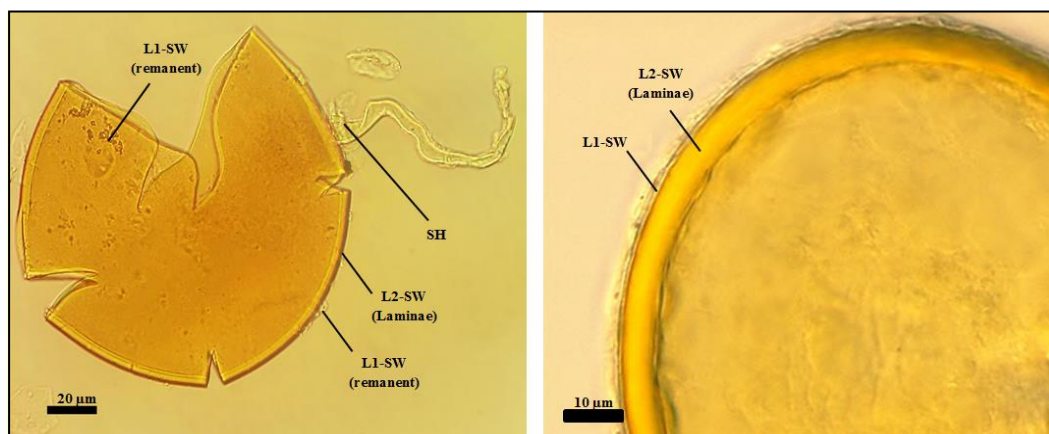


Figura 3.22. Características morfológicas de *Claroideogloimus etunicatum*

Estructura Sub-celular de la Espora

Pared de la spora

La pared de esporas consta de dos capas, “L1 y L2”, con la capa externa adherente, se degrada y desprende en esporas maduras.

Capa L1: capa mucilaginosa, presenta rugosidades en la superficie exterior, de 1 a 3 micras de espesor, tinción rojo purpura tenue (C:15 M:85 Y:66 K:7), en el reactivo de Melzer, esta capa se degrada y desprende en esporas adultas, quedando remanentes de esta capa o ausente en su totalidad.

Capa L2: es una capa laminada de color anaranjado (C:8 M:46 Y:94 K:1) a amarillo pálido (C:0 M:16 Y:94 K:0), lisa por ambas superficies de 4.5 a 6.5 micras de espesor.

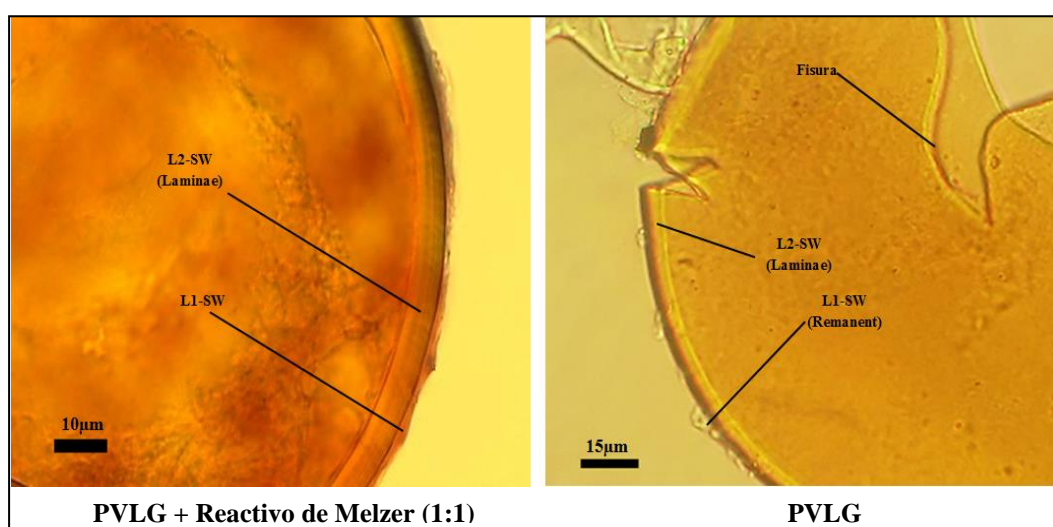


Figura 3.23. Características sub-celular de la espora *Cl. etunicatum*

Hifa de Sostén

Forma: esta es de forma cilíndrica a ligeramente acampanada.

Ancho: de 5 a 10 micras, siendo más ancho en la base de la espora.

Estructura de la pared: compuesto por dos capas SHL-1 y SHL-2, continuas con las capas L1 y L2 de la pared de la espora, la SHL2 es de color amarillo pálido (C:0 M:0 Y:20 K:5).

Oclusión: se aprecia un tabique curvado, continuo con la lámina más interna de la capa L2.

Germinación

Un tubo germinal emerge desde el lumen de la hifa de sostén.

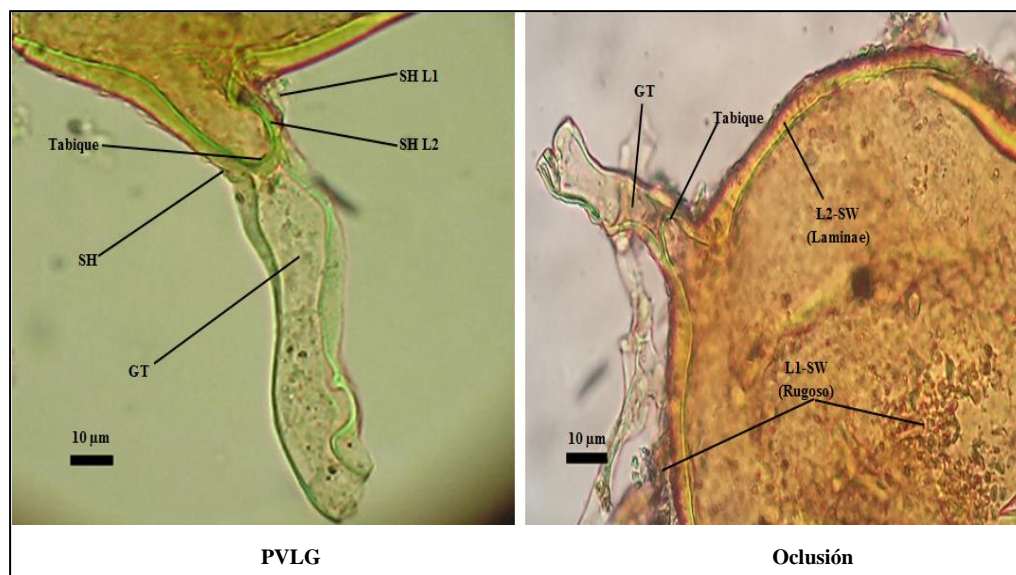


Figura 3.24. Características de la hifa de sostén de la espora *Cl. etunicatum*

Micorrización

Se aprecia el desarrollo de estructuras tales como arbuscúlos, vesículas e hifas intraradicales, la tinción es de un magenta intenso (C:18 M:93 Y:46 K:5), en Fucsina ácida (0.05), las hifas intraradicales están interconectadas por ramas perpendiculares (H).

Colonización

Se observó en promedio 77.5% de colonización para una longitud de 40 cm de raíz micorrizadas y 40 puntos de intersección.

Micorrización a los 100 días en maíz

Claroideoglobus etunicatum, comparte características similares con las especies *Gl. arenarium*, *Gl. claroideum*, *Gl. clarum*, *Gl. geosporum*, *Gl. Versiforme*, *Gl. lamellosum*, y *Gl. Luteum*, todas estas especies producen esporas de color amarillo de una gama similar, así como tamaños similares. Sin embargo de todos ellos sólo *Gl. claroideum*, *Gl. clarum*, *Gl. geosporum* y *Gl. luteum* tienen una pared de esporas con una capa externa mucilaginosa de propiedades bioquímicas similares a las de la

capa de pared L1 de esporas de *Claroideoglopus etunicatum* (Blaszkowski 2003, Stürmer y Morton 1997, Kennedy et al., 1999).

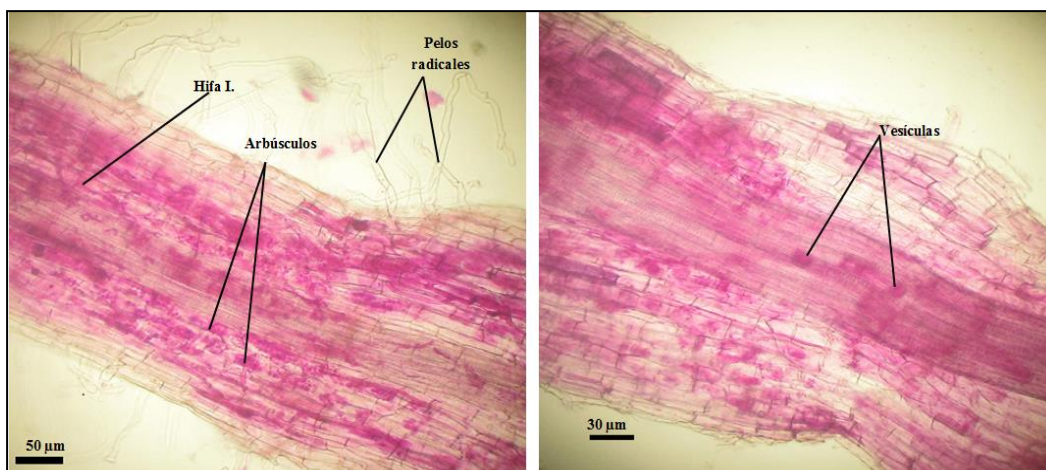


Figura 3.25. Estructuras micorrízicas, raíz-aislamiento *Cl. etunicatum*

Considerando el número de capas que la pared de espora tiene, *Claroideoglopus etunicatum* comprende de dos capas, la de *Gl. clarum* y *Gl. geosporum* comprende tres capas, y la pared de esporas de *Gl. claroideum* y *Gl. luteum* consiste en cuatro capas. La espora de *Claroideoglopus etunicatum* carecen de la tercera capa de esporas laminadas de *Gl. clarum* y la tercera capa semirrígida de pared de esporas de *Gl. geosporum*, así como la segunda capa flexibles y semi-flexibles de *Gl. claroideum* y *Gl. luteum*.

Glomus versiforme forma esporas con una pared de 2 capas (Blaszkowski, 2003; Blaszkowski et al., 2003). Sin embargo, la capa L1 de *Gl. versiforme* es semiflexible y no tiene reacción con el reactivo de Melzer a comparación de la capa L1 de *Claroideoglopus etunicatum*.

3.2.2. DIVERSIPORALES

DIVERSISPORACEAE

Diversispora

Diversispora spurca (C. M. Pfeiff, C. Walker & Bloss) C. Walker & Schüßler.

La caracterización de este espécimen, fue contrastada con las descripciones realizadas por Pfeiffer, Walker y Bloss, (1996), Walker y Schüßler, (2004), Blaszkowski, (2016) y Morton, (2016).

Esporas

Las esporas se producen solas en el suelo.

Color: el color de las esporas va de hialino (C:0 M:0 Y:5 K:0) a amarillo pálido (C:0 M:5 Y:15 K:0), con una superficie opaca debido a la adhesión de detritos.

Forma: de forma globoso a sub-globosa.

Tamaño de la distribución: de 45 a 100 micras, media de 76 micras (n = 20) .

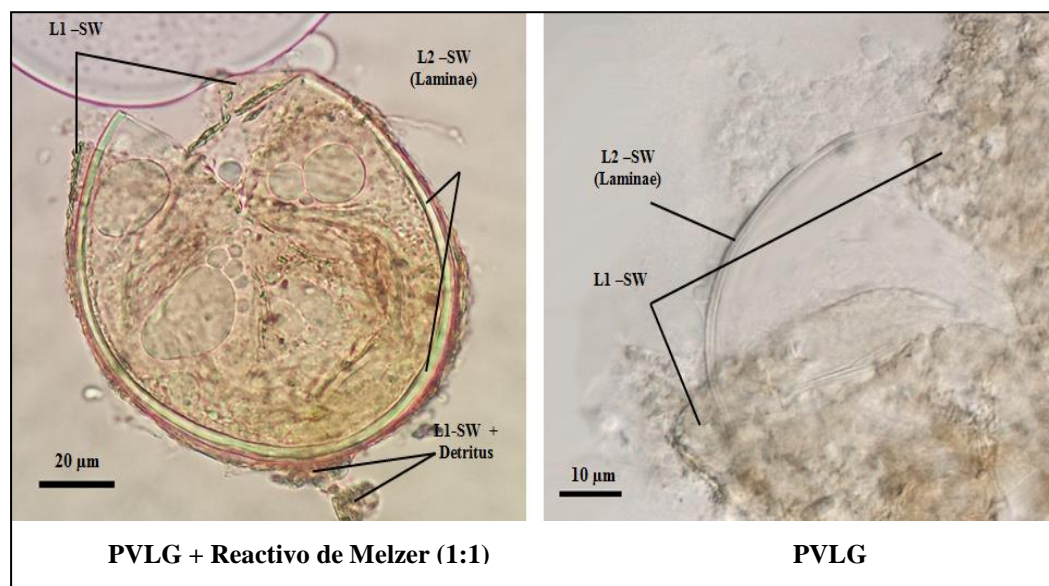


Figura 3.26. Características morfológicas de la spora *Diversispora spurca*

Estructura Sub-celular de la Espora

Pared de la spora

La pared de esporas consta de dos capas, “L1 y L2”, la capa L1 se desprende con suma facilidad bajo presión.

Capa L1: esta capa es flexible y hialina (C:0 M:25 Y:20 K:0), de 1 a 3 micras de espesor, no se aprecia reacción con el reactivo de Melzer, esta capa se desprende con la aplicación de presión, se aprecia además detritus adheridos en su superficie.

Capa L2: capa permanente, flexible y hialina, de color amarillo pálido (C:0 M:5 Y:15 K:0), formada por laminae adherentes entre sí, esta capa tiene un espesor de 2 a 4 micras, se aprecia la formación de arrugas en la sub-capas más interna a manera de crestas, no hay reacción frente al reactivo de Melzer.

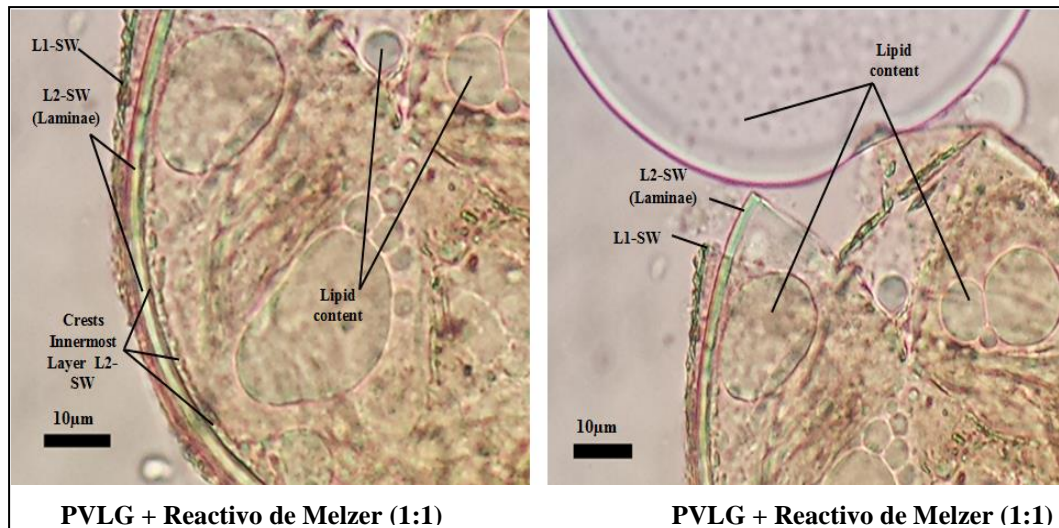


Figura 3.27. Características Sub-celular de la espora *D. spurca*

Hifa de Sostén

Forma: esta es de forma cilíndrica a ligeramente acampanada.

Ancho: de 5 a 8 micras.

Estructura de la pared: formada únicamente por la capa L1 de la espora, concoloro a la misma; la capa L2 se detiene abruptamente en la zona de unión. La pared de la hifa de sostén tiene un espesor menor a 1 micra; debido a que la capa L1 de la espora es una capa no permanente, la permanencia y apreciación de la hifa de sostén se dificulta.

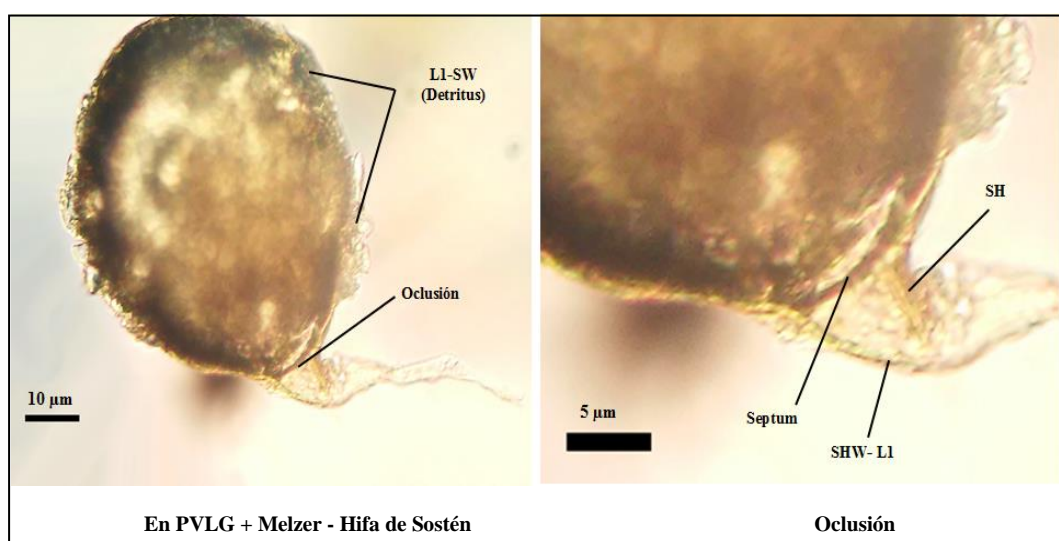


Figura 3.28. Características de la hifa de sostén de la espora *D. spurca*

Oclusión: se aprecia un septum, formado por la capa L2.

Germinación

No observada, Blaszkowski, (2016), indica la formación de un tubo germinal, que se origina desde el lumen de la hifa de sostén, apreciable en una de cada 200 esporas.

Micorrización

Las estructuras de la micorriza en las raíces del hospedero (*Zea mays* L. amiláceo), se hallan dispersos, la tinción es débil en fucsina acida (0.05%), se aprecian arbuscúlos e hifas.

Colonización

Se observó en promedio 60.5% de colonización para una longitud de 40 cm de raíz micorrizadas y 40 puntos de intersección.

Micorrización a los 100 días en maíz

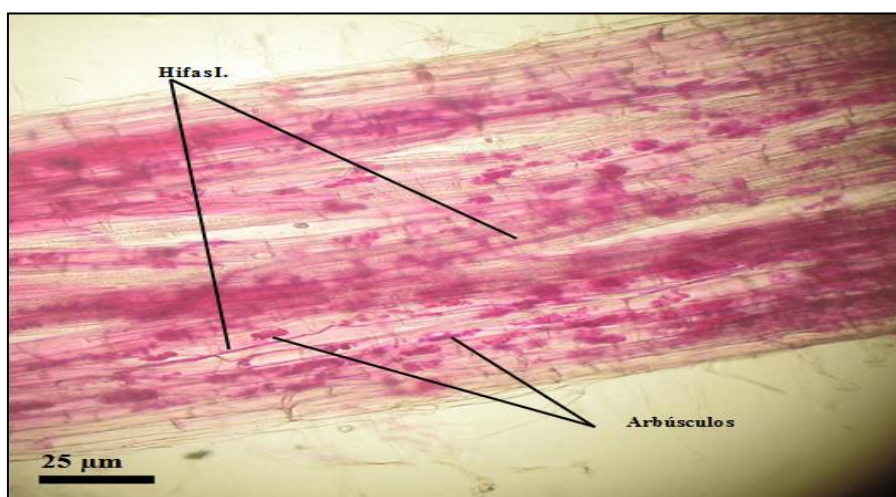


Figura 3.29. Estructuras micorrízicas, raíz-aislamiento *D. spurca*

Diversispora spurca, es una especie singularmente difícil de aislar e identificar, debido a su tamaño y color relativamente invisible en luz blanca, *Diversispora spurca*, comparte características similares con otras esporas como *Diversispora ebúrnea*, ambas esporas están formadas por dos capas L1 y L2, sin embargo, en *Diversispora ebúrnea*, la capa L1 es adherente a la L2, la capa L2 es rígida y completamente lisa en ambas superficies, en la oclusión *Diversispora ebúrnea* forma un tabique recurvado que se extiende ligeramente de la base de la espora por la hifa

de sostén; mientras *Diversispora spurca*, termina la oclusión de manera abrupta con un septo.

Diversispora spurca, comparte características similares de tamaño y color con especies como *Gl. gibbosum*, *Gl. aurantium* y *Gl. versiforme*; *Gl. gibbosum*, es hialino pero está formado por cuatro capas, la capa L1 no presenta adhesión con detritus del suelo, además estas esporas se forman en agregados o esporocarpos compactos (Blaszkowski 1997, 2003). *Gl. versiforme*, es una espora formada por dos capas hialinas (en su estadio juvenil), la capa L1 es semipermanente, su hifa de sostén es continua con la capa L1 y L2, de la pared de la espora, esta espora una vez madura, adopta una coloración amarilla a marrón claro; *Gl. aurantium*, es una espora formada por 3 capas, la capa L1 es hialina, pero no presenta adhesión con detritus del suelo, la capa L2 y L3 son adherentes, la hifa de sostén está formada por las capas L1, L2 y L3 de la pared de la espora, ninguna de ellas presenta reacción frente al reactivo de Melzer (Morton, 2016).

ACAULOSPORACEAE

Acaulospora

Acaulospora sp.1

La caracterización de este espécimen, fue contrastada con las descripciones realizadas por Gerdemann y Trappe, (1974), Blaszkowski, (2016) y Morton, (2016).

Esporas

Color: el color de las esporas va desde marrón-anaranjado (C:20 M:90 Y:50 K:20) a anaranjado pálido (C:0 M:30 Y:65 K:10).

Forma: de forma globosa a sub-globosa.

Tamaño de la distribución: de 120 a 240 micras, media de 197 micras (n = 50).

Estructura Sub-celular de la Espora

La pared de esporas consta de tres capas, “L1, L2 y L3”, y dos paredes germinales GW1 y GW2.

Pared de la espora

Formada por tres capas “L1, L2 y L3”, la capa L1, es continua con la pared del cuello del sáculo esporífero, las capas L2 y L3 son propias de la espora.

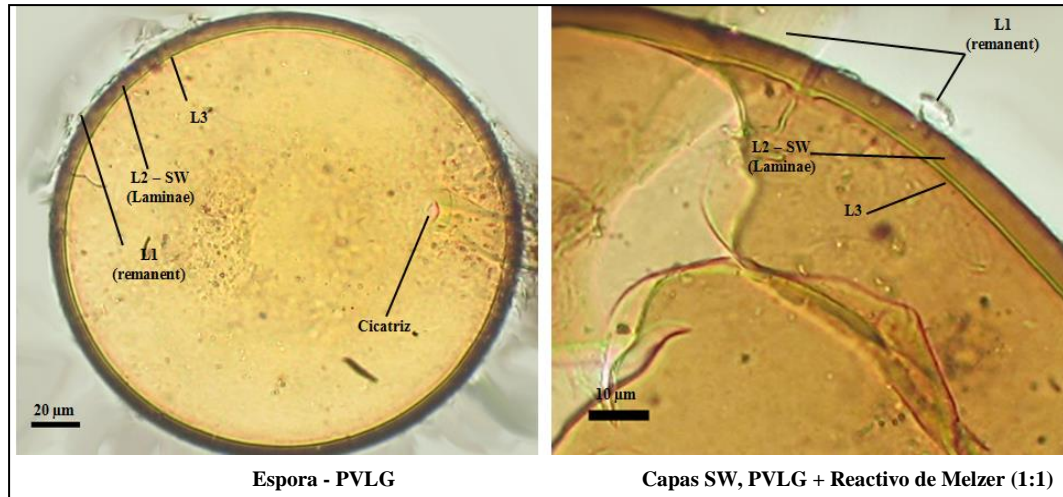


Figura 3.30. Características morfológicas de la espora *Acaulospora* sp. 1

Capa L1: hialina lisa, de 2 a 3 µm de espesor, es continua con la pared del cuello del sáculo esporífero.

Capa L2: capa laminada, de color marrón-anaranjado (C:20 M:90 Y:50 K:20) a marrón-anaranjado pálido (C:0 M:30 Y:100 K:10), lisa por ambas superficies de 5 a 8 micras de espesor, no se aprecia tinción, frente al reactivo de Melzer.

Capa L3: capa de color amarillo-marrón claro (C:5 M:10 Y:40 K:10), laminado de 1 a 3 micras de espesor, no se aprecia reacción frente al reactivo de Melzer.

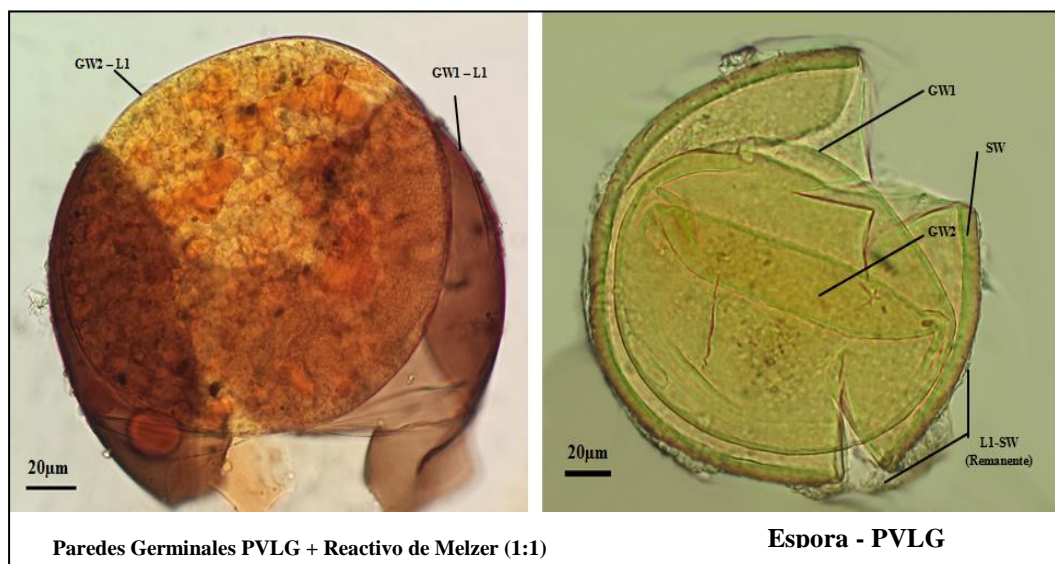


Figura 3.31. Características sub-celular de la espora *Acaulospora* sp. 1

Paredes Germinales

Dos paredes interiores hialinos y flexibles, “GW 1 y GW2”.

GW1: se aprecia una pared germinal aparentemente formada por una sola capa L1, hialina de menos de 2 micras de espesor, se tiñe de color marrón rojizo (C:25 M:70 Y:75 K:35) frente al reactivo de Melzer.

GW2: se aprecia una pared germinal aparentemente formada por una sola capa L1, hialina de menos de 2 micras de espesor, se aprecia reacción dextrinoide frente al reactivo de Melzer (C:5 M:45 Y:80 K:0).

Cicatriz: de forma circular, de 10 a 20 micras de diámetro.

Sáculo esporífero

Color: hialino.

Forma: de forma globosa.

Tamaño: de 150 a 250 micras.

Pared: Una capa, de superficie lisa, 3 a 5 micras de espesor

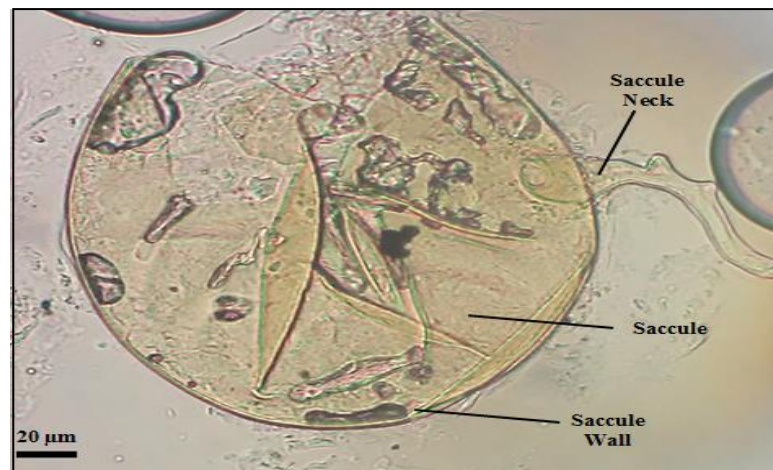


Figura 3.32. Características del sáculo esporífero de *Acaulospora* sp. 1

Germinación

No observada.

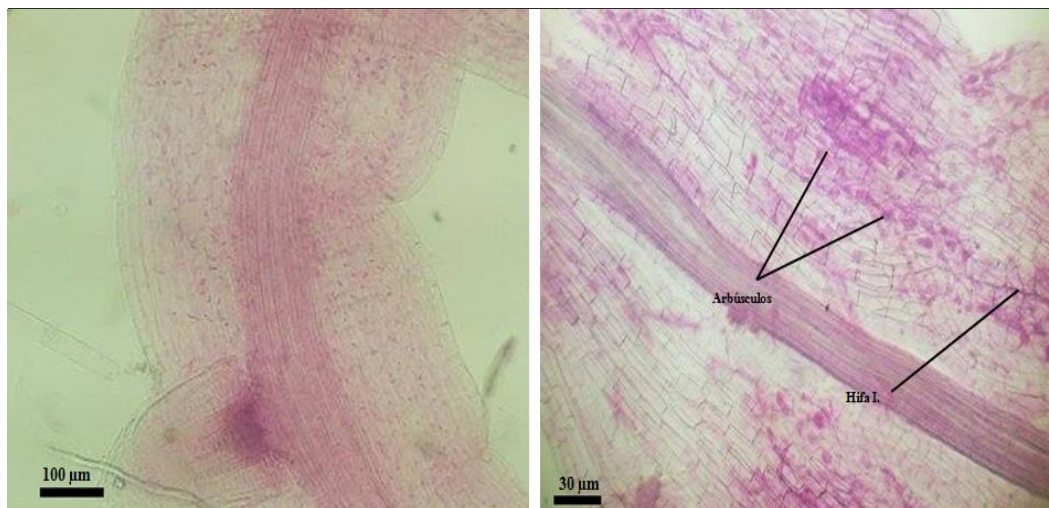
Micorrización

Se aprecian arbuscúlos e hifas intraradicales, que se tiñen débilmente en Fucsina ácida 0.05%.

Colonización

Se observó en promedio 17% de colonización para una longitud de 40 cm de raíz micorrizadas y 40 puntos de intersección.

Micorrización a los 100 días en maíz



Acaulospora sp. 1 comparte características similares con *Acaulospora Laevis* y *Acaulospora koskei*, ambas esporas tienen un tamaño forma y color similar y se diferencian en la capa L2 de la GW2, que produce una reacción dextrinoide en el reactivo de Melzer, capa que no fue identificada debido a la dificultad de su apreciación; Morton, (2016), menciona que la capa L2 de estas dos esporas tiene un espesor menor a 0.5 micras. La segunda diferencia es *Ac. koskei*, en su pared germinal GW1 está formada por una única capa L1, que reacciona frente al reactivo de Melzer, mientras *Ac. laevis*, está formada por dos capas en L1 y L2, L2 reacciona frente al reactivo de Melzer.

Figura 3.33. Estructuras micorrízicas, raíz- aislamiento *Acaulospora sp. 1*

Acaulospora

Acaulospora sp. 2

La caracterización de este espécimen, fue contrastada con las descripciones realizadas por Blaszkowski, (2016) y Morton, (2016).

Esporas

Color: el color de las esporas va desde naranja-marrón (C:5 M:37 Y:80 K:0) a naranja-marrón oscuro (C:10 M:60 Y:85 K:0).

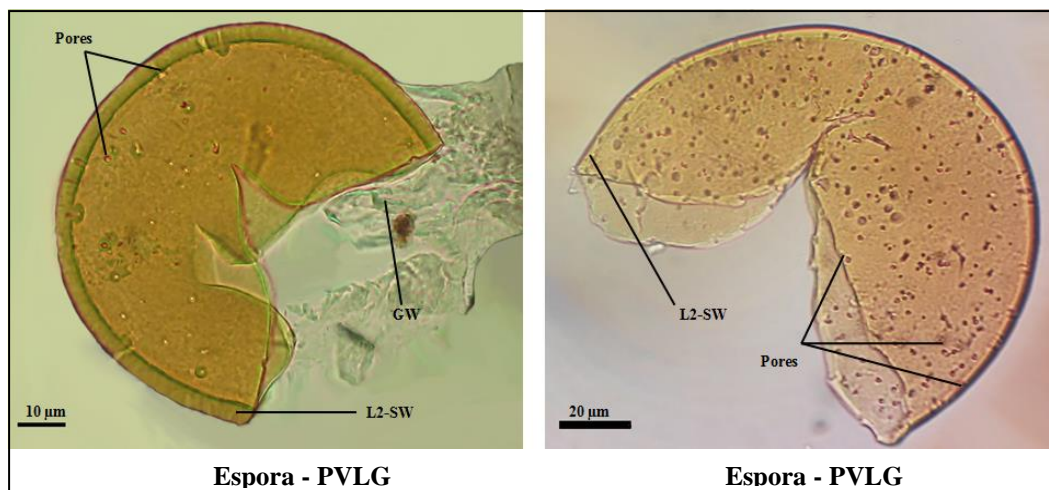


Figura 3.34. Características Morfológicas de la espora de *Acaulospora sp. 2*

Forma: de forma globosa a sub-globosa.

Tamaño de la distribución: de 80 a 150 micras, media de 139 micras (n = 50).

Estructura Sub-celular de la Espora

La pared de esporas consta de dos capas, “L1y L2”, y dos paredes germinales, la GW1 y GW2.

Pared de la espora

Formada por dos capas “L1y L2”, la capa L1, es continua con la pared del cuello del sáculo esporífero, la capa L2 es propia de la espora.

Capa L1: hialina, con un grosor menor a 2 µm, es continua con la pared del cuello del sáculo esporífero, no reacciona frente al reactivo de Melzer, solo se aprecia en esporas inmaduras.

Capa L2: capa laminada, de color naranja-amarillo (C:5 M:40 Y:80 K:8), de 3 a 7 micras de espesor, la ornamentación de esta capa consisten en poros, con un diámetro de 2 a 4 µm, y distribuidos de manera aleatoria sobre la superficie, no se aprecia tinción, frente al reactivo de Melzer.

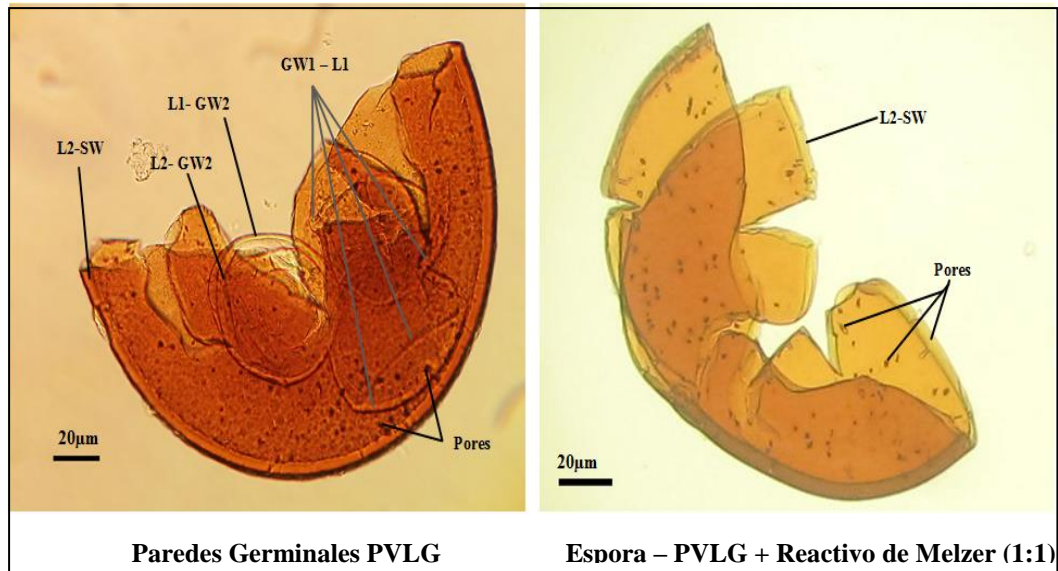


Figura 3.35. Características sub-celular de la espora de *Acaulospora sp. 2*

Paredes Germinales

Dos paredes interiores hialinas y flexibles, “GW1 y GW2”, no adherentes entre sí.

GW1: se aprecia una pared germinal, hialina y flexible, de menos de 2 µm de espesor, se separa fácilmente de la pared de la espora, no se aprecia reacción frente al reactivo de Melzer, aparentemente la pared germinal (GW1), está formada por una sola capa L1.

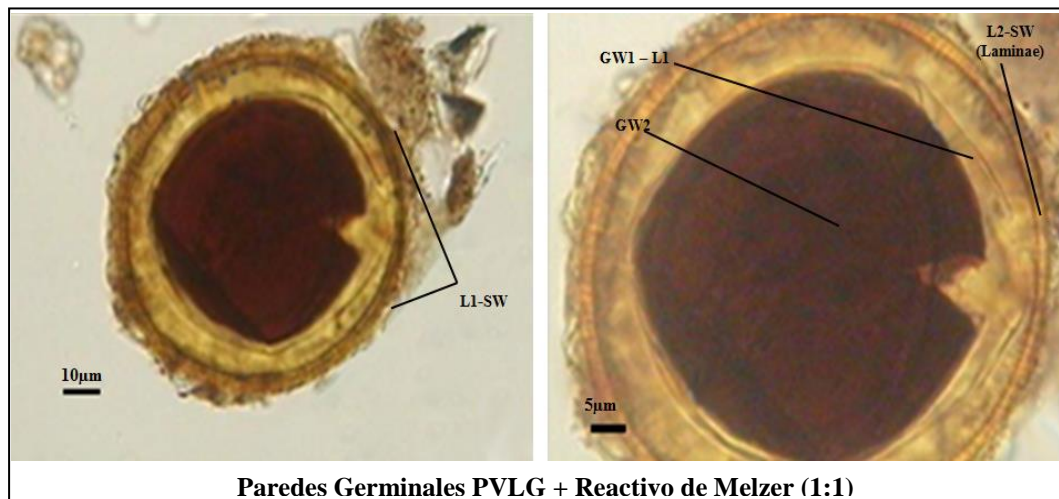


Figura 3.36. Reacción bioquímica de la GW2 de *Acaulospora sp. 2*

GW2: formada por dos capas “L1 y L2” hialinas flexibles y adherentes, miden en conjunto 2 a 3 µm de espesor, adquiere una coloración carmesí-oscuro (C:5 M:45

Y:80 K:0), frente al reactivo de Melzer.

Cicatriz: de forma circular, de 5 a 10 micras de diámetro.

Sáculo esporífero

No encontrado.

Germinación

No observada.

Micorrización

Se aprecian arbuscúlos, vesículas e hifas intraradicales, que se tiñen de magenta oscuro en Fucsina ácida 0.05%, sin embargo la distribución de la micorrización es aleatoria, con zonas densamente micorrizadas y zonas sin estructuras de la simbiosis.

Colonización

Se observó en promedio 26.5% de colonización para una longitud de 40 cm de raíz micorrizadas y 40 puntos de intersección.

Micorrización a los 100 días en maíz

La singularidad de *Acaulospora sp. 2*. resulta de la ornamentación distintiva de sus esporas, que se asemejan a *Acaulospora lacunosa*, una ornamentación similar es propia de esporas como *Ac. Cavernata*, *Ac. Foveata*, *Ac. Paulinae*, *Ac. Scrobiculata*, y *Ac. Undulata*. (Blaszkowski, 1988, 1989; Janos y Trappe 1982; Sieverding, 1988 y Trappe, 1977).

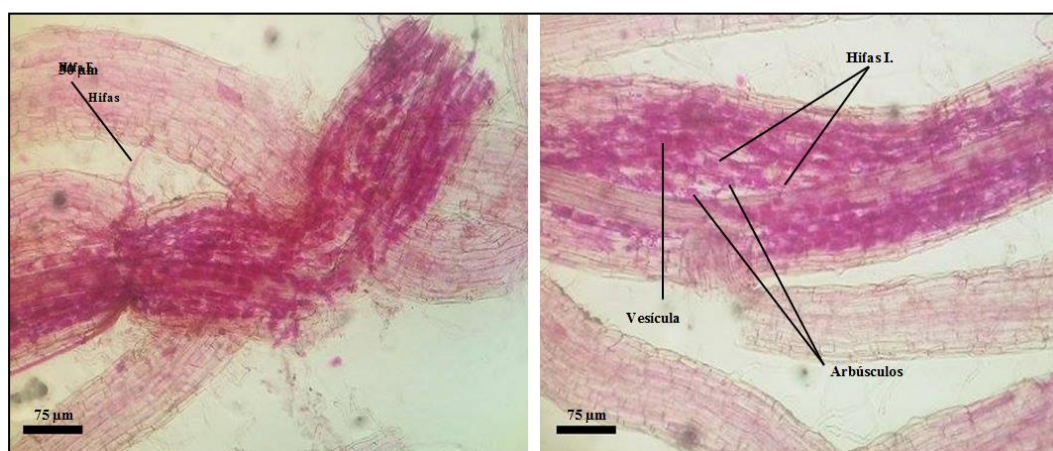


Figura 3.37. Estructuras micorrízicas, raíz-aislamiento *Acaulospora sp. 2*

Sin embargo, los pozos de *Acaulospora lacunosa* son irregulares y dispersas en su distribución de la capa L2 de la espora. Además, las esporas de *Ac. cavernata* y *Ac. foveata* son de color más oscuro y más grandes, y los de *Ac. paulinae* y *Ac. undulata* son más pequeños y de color más tenue. En comparación con las esporas de *Ac. lacunosa*, las producidas por *Ac. scrobiculata* son más grandes y de color más claro; la espora caracterizada en el estudio fue identificada hasta el nivel de género, aun cuando las características son semejantes a *Acaulospora lacunosa*, esto debido a que no se llegó a apreciar el saco esporífero, ni se diferenciaron las capas L1 y L2 de la pared germinal GW1, del mismo modo no se apreció la estructura de pre-germinación que para el caso sería un orbe de geminación.

En el cuadro 3.2, se resumen las medias de la densidad poblacional de esporas por cada uno de los aislamientos identificados, tanto para la época seca como para la época de lluvias, sobre una muestra de suelo rizosférico de 100g. La diversidad de especies de HMA, tanto para la época de lluvias como para la época seca es la misma, siendo la única diferencia entre ellas la densidad de las poblaciones, apreciándose una mayor densidad de HMA en la época seca en comparación de la época de lluvias.

En los **cuadros 3.3** y **3.4**, se aprecia diferencia estadística entre la densidad poblacional de los especímenes, tanto en época seca como en época lluviosa, por lo que procedió a realizar la prueba de Tukey (0.05); donde se diferencian dos grupos de similitud, para ambas épocas, el primer grupo de similitud está formado por el HMA *Septoglomus constrictum*, (media, 1023.65 y 101.74 esporas/100g de suelo, en época seca y época de lluvia, respectivamente); el segundo grupo de similitud lo conforman los restantes 8 especímenes de HMA, tanto para la época de lluvias como en la época seca (gráfico 3.3).

De acuerdo con los resultados del cuadro 3.2, se realiza el análisis de varianza para la densidad poblacional de esporas de HMA en las época seca y de lluvia, (cuadro 3.3 – 3.4); en el cuadro 3.5 se aprecia la diversidad y la frecuencia relativa de Hongos Micorrízicos Arbusculares, así como el índice de dominancia (C), el índice de diversidad de Shannon (H') y la similitud entre las zonas de estudio (CCj).

Cuadro 3.2. Diversidad y Densidad poblacional de Hongos Micorrízicos Arbusculares

Diversidad de Especies Micorrízicas		Media de la Abundancia de HMA (100g suelo)					
		Estiaje			Lluvia		
Glomerales		F. Wayllapampa	C. E. Canaán	C.Luyanta	F. Wayllapampa	C. E. Canaán	C.Luyanta
	Glomeraceae						
	<i>Funneliformis mosseae</i> (T. H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & Schüßler	283.7	405.3	0.0	31.1	31.7	0.0
	<i>Glomus ambisporum</i> G. S. Schenck & G. S. Sm.	309.7	378.3	173.8	28.0	36.0	20.5
	<i>Glomus maculosum</i> Miller & Walker	201.2	0.0	0.0	27.3	0.0	0.0
	<i>Sclerocystis sinuosum</i> Gerd & B. K. Bakshi	3.9	1.5	5.2	1.2	0.3	0.7
	<i>Septoglomus constrictum</i> (Trappe) C. Walker & Schüßler	1044.1	1267.7	759.2	109.6	122.0	73.7
	Claroideoglomeraceae						
	<i>Claroideoglomus etunicatum</i> (W. N. Becker & Gerd.) C. Walker & Schüßler	0.0	278.0	131.8	0.0	22.3	25.2
	Diversisporales						
	Diversisporaceae						
	<i>Diversispora spurca</i> (C.M. Pfeiff., C. Walker & Bloss) C. Walker & Schüßler	42.2	39.5	0.0	11.4	35.5	0.0
	Acaulosporaceae						
	<i>Acaulospora</i> sp. 1	311.1	414.5	351.3	31.6	41.2	32.5
	<i>Acaulospora</i> sp. 2	197.1	379.3	0.0	21.9	45.8	0.0
TOTAL		2393.0	3164.2	1421.3	262.1	334.8	152.5

Cuadro 3.3. Análisis de varianza para la densidad poblacional de hongos micorrízicos arbusculares en época seca

<i>Fuentes de variación</i>	<i>G.L</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>Fc</i>
Tratamientos	8	2314822.1	289352.8	13.623	< .0001**
Error	18	382307.6	21239.3		
Total	26	2697130			

C.V = 12.36%

Cuadro 3.4. Análisis de varianza para la densidad poblacional de hongos micorrízicos arbusculares en época de lluvias

<i>Fuentes de variación</i>	<i>G.L</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>Fc</i>
Tratamientos	8	20901.5	2612.69	10.051	< .0001**
Error	18	4679.2	259.954		
Total	26	25580.7			

C.V =11.54%

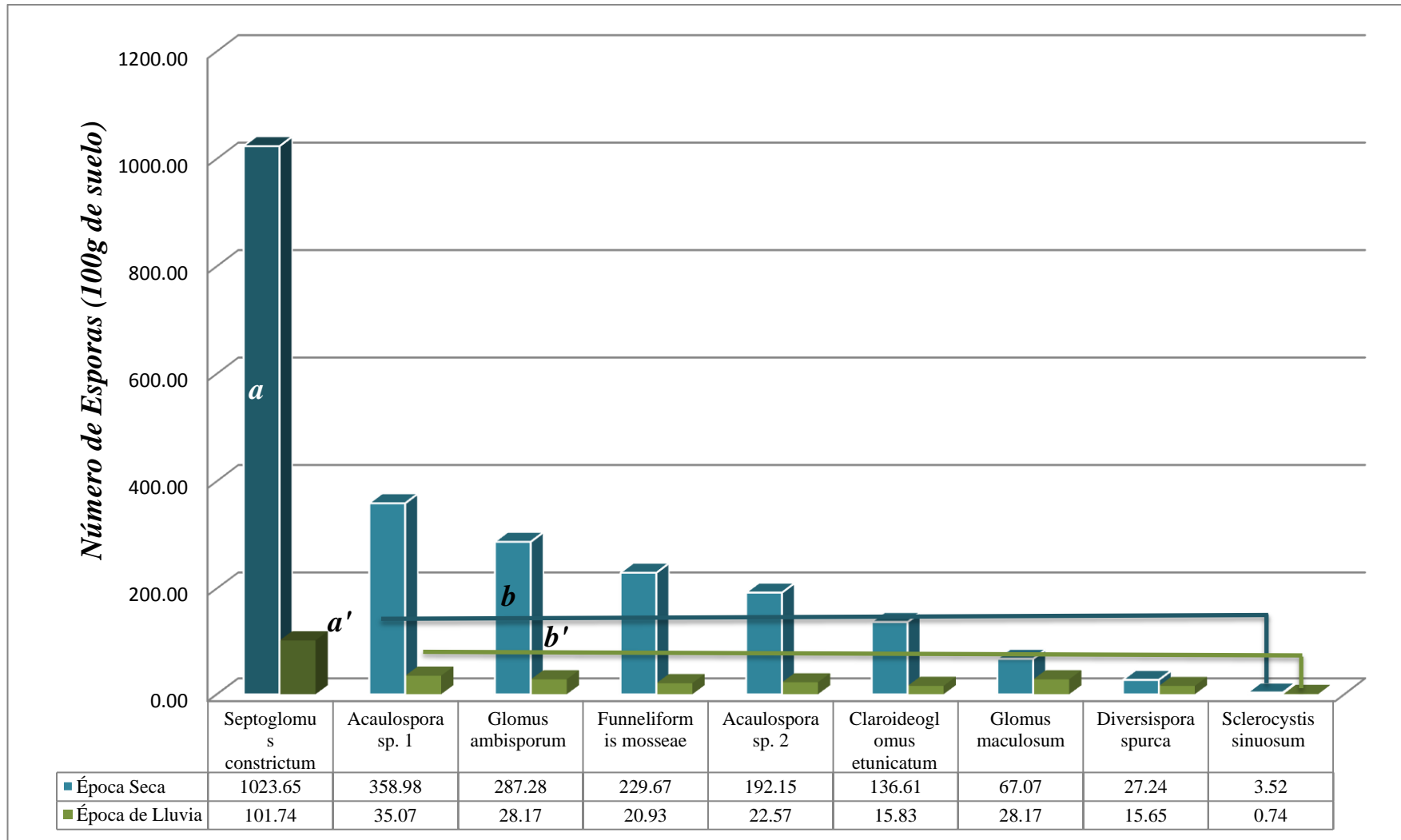


Grafico 3.3. Prueba de Tukey (0.05), para la densidad poblacional de esporas de HMA, en la época seca y época de lluvias

En el **cuadro 3.5** se presenta la diversidad y frecuencia relativa de HMA. Se identificaron 9 especies de HMA; ocho en el Fundo Wayllapampa, ocho en Centro Experimental Canaán y cinco en la Comunidad de Luyanta, del Centro poblado de Santa Rosa de Cochabamba.

La riqueza de HMA presente en cada zona de estudio fue la misma en época seca como en época de lluvias; En el Fundo Wayllapampa, la riqueza consiste de: dos especies de Acaulospora, una especie de Diversispora; los géneros Funneliformis, Sclerocystis y Septoglo mus cada uno representados por un espécimen y dos especies del género Glomus. En el Centro Experimental Canaán, la riqueza consiste de: dos especies de Acaulospora, una especie de Diversispora; los géneros Funneliformis, Glomus, Sclerocystis y Septoglo mus cada uno representados por un espécimen y una especie del género Claroideoglo mus. En la Comunidad de Luyanta, del Centro poblado de Santa Rosa de Cochabamba, la riqueza consiste de: una especie del género Acaulospora, los géneros Glomus, Sclerocystis y Septoglo mus, cada uno representado por un espécimen y un espécimen del género Claroideoglo mus. En las tres zonas de estudio la mayor frecuencia relativa es representada por *Septoglo mus constrictum* y la menor por *Sclerocystis sinuosum*.

El Fundo Wayllapampa, Centro Experimental Canaán y Comunidad de Luyanta, del Centro poblado de Santa Rosa de Cochabamba, mostraron un bajo índice de dominancia (C), en la época lluviosa, la dominancia se da en torno a dos especies, *Septoglo mus constrictum* y *Acaulospora* sp. 1, que aportan con más del 50% en su frecuencia de aparición.

El índice de diversidad de Shannon (H'), fue mayor tanto en el Fundo Wayllapampa como en el Centro Experimental Canaán en comparación a la Comunidad de Luyanta, del Centro poblado de Santa Rosa de Cochabamba, esto debido a que los dos primeros albergaron una mayor diversidad de especies en ambas épocas de evaluación, para las tres zonas de estudio el índice de Shannon (H'), de valores 1.18 a 1.79, indican una baja biodiversidad de especies, esto se explica debido a que el estudio se centra en aquellas especies de HMA a las que las plantas de *Zea mays* L. amiláceo muestran susceptibilidad.

Cuadro 3.5. Diversidad y Frecuencia Relativa de Hongos Micorrízicos Arbusculares

		Frecuencia Relativa					
		F. Wayllapampa		C. E. Canaán		Com. Luyanta	
		Época Seca	Época de lluvia	Época Seca	Época de lluvia	Época Seca	Época de lluvia
<i>Diversidad de Especies Micorrízicas</i>							
Glomerales							
Glomeraceae							
	<i>Funneliformis mosseae</i> (T. H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & Schüßler	11.85	11.87	12.81	9.35	0.00	0.00
	<i>Glomus ambisporum</i> G. S. Schenck & G. S. Sm.	12.94	10.68	11.96	10.62	12.23	13.44
	<i>Glomus maculosum</i> Miller & Walker	8.41	10.43	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Sclerocystis sinuosum</i> Gerd & B. K. Bakshi	0.16	0.47	0.05	0.10	0.36	0.44
	<i>Septoglomus constrictum</i> (Trappe) C. Walker & Schüßler	43.63	41.80	40.06	36.01	53.41	48.31
Claroideoglomeraceae							
	Claroideoglomus etunicatum (W. N. Becker & Gerd.) C. Walker & Schüßler	0.00	0.00	8.79	6.59	9.28	16.50
Diversiporales							
Diversisporaceae							
	<i>Diversispora spurca</i> (C.M. Pfeiff., C. Walker & Bloss) C. Walker & Schüßler	1.76	4.37	1.25	10.60	0.00	0.00
Acaulosporaceae							
	<i>Acaulospora sp. 1</i>	13.00	12.04	13.10	12.15	24.72	21.31
	<i>Acaulospora sp. 2</i>	8.24	8.35	11.99	13.53	0.00	0.00
Riqueza de especies		8	8	8	8	5	5
Índice de diversidad de Shannon (H)		1.64	1.72	1.68	1.79	1.18	1.27
Índice de dominancia de Simpson (C)		0.25	0.23	0.23	0.20	0.37	0.32
Índice de Similitud							
F. Wayllapampa – C. E. Canaán		77.8%					
C. E. Canaán – Comunidad de Luyanta		62.5%					
F. Wayllapampa - Comunidad de Luyanta		44.4%					

La similitud (CCj), mostrada entre el Fundo Wayllapampa y Centro Experimental Canaán, fue de 77.8% al compartir 7 especies de las 9 especies identificadas; la similitud mostrada entre Centro Experimental Canaán y Comunidad de Luyanta, del Centro poblado de Santa Rosa de Cochabamba, fue de 62.5% al compartir 5 especies de las 8 especies identificadas. La similitud mostrada entre Fundo Wayllapampa y Comunidad de Luyanta, del Centro poblado de Santa Rosa de Cochabamba fue de 44.4% al compartir 4 especies de las 9 especies identificadas.

Uno de los factores que influye en la diversidad y tipo de especies de HMA, es la precipitación (Allen et al., 1995; Augé, 2001); Esto ha sido documentado por Lovelock et al., (2003), donde relacionan la presencia de especies de Acaulospora con periodos prolongados de lluvia. Así mismo Stutz y Morton, (1996), Egerton-Waburton y Allen, (2000), Stutz et al., (2000), han observado la presencia de especies del género *Glomus*, en ecosistemas con baja precipitación, esto último se ha observado en las tres zonas de estudio, donde la densidad poblacional de los géneros *Glomus* y *Acaulospora* se reduce a un 10% de la población observada durante la época seca del año; En diversas investigaciones se muestra como la dominancia de especies del género *Acaulospora* tiende a presenciar una baja diversidad de especies del género *Glomus*. Por el contrario, la dominancia por *Glomus*, refleja una baja diversidad de especies de *Acaulospora* (Guadarrama y Álvarez, 1999; Picone, 2000; Zangaro et al., 2000; Husband et al., 2002). Alfonso, (2011), encontró 3 morfotipos de HMA pertenecientes al género *Glomus*, en la región de Querétaro, México, siendo la misma diversidad en ambas épocas del año (lluvia y sequía), Heriberto, M. (2012) determino 26 especies de HMA asociados a *C. odorata* en el estado de Veracruz, encontrando una mayor diversidad de especies durante la época seca, y una similitud de especies de 19% entre las zonas de estudio, donde el 62% pertenece a los géneros *Glomus* y *Funneliformis*, 31% al género *Acaulospora* y 7% entre *Diversispora* y *Scutellospora*; así mismo Fredis, et al., (2014), identifico 31 morfotipos clasificados en 11 posibles géneros, de los cuales 48% corresponden al género *Glomus*, seguido por los géneros *Claroideoglomus* y *Diversispora* con un 10%, *Gigaspora* en un 7%. El presente estudio confirma que el género dominante en los ecosistemas son los pertenecientes a la familia *Glomeraceae* siendo el 55% del

total de la diversidad de HMA encontrada y seguida por la familia Acaulosporaceae con un 22% de la diversidad.

La densidad poblacional de ciertas especies entre una época y otra, varía dentro de una misma zona debido a la estacionalidad (Guadarrama y Álvarez, 1999). Esto fue observado en todas las especies en un mayor o menor grado para las tres zonas de estudio.

3.3. EVALUACIÓN DEL NIVEL DE COLONIZACIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Los valores porcentuales de la colonización por los hongos micorrízicos arbusculares en raíces de *Zea mays* L. amiláceo (procedentes del cultivo monoespecífico), se resumen en el gráfico 3.4, detallándose el porcentaje de colonización medio por estructuras tales como hifas, arbusculos y vesículas, para cada uno de los especímenes de HMA aislados. Apreciándose similitud entre los porcentajes de colonización de hifas y arbusculos, mientras que el porcentaje de colonización por vesículas resulta ser variable y su presencia es dependiente del espécimen. Al realizar el análisis de varianza de la colonización de raíces por HMA (Hifas, Arbusculos y Vesículas respectivamente), que se presentan en los cuadros 3.6, 3.7 y 3.8 se observó alta significación estadística, por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey (0.05) (gráficos 3.5, 3.6 y 3.7).

Cuadro 3.6. Análisis de varianza para Porcentaje de Micorrización de raíces de maíz amiláceo (hifas), (*Zea mays* L. amiláceo)

<i>Fuentes de variación</i>	<i>G.L</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>Fc</i>
Tratamientos	9	33448	3716.444	1043.212	< .0001**
Error	40	142.5	3.563		
Total	49	33590.5			

C.V = 4.58 %

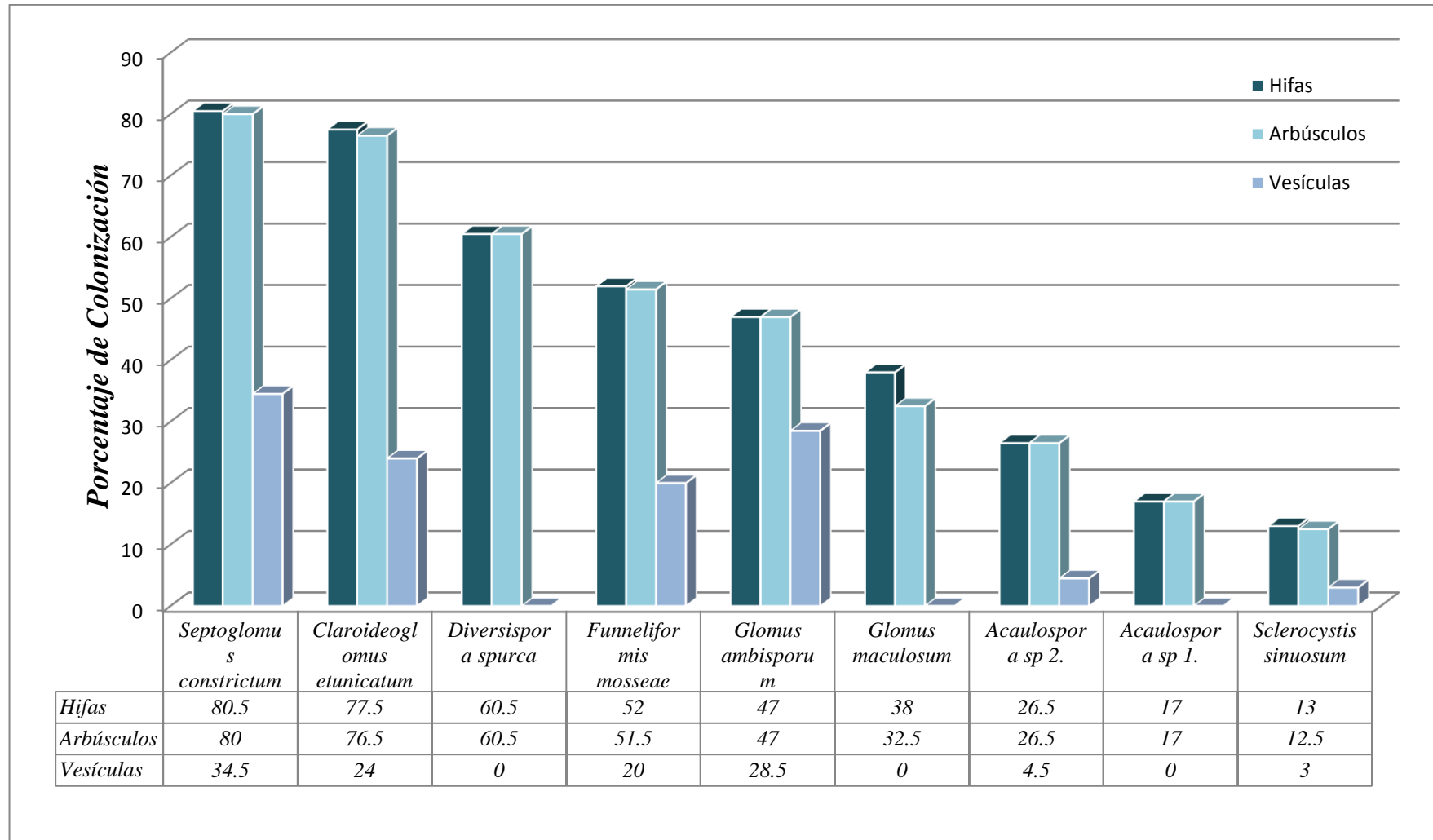


Grafico 3.4. Nivel de colonización por hifas, arbúsculos y vesículas, en cultivo monoespecífico de *Zea mays L.* amiláceo

Cuadro 3.7. Análisis de varianza para Porcentaje de Micorrización de raíces de maíz amiláceo (arbusculos), (*Zea mays L.* amiláceo)

<i>Fuentes de variación</i>	<i>G.L</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>Fc</i>
Tratamientos	8	24211.9	3026.5	670.485	< .0001**
Error	36	162.5	4.5		
Total	44	24374.4			

C.V = 4.73%

Cuadro 3.8. Análisis de varianza para Porcentaje de Micorrización de raíces de maíz amiláceo (vesículas), (*Zea mays L.* amiláceo)

<i>Fuentes de variación</i>	<i>G.L</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>Fc</i>
Tratamientos	8	7755.28	969.41	136.858	< .0001**
Error	36	255.00	7.08		
Total	44	8010.28			

C.V = 20.92 %

En el gráfico 3.5 se observan los resultados obtenidos luego de realizar la prueba de Tukey (0.05), para el porcentaje de colonización por hifas de HMA en raíces de *Zea mays L.* amiláceo, se observa que el rango de micorrización va de 13% a 80.5%, difiriendo para cada uno de los morfotipos aislados; el valor de 0% pertenece al testigo sin inoculo y por lo tanto carente de estructuras micorrízicas.

El mayor promedio corresponde al primer grupo de similitud, y corresponde a los HMA *Septoglomus constrictum* (80.5% de raíz micorrizadas), y *Claroideoglopus etunicatum*, (77.5% de raíz micorrizadas), con 32.2 y 31.0 intersecciones de 40 respectivamente; el segundo grupo de similitud corresponde al HMA *Diversispora spurca* (60.5% de raíz micorrizadas), con 24.2 intersecciones de 40; el tercer grupo de similitud corresponde al HMA *Glomus mosseae* (52.0% de raíz micorrizadas), con 20.8 intersecciones de 40.

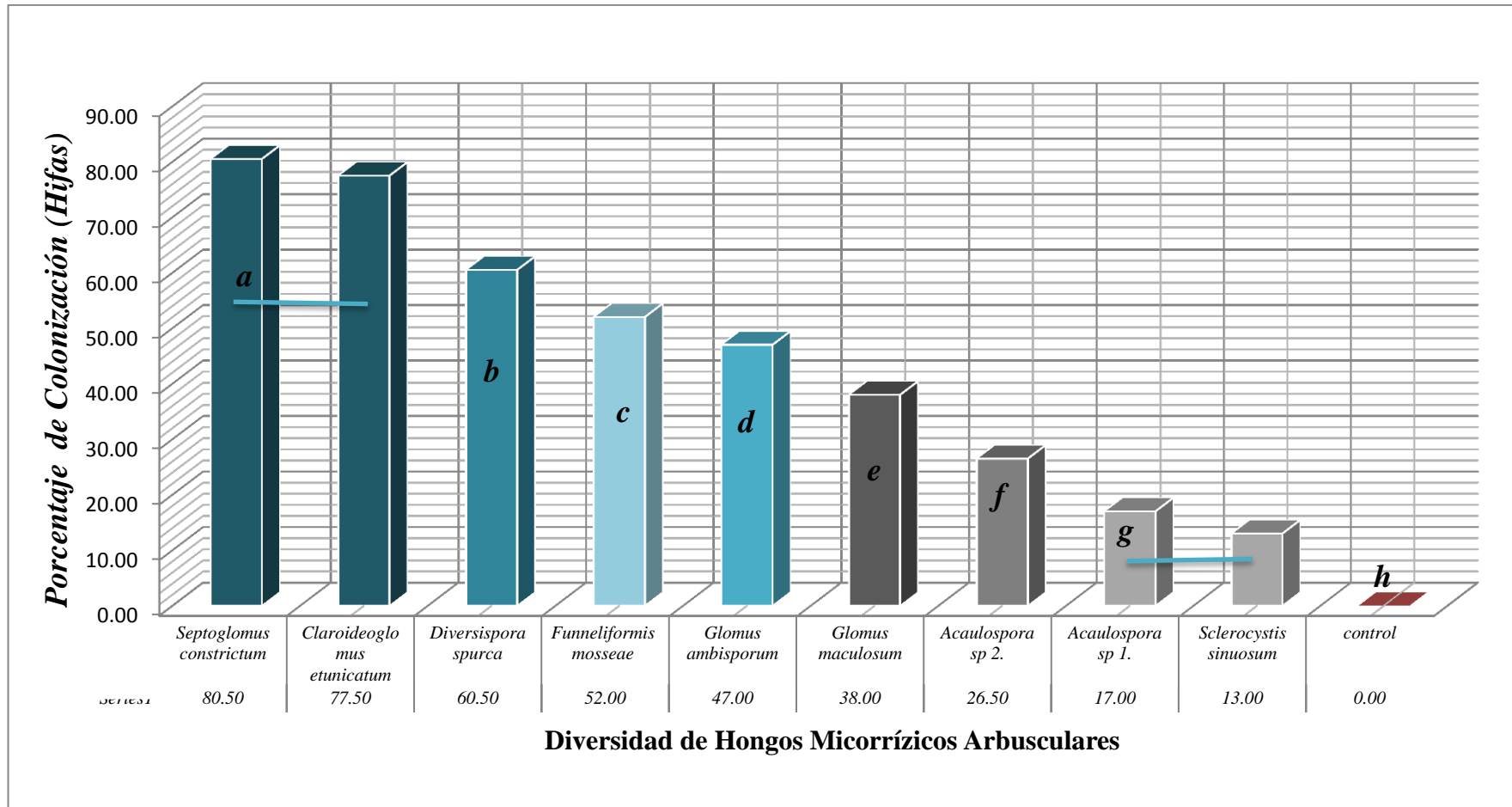


Grafico 3.5. Prueba de Tukey (0.05), para el porcentaje de colonización de hifas en raíces de maíz amiláceo (*Zea mays L.* amiláceo), por HMA en cultivos monoespecíficos

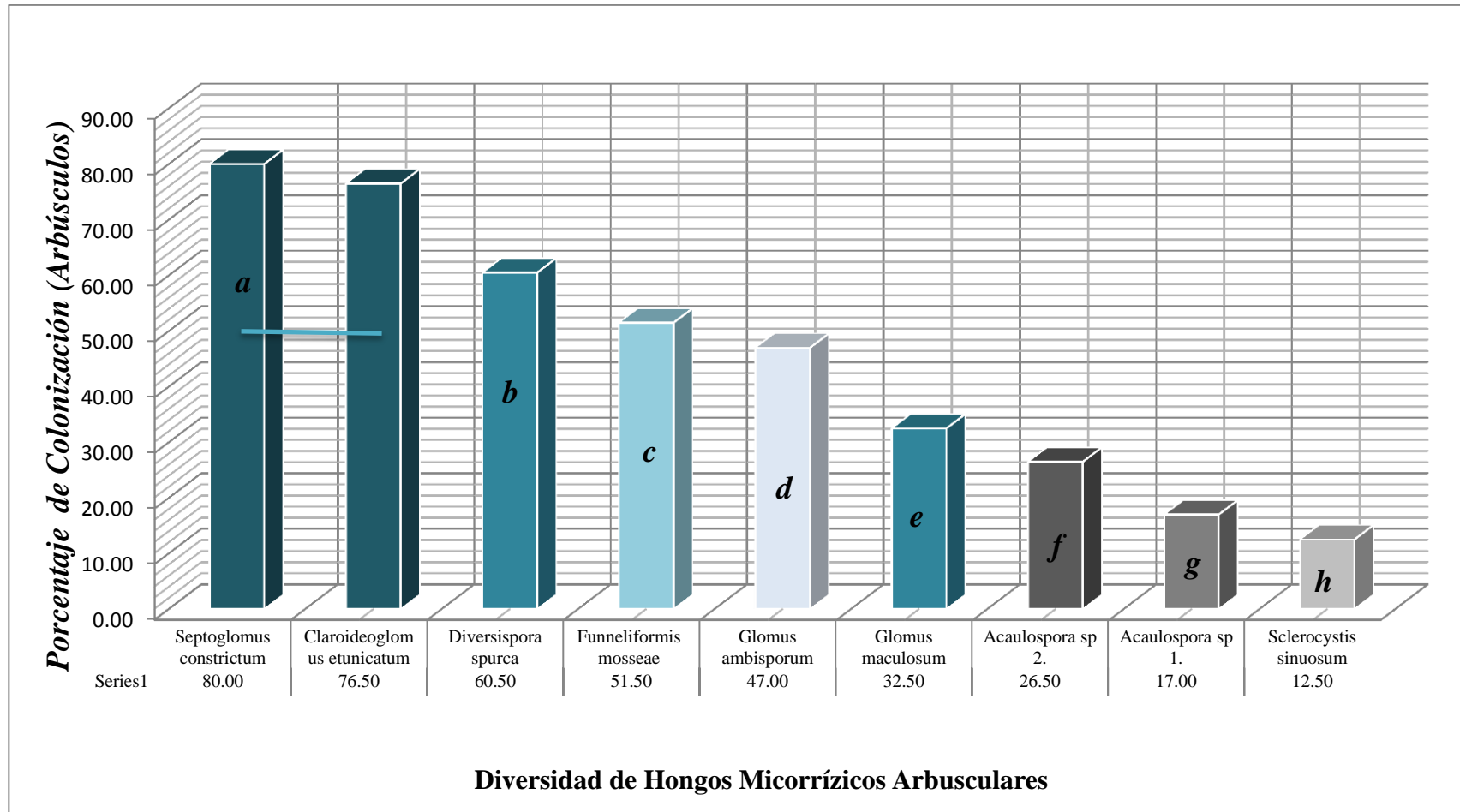


Grafico 3.6. Prueba de Tukey (0.05), para el porcentaje de colonización de Arbúsculos en raíces de maíz amiláceo (*Zea mays L.* amiláceo), por HMA en cultivos monoespecíficos.

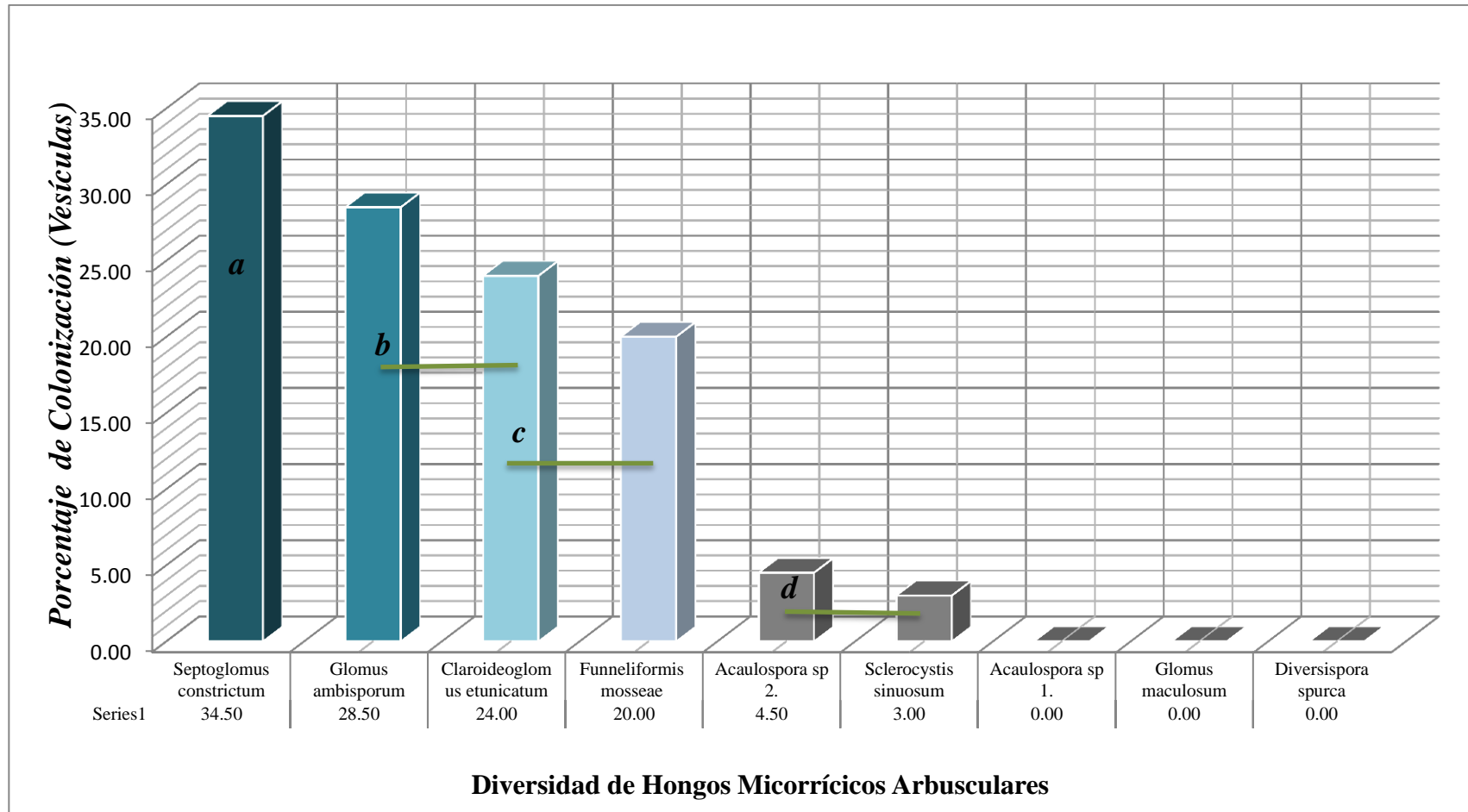


Grafico 3.7. Prueba de Tukey (0.05), para el porcentaje de colonización de Vesículas en raíces de maíz amiláceo (*Zea mays L.* amiláceo), por HMA en cultivos monoespecíficos.

El cuarto grupo de similitud corresponde al HMA *Glomus ambisporum* (47.0% de raíz micorrizadas), con 18.8 intersecciones de 40; el quinto grupo de similitud corresponde al HMA *Glomus maculosum* (38.0% de raíz micorrizadas), con 15.2 intersecciones de 40; el sexto grupo de similitud corresponde al HMA *Acaulospora sp. 2* (26.5% de raíz micorrizadas), con 10.6cm de raíz infectada de 40; el séptimo grupo de similitud corresponde a los HMA *Acaulospora sp. 1* (17.0% de raíz micorrizadas) y *Sclerocystis sinuosum* (13.0% de raíz micorrizadas), con 6.8 y 5.2 intersecciones de 40 respectivamente; el octavo grupo corresponde al testigo (0% de raíz micorrizadas).

Las categorías propuestas por Trouvelot et al. (1986), para clasificar el porcentaje de micorrización, posicionan a los grupos de similitud 1,2, y 3 en la categoría 4 (buena); y a los grupos de similitud 4, 5, 6 y 7 en la categoría 3(media).

En el gráfico 3.6 para el porcentaje de colonización de arbusculos en raíces de *Zea mays L.* amiláceo, se aprecian los grupos de similitud de manera idéntica a los apreciados en el porcentaje de colonización por hifas, con la inclusión de un octavo grupo de similitud, que corresponde a *Sclerocystis sinuosum* (12.5% de raíz micorrizada que incluye arbusculos).

En el grafico 3.7 para el porcentaje de colonización de vesículas en raíces de *Zea mays L.* amiláceo, donde el mayor promedio corresponde al primer grupo de similitud, y corresponde al HMA *Septoglomus constrictum* (34.5 % de colonización que incluye vesículas), el segundo grupo de similitud corresponde al HMA *Glomus ambisporum* (28.5 % de colonización que incluye vesículas), el tercer grupo de similitud corresponde a los HMA *Claroideoglomus etunicatum* (24.0% de colonización que incluye vesículas) y *Funneliformis mosseae* (20.0 de colonización que incluye vesículas), finalmente el cuarto grupo de similitud corresponde a los HMA *Acaulospora sp. 2* (4.5% de colonización que incluye vesículas) y *Sclerocystis sinuosum* (3.0% de colonización que incluye vesículas); los HMA *Acaulospora sp. 1*, *Glomus maculosum* y *Diversispora spurca*, no formaron vesículas, esto se confirma con las descripciones realizadas por Blaszkowski, (2016) y Morton, (2016).

En la gráfica 3.4, se aprecia similitud entre el porcentaje de colonización de Hifas y Arbúsculos; por lo que se realizó la prueba de t-student (n: 9; t: 1.512; p: 0.17), no mostrando diferencia estadística entre ellos, en general los altos porcentajes de colonización estuvieron influenciados por estructuras hifales y arbusculares, y en menor medida por las vesículas (figura 3.1).

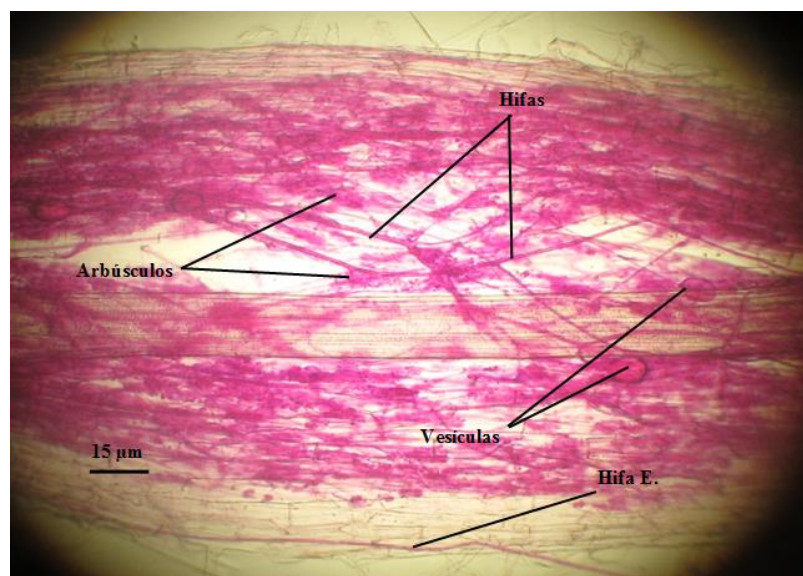


Figura 3.38. Colonización de raíces por hifas, arbúsculos y vesículas, al interior de la raíz de *Zea mays L.* amiláceo.

Según la apreciación para el porcentaje de colonización hecha por Sieverding et al., (2003), los grupos de similitud 1, 2, 3, 4 y 5 poseen una buena relación con el hospedero (micorrización entre 30 y 90%), por lo que el maíz amiláceo (*Zea mays L.* amiláceo) es susceptible a los HMA *Septogloium constrictum*, *Claroideogloium etunicatum*, *Diversispora spurca*, *Glomus mosseae*, *Glomus ambisporum*, y *Glomus maculosum*, y posee una baja susceptibilidad (menor al 30% de micorrización), para los grupos de similitud 6 y 7, formado por los HMA *Acaulospora sp 1*, *Acaulospora sp 2*, y *Sclerocystis sinuosum*.

Collins et al., (2003), demuestran que a mayor cantidad de nitrógeno, las estructuras de las HMA se reducen significativamente (< 20% micorrización total), la cantidad de nitrógeno en el sustrato del experimento para cada morfotipo fue adecuado, siendo el *Septogloium constrictum* (80.5% de raíz micorrizadas), y *Claroideogloium*

etunicatum, (77.5% de raíz micorrizadas), la prueba de ello, siendo la susceptibilidad del hospedero la variable a considerar para el bajo porcentaje de colonización por los HMA *Acaulospora sp 1* y *Sclerocystis sinuosum*. Rodríguez et al., (2008) indican que en altas concentraciones de fósforo disponible ($> 18\text{ppm}$), afecta la formación de estructuras de las HMA, y estas se reducen significativamente, ($<30\%$ colonización total), esta no es una variable a considerar, para los especímenes cuyo porcentaje de colonización está por debajo de este número, debido a que los datos obtenidos del análisis de caracterización de los suelos muestreados, dan valores de clasificación media y baja (menos de 18ppm de fósforo), interpretando esto como una baja susceptibilidad del maíz amiláceo a los HMA *Acaulospora sp 2*, *Acaulospora sp 1*, y *Sclerocystis sinuosum*.

3.4. CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE LOS HMA, FRENTE A *Fusarium oxysporum*

3.4.1. INHIBICIÓN MICELIAL

En el cuadro 3.9 se presenta el análisis de varianza para el porcentaje de inhibición micelial del hongo patógeno *Fusarium oxysporum*, a partir de metabolitos inhibitorios solubles extraídos de hongos micorrízicos arbusculares en Caldo mínimo en sales (MIN), que resulta con alta significación estadística, para los especímenes de HMA aislados, por lo que se procedió a realizar la prueba de Dunnett (0.05) (ver gráfico 3.8).

Cuadro 3.9. Análisis de varianza para Inhibición Micelial del Hongo patógeno *Fusarium oxysporum*

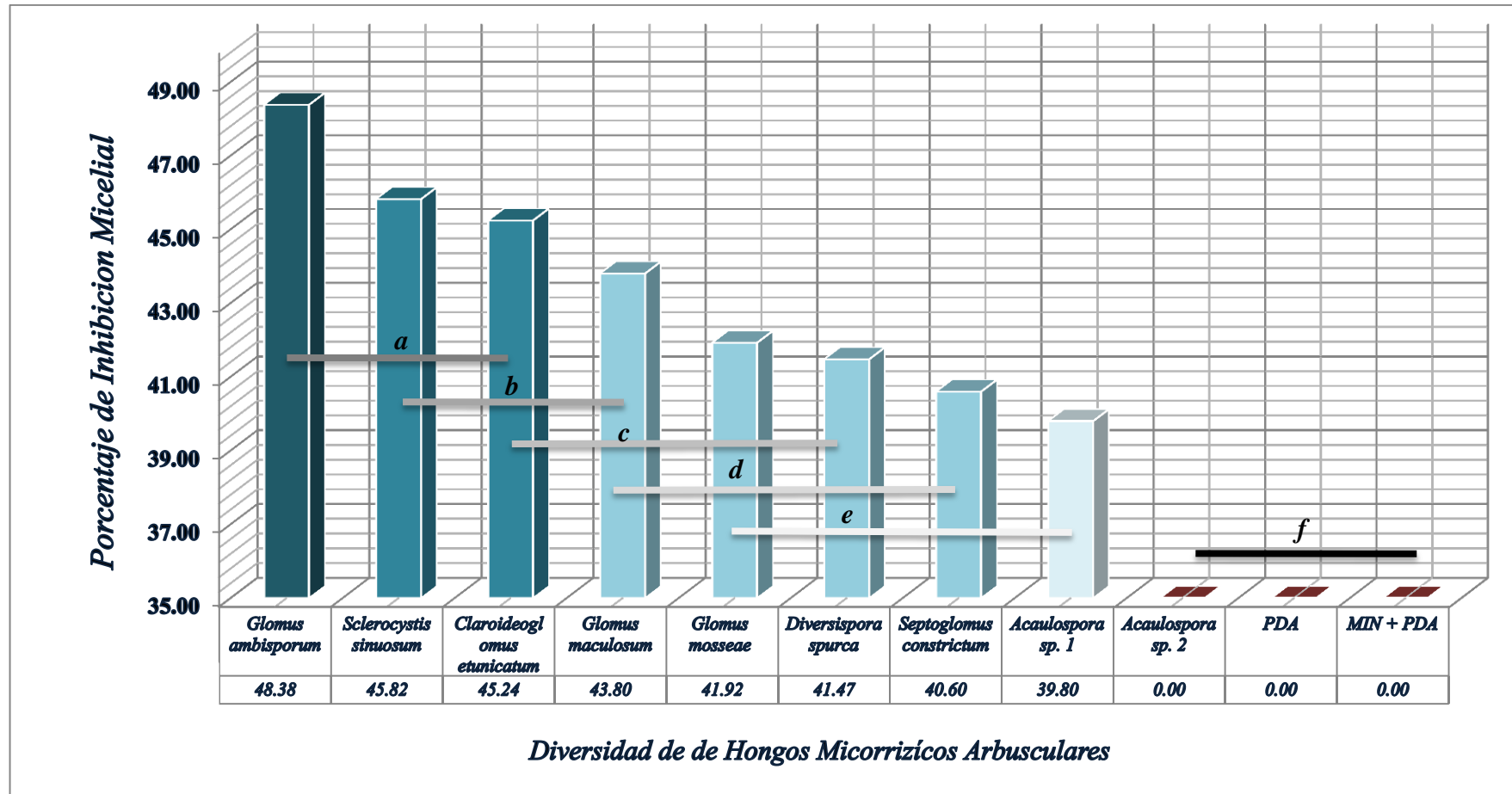
<i>Fuentes de variación</i>	<i>G.L</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>Fc</i>
Tratamientos	10	12498.58	1249.86	246.364	$< .0001^{**}$
Error	22	111.61	5.07	0	0
Total	32	12610.19	0.00	0	0

C.V = 7.14%

En el gráfico 3.8, se observan los resultados obtenidos luego de realizar la prueba de Dunnett (0.05) para el porcentaje de inhibición micelial, se observa que el rango va

desde 0.00% hasta 48.38% de inhibición micelial, y se pueden considerar seis grupos de similitud sin diferencia entre ellos. Los aislamientos de los especímenes de HMA, estudiados variaron en sus capacidades para producir metabolitos que inhiben el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, los filtrados del aislamiento del primer grupo de similitud que corresponde al HMA *Glomus ambisporum*, que inhibe el crecimiento micelial en un con 48.38%, este es el valor más alto de inhibición micelial del estudio; el segundo grupo de similitud corresponde al HMA *Sclerocystis sinuosum*, con una capacidad de inhibición micelial de 45.82%, el tercer grupo de similitud corresponde al HMA *Claroideoglosum etunicatum*, con una capacidad de inhibición micelial de 45.24%. El cuarto grupo de similitud corresponde al HMA *Glomus maculosum*, con una capacidad de inhibición micelial de 43.80%, el quinto grupo de similitud corresponde a los HMA *Glomus mosseae*, *Diversispora spurca*, *Septoglosum constrictum* y *Acaulospora sp. 1*, con una capacidad de inhibición micelial de 42.92%, 41.47%, 40.60% y 39.80% respectivamente. En los medios de cultivo, PDA (Potato Dextrose Agar), y PDA+MIN (Potato Dextrose Agar + Caldo Mínimo en Sales 1:1 v/v), no se apreciaron diferencias durante la colonización de la placa, siendo estos similares en todos los aspectos; El medio de cultivo PDA+MIN, que contenía el filtrado con los metabolitos inhibitorios procedentes del aislamiento de *Acaulospora sp. 2*, no tuvo un efecto claro como antagonista, no se apreció inhibición micelial alguna en la placa, llegando al 100% de colonización en el mismo periodo que el control y testigo.

Bailey et al., (2008), en su investigación “Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic Trichoderma isolates whit biological control potential in Theobroma cacao”, realizó pruebas con microorganismos endófitos, observando la reacción de estos a diferentes medios de cultivo, concluye que el medio de cultivo MIN (caldo mínimo en sales), es un medio que no se presenta toxico para la mayoría de especies endófitas, incluido el género *Fusarium*, noción basada en Srinivasan et al., (1992), quien además concluyó que este medio de cultivo, no afecta de manera negativa el desarrollo de microorganismos poco exigentes, el cual lo hace idóneo para capturar metabolitos secundarios procedentes de estos.



Gráfica 3.8. Prueba de Dunnett (0.05), para el porcentaje de Inhibición micelial del patógeno *Fusarium oxysporum*, in vitro, con metabolitos inhibitorios solubles a partir de HMA.

Gianinazzi- Pearson et al., (1994); Azcón-Aguilar & Barea, (1996), Gosling et al., (2006); Franken et al., (2007); Akhtar & Siddiqui, (2008); Kapoor et al., (2008), demostraron una serie de mecanismos a través de los cuales ocurre la interacción micorrizas/patógenos, demostrado entonces que los HMA no actúan directamente sobre éstos, sino que su efecto es indirecto; las pruebas in vitro, realizadas con el material filtrado de los aislamientos de HMA, reducen el crecimiento micelial entre 39.80% y 48.38% según los metabolitos inhibitorios solubles procedentes de los aislamientos de HMA, basado en el crecimiento micelial del testigo (PDA + MIN), que no presenta efecto de inhibición, debemos asumir que el Material filtrado procedente de estos aislamientos, tiene un efecto inhibitorio para el hongo patógeno *Fusarium oxysporum*.

Gosling et al., (2006); Franken et al., (2007); Akhtar & Siddiqui, (2008); Kapoor et al. (2008), citados por Alejandro, (2011) en su trabajo “Interacción de microorganismos Benéficos en las plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión”; indican los beneficios de la asociación simbiótica entre los HMA y las plantas, entre ellas la resistencia de las raíces a infecciones causadas por patógenos, ocupando los espacios radiculares, (Antagonismo por competencia), no apreciaron otra forma de antagonismo por los hongos formadores de micorrizas arbusculares, que no sea de manera indirecta; En los resultados obtenidos, se aprecia la Efecto-antibiosis, una forma de antagonismo directo sobre el patógeno *Fusarium oxysporum*, si bien no se da en el 100% de los especímenes aislados de HMA, el trabajo presenta una posibilidad de antibiosis, con más de 39.80% hasta un 48.38 % de inhibición micelial para un mismo periodo de tiempo, en contraste con el control.

3.4.2. TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL Y DESCRIPCION DE LA ANTIBIOSIS

En el cuadro 3.10 se presenta el análisis de varianza para la tasa de crecimiento micelial del hongo patógeno *Fusarium oxysporum*, en el medio de cultivo PDA (Potato Dextrosa Agar), PDA + MIN (Potato Dextrosa Agar + Caldo mínimo en Sales 1:1 v/v) y PDA + MIN + MIS (Potato Dextrosa Agar + Caldo mínimo en Sales 1:1 v/v), más metabolitos inhibitorios solubles obtenidos del filtrado, resulta con alta

significación estadística, para los morfotipos de HMA aislados, por lo que se procede a realizar la prueba de Dunnett (0.05) (ver gráfico 3.9).

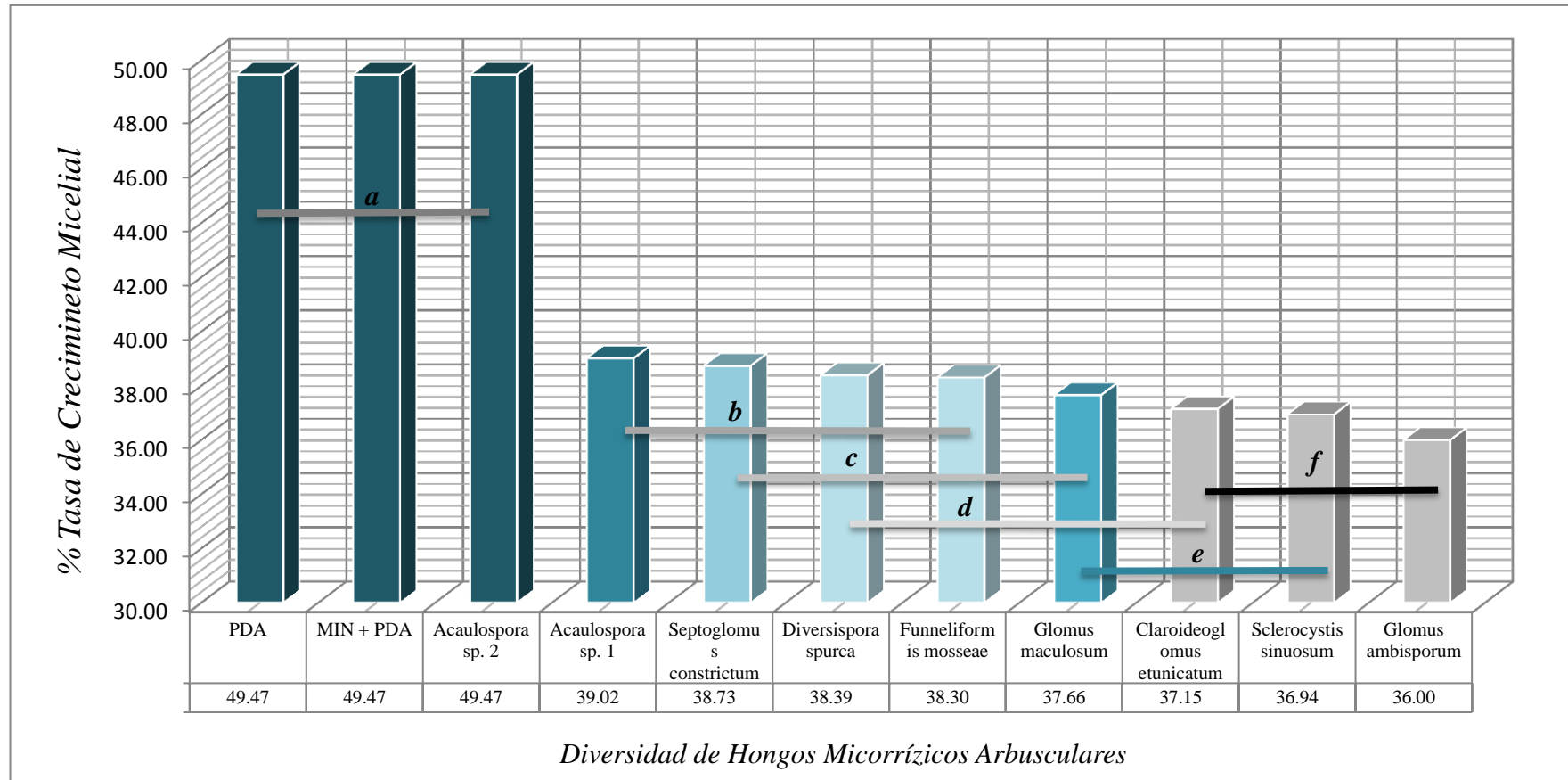
Cuadro 3.10. Análisis de varianza para Tasa de Crecimiento Micelial, del patógeno *Fusarium oxysporum*, en medio PDA + MIN + metabolitos inhibitorios solubles.

<i>Fuentes de variación</i>	<i>G.L</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>Fc</i>
Tratamientos	10	917.608	91.761	151.794	< .0001**
Error	22	13.299	0.604		
Total	32	930.907			

C.V = 1.89%

En el gráfico 3.9, se observan los resultados obtenidos luego de realizar la prueba de Dunnett (0.05) para la tasa de crecimiento micelial, se observa que el rango va desde 36.00% hasta 49.47%, describiendo una fase de crecimiento exponencial, y se puede considerar seis grupos de similitud sin diferencia entre ellos.

Los aislamientos de morfotipos de HMA, estudiados variaron en sus capacidades para producir metabolitos que inhiben el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, ralentizando sus tasas de crecimiento, los ensayos que dieron mayores valores por la tasa de crecimiento son el control y testigo (medio de cultivo con PDA y PDA + MIN 1:1 v/v), y el material filtrado procedente del HMA *Acaulospora sp. 2* (PDA + MIN 1:1 v/v), con una tasa de crecimiento micelial de 49.47% diarios, el segundo grupo de similitud corresponde al HMA *Acaulospora sp. 1*, con una tasa de crecimiento micelial de 39.02%.



Gráfica 3.9. Prueba de Dunnett (0.05), para tasa de crecimiento micelial del patógeno *Fusarium oxysporum*, in vitro, con metabolitos inhibitorios solubles a partir de HMA.

El tercer grupo de similitud corresponde al HMA *Septoglosum constrictum*, con una tasa de crecimiento micelial de 38.73%, el cuarto grupo de similitud corresponde a los HMA *Diversispora spurca* y *Glomus mosseae* con una tasa de crecimiento micelial de 38.39% y 38.30% respectivamente, el quinto grupo de similitud corresponde a *Glomus maculosum*, con una tasa de crecimiento micelial de 37.66% y el sexto grupo de similitud corresponde a los HMA *Claroideoglosum etunicatum*, *Sclerocystis sinuosum* y *Glomus ambisporum*, con tasa de crecimiento micelial de 37.15, 36.94 y 36.00% respectivamente.

Fernández y Suarez, (2009), en su trabajo “Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht. F en Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. Flavicarpa), del municipio zona bananera Colombia”, describen el desarrollo del patógeno *Fusarium oxysporum* y su comportamiento in vitro en medio de cultivo PDA (Potato Dextrosa Agar), describen que la formación de micro-conidias a partir del tercer día y la formación de macro-conidias a partir del décimo día, esto contrasta con las observaciones realizadas en el presente trabajo, debido a que se evaluaron las tasas de crecimiento hasta el séptimo día, apreciándose estructuras como micelio vegetativo, micelio reproductivo, micelio con pigmentos carotenoides y micro-conidias.

Si bien ningún aislamiento produjo metabolito inhibitorio con una efectividad del 100%, sobre el desarrollo micelial, 8 de 9 aislamiento de HMA, demostraron antibiosis, reduciendo la tasa de crecimiento micelial en 21.12% hasta un 27.23% (*Acaulospora* sp. 1 y *Glomus ambisporum*, respectivamente), Figueroa-Rivera et al., (2010), indica que la tasa de crecimiento micelial del *Fusarium oxysporum*, en medio de cultivo PDA es de 51.23%, valor muy semejante al obtenido que es de 49.47%.

ANTIBIOSIS

los aislamientos de *Fusarium oxysporum*, en el medio PDA (Potato Agar Dextrosa), MIN + PDA (Caldo mínimo en sales + Potato agar dextrosa 1:1 v/v) y MIN + PDA + material filtrado metabolitos inhibitorios solubles “MIS” de los HMA), presentaron

características macroscópicas similares; formando micelio aéreo, de textura algodonosa y con coloración variable de blanco a rosado durazno, esta descripción concuerda con Arias y Jerez, (2008).

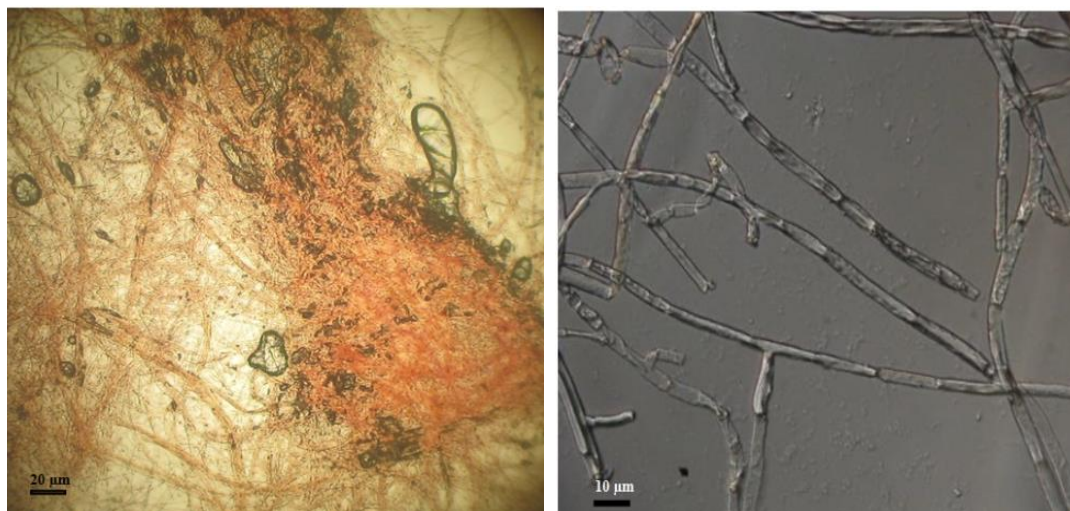


Figura 3.39. Micelio de pigmento carotenoide (izquierda), e hifas sin pigmentación (derecha), típicos para todos los aislamientos de *Fusarium oxysporum*, en los diferentes tratamientos.

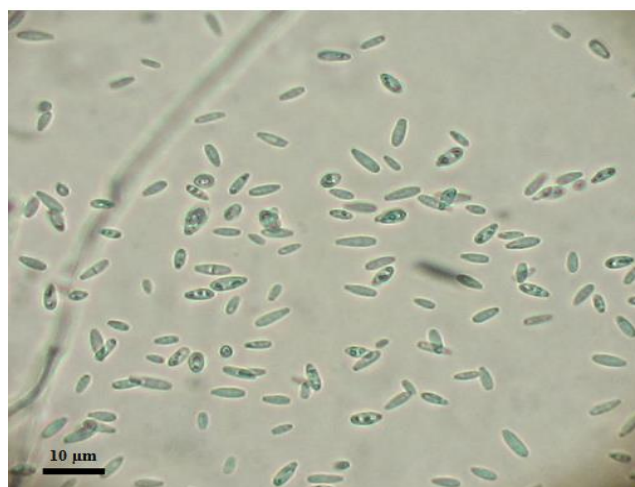


Figura 3.40. Microconidias, típicos para los aislamientos de *Fusarium oxysporum*, en los diferentes tratamientos.

a) Testigo y Control

Los aislamientos de *Fusarium oxysporum*, en los medios de cultivo testigo (PDA + MIN), y control (PDA), se desarrollaron con una tasa de crecimiento micelial de 49.47% diario, en la colonia se aprecia micelio aéreo con pigmentación carotenoide (abundante), de textura algodonosa, con tonalidades C:23; M:51;Y:35;K:10 en el

anverso y C:30; M:80;Y:65;K:35 en el reverso. Además se aprecia pigmentación violeta (C:35; M:60; Y:40; K:31), esto último se hace más notorio en el medio PDA + MIN, desde una perspectiva microscópica ambos cultivos son similares, presentan micelio con pigmentación carotenoide (mayor proporción), micelio blanco (menor proporción o inexistente) y microconidias, no se aprecian macroconidias ni Clamidosporas. Se aprecia además la elevación umbilicada, que inicia al centro y se extiende hacia la periferia.

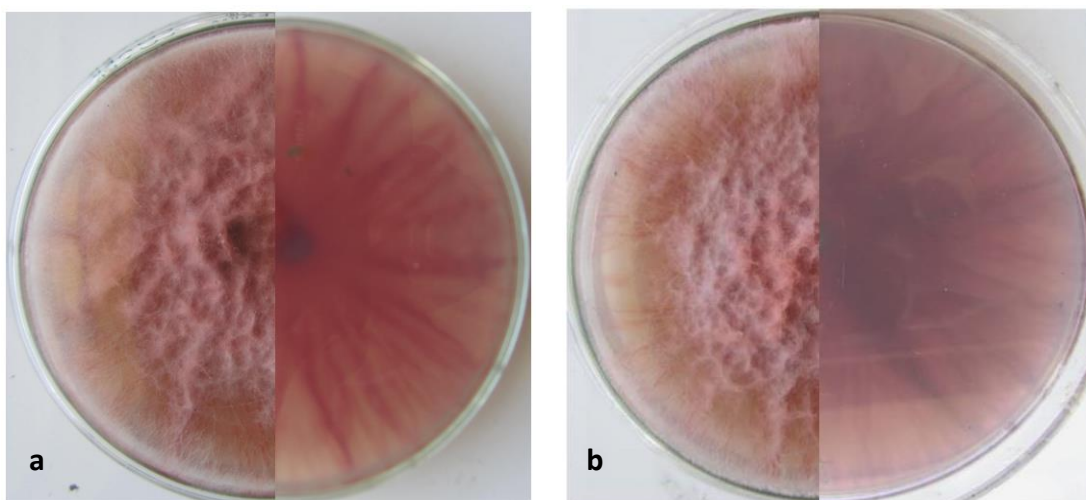


Figura 3.41. Aislamiento *Fusarium oxysporum*, en medio de cultivo PDA (Potato Agar Dextrosa, fig. a), y medio de cultivo modificado PDA + MIN (Potato Agar Dextrosa + Caldo Mínimo en Sales 1:1 v/v, Fig. b).

b) *Acaulospora sp. 2*

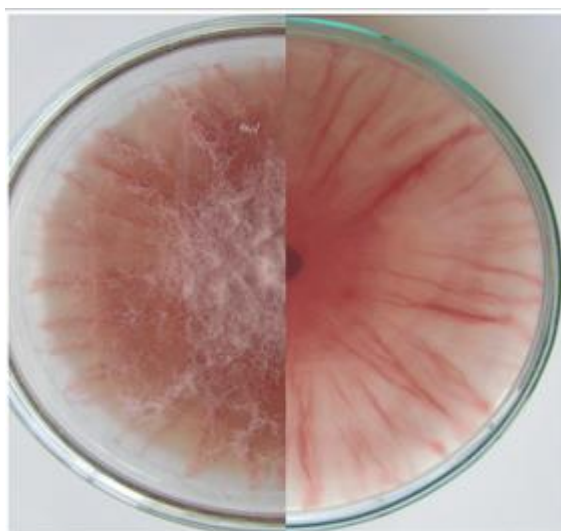


Fig. 3.42. Característica del aislamiento *F. oxysporum*, en MIS, *Acaulospora sp. 2*

El aislamiento de *F. oxysporum*, en el medio modificado (PDA+MIN+MIS), se desarrolló con una tasa de crecimiento micelial de 49.47% diario, en la colonia se aprecia micelio blanco en la misma proporción que el micelio con pigmento carotenoide, abundante micelio vegetativo, de textura algodonosa, con tonalidades C:25; M:50;Y:40; K:10, en el anverso y C:25;M:80;Y:60;K:20, en el reverso, se

aprecia elevación umbilicada y borde estriado.

c) *Acaulospora sp. 1*

El aislamiento de *F. oxysporum*, en el medio modificado (PDA+MIN+MIS), se

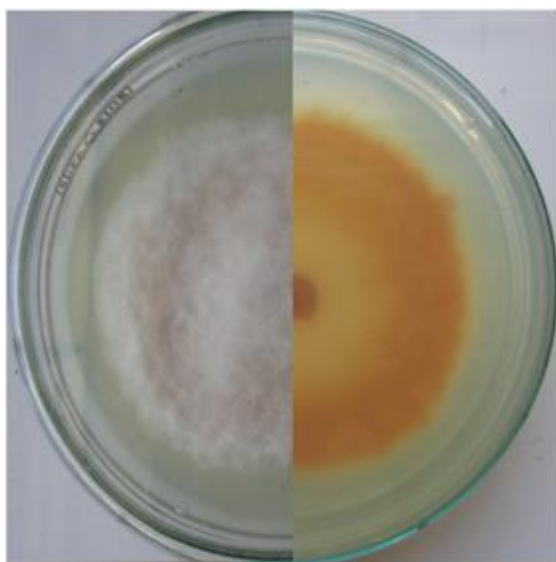


Fig. 3.43. Característica del aislamiento *F. oxysporum*, en MIS, *Acaulospora sp. 1*

desarrolló con una tasa de crecimiento micelial de 30.02% diario, en la colonia se aprecia micelio aéreo blanco, de textura algodonosa en el anverso y tonalidades, marrón-naranja claro (C:25;M:40; Y:75;K:20) concéntrica y marrón-naranja oscuro (C:25;M:60; Y:80;K:25), hacia el exterior en el reverso, así como escaso micelio vegetativo. Se aprecia elevación umbilicada y borde estriado.

d) *Septogloium constrictum*

El aislamiento de *F. oxysporum*, en el medio modificado (PDA+MIN+MIS), se

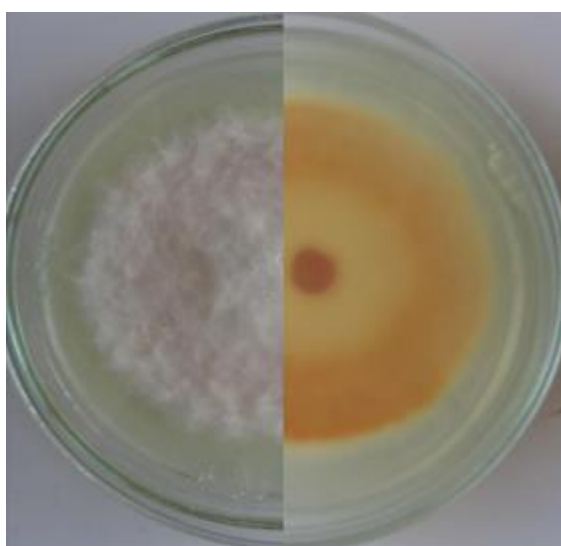


Fig. 3.44. Característica del aislamiento *F. oxysporum*, en MIS, *Septogloium constrictum*.

desarrolló con una tasa de crecimiento micelial de 38.73% diario, en la colonia se aprecia micelio aéreo blanco, de textura algodonosa en el anverso y tonalidades, marrón-naranja claro (C:25;M:40;Y:75; K:20) concéntrica y naranja oscuro (C:25; M:60; Y:80;K:25), hacia el exterior en el reverso, así como escaso micelio vegetativo. Se aprecia elevación umbilicada y borde estriado.

e) *Diversispora spurca*

El aislamiento de *F. oxysporum*, en el medio modificado (PDA+MIN+MIS), se

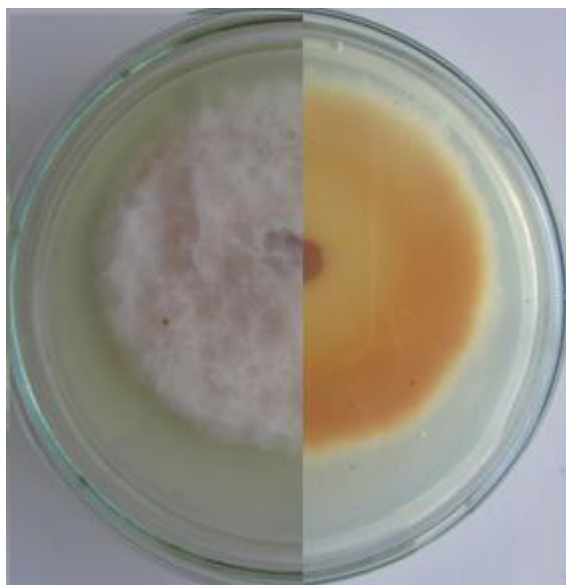


Fig. 3.45 Característica del aislamiento *F. oxysporum*, en MIS, *D. spurca*.

desarrolló con una tasa de crecimiento micelial de 38.39% diario, en la colonia se aprecia micelio aéreo blanco (escaso), de textura algodonosa en el anverso y tonalidades, marrón-naranja claro (C:25; M:40; Y:75; K:20) concéntrica y naranja oscuro (C:25;M:60;Y:80;K:25), hacia el exterior en el reverso, así como escaso micelio vegetativo. El micelio en el anverso se nota llano y borde estriado.

f) *Glomus mosseae*

El aislamiento de *F. oxysporum*, en el medio modificado, se desarrolló con una tasa

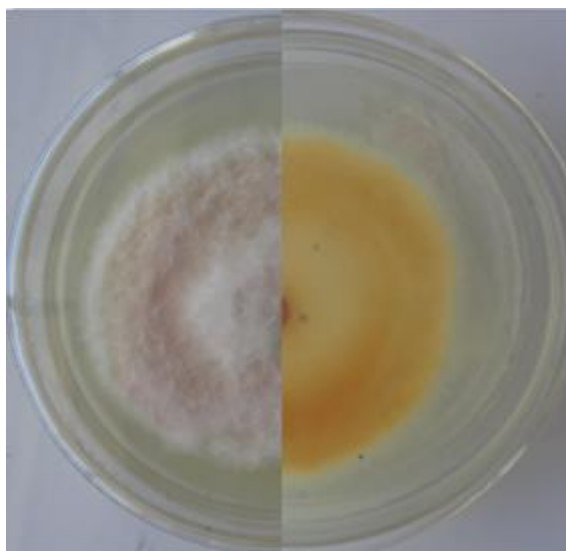


Fig.3.46. Característica del aislamiento *F. oxysporum*, en MIS, *Gl. mosseae*.

de crecimiento micelial de 38.30% diario, en la colonia se aprecia micelio aéreo blanco, de textura algodonosa en el anverso y tonalidades, Amarillo claro (C:30;M:40;Y:65;K:15) concéntrica y naranja claro (C:25;M:60; Y:80;K:25), hacia el exterior en el reverso, así como escaso micelio vegetativo. Se aprecia elevación umbilicada y borde estriado.

g) *Glomus maculosum*

El aislamiento de *F. oxysporum*, en el medio modificado (PDA+MIN+MIS), se desarrolló con una tasa de crecimiento micelial de 37.66% diario, en la colonia se

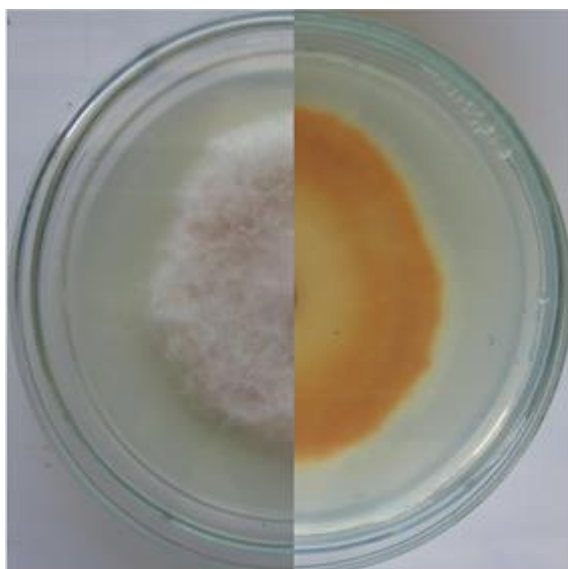


Fig. 3.47. Característica del aislamiento *F. oxysporum*, en MIS, *Gl. maculosum*

aprecia micelio aéreo blanco (abundante), de textura algodonosa en el anverso y tonalidades, Amarillo (C:30;M:40; Y:70; K:20) concéntrica y marrón-naranja (C:25; M:55; Y:80; K:25), hacia el exterior en el reverso así como escaso micelio vegetativo. En el anverso el relieve es llano y de borde estriado.

h) *Claroideoglomus etunicatum*

El aislamiento de *F. oxysporum*, en el medio modificado (PDA+MIN+MIS), se

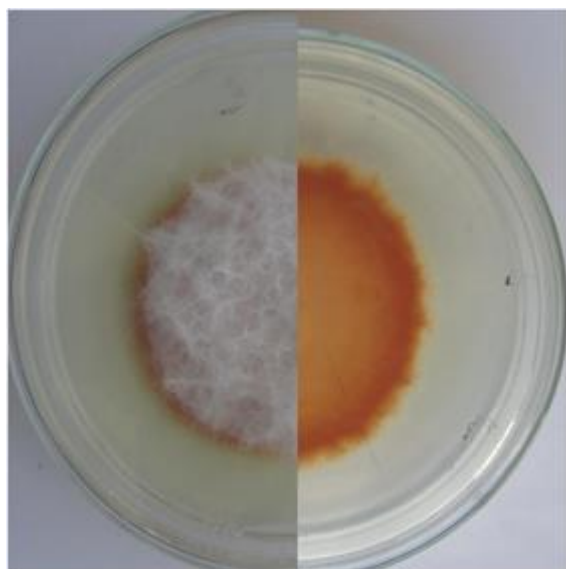


Fig.3.48. Característica del aislamiento *F. oxysporum*, en MIS, *Cl. etunicatum*.

desarrolló con una tasa de crecimiento micelial de 37.15% diario, en la colonia se aprecia micelio aéreo blanco, de textura algodonosa en el anverso, y tonalidades, (C:20; M:60; Y:80; K:20) concéntrica y marrón-rojizo (C:25; M:80; Y:90; K:30), hacia el exterior a manera de halo en el reverso así como escaso micelio vegetativo. En el anverso el relieve es convexo y borde notoriamente estriado.

i) *Sclerocystis sinuosum*

El aislamiento de *Fusarium oxysporum*, en el medio modificado (PDA+MIN+MIS),

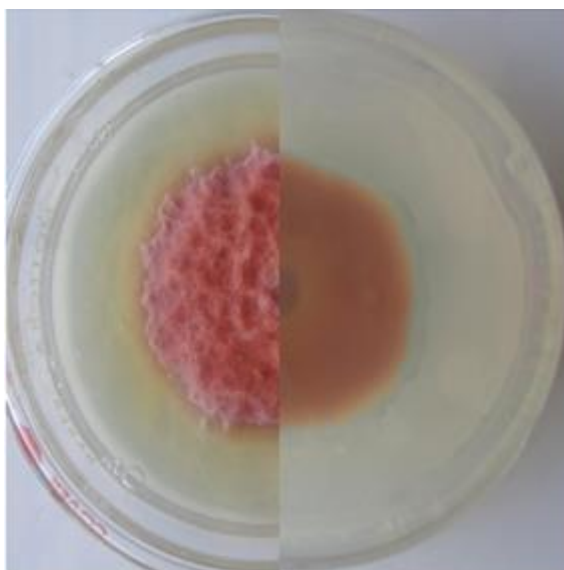


Fig.3.49. Característica del aislamiento *F. oxysporum*, en MIS, *Scl. sinuosum*.

se desarrolló con una tasa de crecimiento micelial de 36.94% diario, en la colonia se aprecia micelio aéreo con pigmento carotenoide (abundante), de textura algodonosa, y tonalidades Rosa (C:20;M:60;Y:45;K:15) en el anverso y marrón-rojizo (C:30; M:75;Y:55;K:40) en el reverso así como escaso micelio vegetativo. El micelio en el anverso tiene una notoria elevación umbilicada y borde irregular-estriado.

j) *Glomus ambisporum*

El aislamiento de *F. oxysporum*, en el medio modificado (PDA+MIN+MIS), se

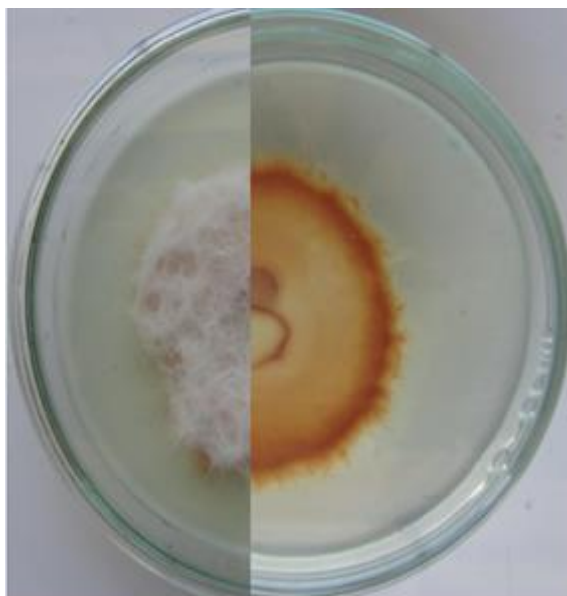


Fig. 3.50. Característica del aislamiento *F. oxysporum*, en MIS, *Gl. ambisporum*.

desarrolló con una tasa de crecimiento micelial de 37.15% diario, en la colonia se aprecia micelio aéreo blanco (escaso), de textura algodonosa en el anverso, y tonalidades, ocre (C:30; M:40; Y:60; K:15) concéntrica y marrón-rojizo oscuro (C:25; M:75; Y:85; K:35), hacia el exterior a manera de halo en el reverso, así como escaso micelio vegetativo. En el anverso el relieve es llano y borde notoriamente estriado e irregular.

Según Avalos, (2013), los metabolitos secundarios propios del *Fusarium oxysporum*, que incluye la síntesis de neuroporaxantina (NX), fusarina, bikaberina y otros apocarotenoides de menor tamaño, coinciden con las rutas metabólicas de los terpenoides; una apreciación visual de los asilamientos *Acaulospora sp. 1*, *Septoglomus constrictum*, *Diversispora spurca*, *Funneliformis mosseae*, *Glomus maculosum*, *Claroideoglomus etunicatum* y *Glomus ambisporum*, sugiere que los metabolitos secundario obtenidos del material filtrado de estos HMA, produce un compuesto antagónico, de características similares a algún agónico, con la capacidad de irrumpir en el metabolismo de los terpenoides; por el contrario el medio de cultivo con los metabolitos inhibitorios solubles procedentes de *Scl. sinuosum*, parecen facilitar dichas rutas metabólicas, produciendo la pigmentación carotenoide desde el día 1 (Fig. 3.51).



Figura 3.51. Crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, en medio PDA+MIN + MIS procedentes de *Scl. sinuosum*

Mientras el aislamiento con MIS procedente de *Acaulospora sp. 2*, parece no generar antagonismo de algún tipo. Así como el asilamiento con MIS procedentes de *Sclerocystis sinuosum*, parece facilitar el metabolismo de los terpenoides.

3.4.3. EFECTO MÁXIMO DE LA ANTIBIOSIS

El estudio in vitro, del desarrollo del hongo patógeno *Fusarium oxysporum*, se realizó hasta apreciar el cese de crecimiento micelial, que ocurrió al noveno día, para todos los aislamientos que presentaron Efecto – antibiosis. En el cuadro 3.11 se presenta el

análisis de varianza para la determinación del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, a partir de este cuadro se realizó el análisis de regresión (ver gráfica 3.10).

Cuadro 3.11. Análisis de varianza, para la determinación del Crecimiento Micelial, del patógeno *Fusarium oxysporum*, en medio PDA + MIN + metabolitos inhibitorios solubles

<i>Fuentes de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F_c</i>	<i>Pr>F_c</i>
<i>Gl. maculosum</i>					
F. lineal	1	1062.738	1062.738	6609.286	< .0001**
F. cuadrática	1	13.832	13.832	86.025	< .0001**
F. cubica	1	9.955	9.955	61.910	< .0001**
Error	20	3.216	0.161		
<i>Scl. sinuosum</i>					
F. lineal	1	992.234	992.234	3742.366	< .0001**
F. cuadrática	1	15.756	15.756	59.425	< .0001**
F. cubica	1	4.562	4.562	17.206	< .0001**
Error	20	5.303	0.265		
<i>Gl. mosseae</i>					
F. lineal	1	1090.698	1090.698	4822.441	< .0001**
F. cuadrática	1	26.544	26.544	117.361	< .0001**
F. cubica	1	6.076	6.076	26.865	< .0001**
Error	20	4.523	0.226		
<i>Gl. ambisporum</i>					
F. lineal	1	884.492	884.492	6979.803	< .0001**
F. cuadrática	1	14.593	14.593	115.157	< .0001**
F. cubica	1	7.468	7.468	58.936	< .0001**
Error	20	2.534	0.127		
<i>D. spurca</i>					
F. lineal	1	1104.421	1104.421	4945.766	< .0001**
F. cuadrática	1	41.858	41.858	187.448	< .0001**
F. cubica	1	3.919	3.919	17.549	< .0001**
Error	20	4.466	0.223		
<i>Cl. etunicatum</i>					
F. lineal	1	972.880	972.880	2932.763	< .0001**
F. cuadrática	1	27.895	27.895	84.091	< .0001**
F. cubica	1	6.282	6.282	18.936	< .0001**
Error	20	6.635	0.332		

<i>Acaulospora sp. 1</i>					
F. lineal	1	1219.753	1219.753	2636.875	< .0001**
F. cuadrática	1	24.907	24.907	53.845	< .0001**
F. cubica	1	8.159	8.159	17.639	< .0001**
Error	20	9.252	0.463		

<i>Sp. constrictum</i>					
F. lineal	1	1133.747	1133.747	2968.651	< .0001**
F. cuadrática	1	39.558	39.558	103.581	< .0001**
F. cubica	1	4.303	4.303	11.268	< .0001**
Error	20	7.638	0.382		

Para una evaluación de nueve días (216 hrs) se justifica el modelo cúbico de regresión con alta significación estadística, para todos los aislamientos, los datos observados y ajustados se pueden apreciar en el gráfico 3.10.

En el gráfico 3.10 se observa la tendencia de crecimiento exponencial del patógeno *Fusarium oxysporum*, en el medio PDA, PDA + MIN y *Acaulospora sp. 2*, que en 7 días (168 horas), a una tasa de crecimiento constante de 49.47%, colonizaron el 100% de los medios de cultivo, no se aprecia efecto antibiosis por los metabolitos extraídos del filtrado del HMA *Acaulospora sp. 2*, ya que el patógeno describió la misma tasa de crecimiento que los testigos. Las ecuaciones que describen el crecimiento micelial en estos tres casos son: PDA, $Y=5.953e0.4031x$; con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9999$; PDA + MIN, $Y=5.9538e0.4031x$; con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9999$ y *Acaulospora sp. 2*, $Y=5.9938e0.4016x$; con un coeficiente de determinación $R^2 = 1$; luego de derivar estas ecuaciones, se determinó que la colonización máxima (100% de la placa), se alcanzó en 6.999, 6.998 y 7.025 días respectivamente, desde el momento de la inoculación.

Las ecuaciones que describen el comportamiento del crecimiento micelial en los ocho morfotipos restantes son: *Glomus maculosum*, $Y=-0.1824x^3+2.5072x^2-1.9296x+7.0574$ y un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9958$; *Sclerocystis sinuosum*, $Y=-0.1528x^3+2.1548x^2-1.1564x+6.7427$ y un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9954$; *Glomus mosseae*, $Y=-0.1808x^3+2.5915x^2-2.6546x+7.2014$ y un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9897$.

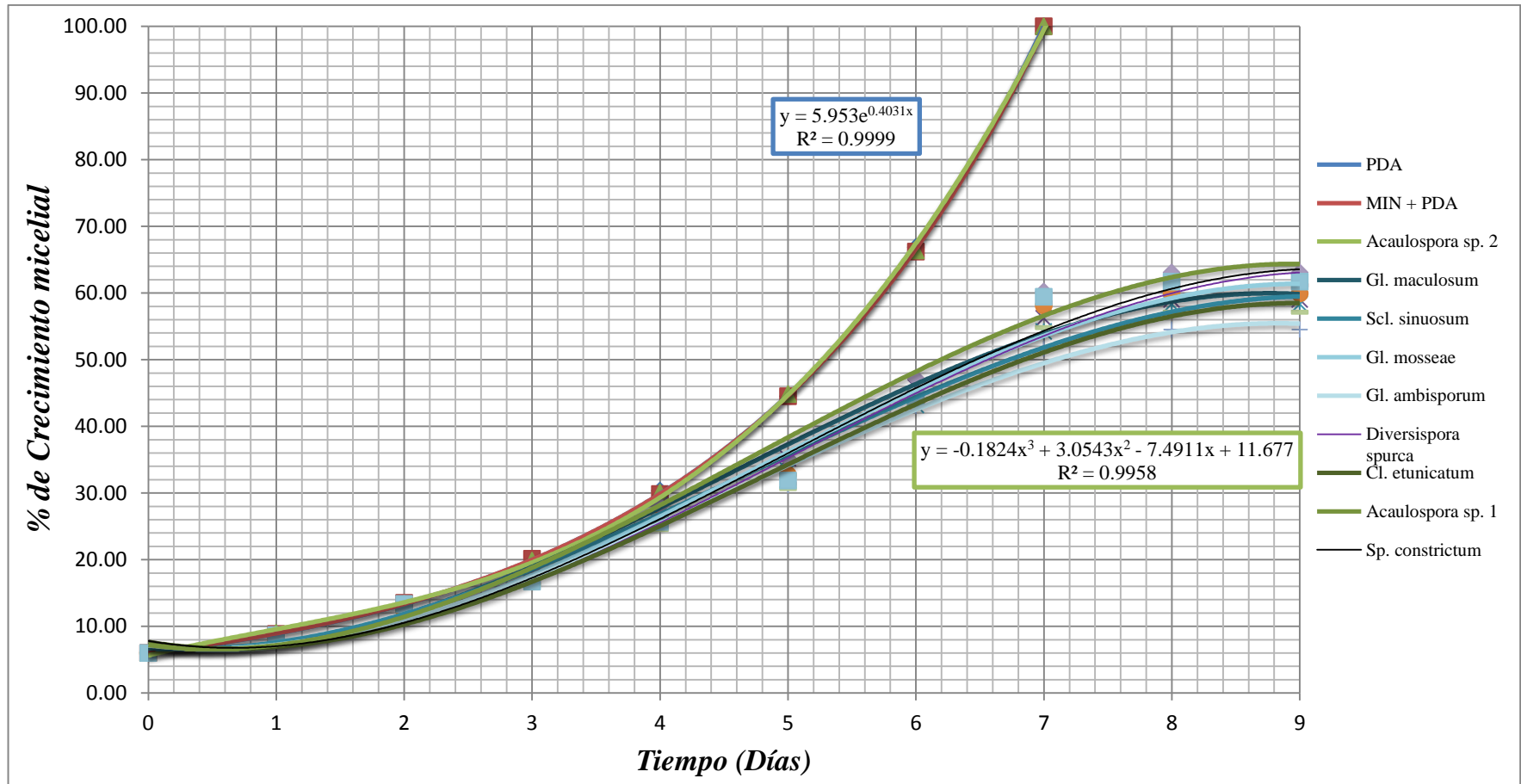


Grafico 3.10. Análisis de regresión para el crecimiento micelial del hongo patógeno *Fusarium oxysporum*, en medio PDA + MIN (Potato Dextrosa Agar + Caldo mínimo en Sales 1:1 v/v), más metabolitos inhibitorios solubles de HMA

Glomus ambisporum, $Y = -0.1669x^3 + 2.3265x^2 - 2.0556x + 7.1212$ y un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9939$; *Diversispora spurca*, $Y = -0.1802x^3 + 2.686x^2 - 3.4419x + 7.8614$ y un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9862$; *Claroideoglomus etunicatum*, $Y = -0.1793x^3 + 2.5901x^2 - 3.1402x + 7.6475$ y un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9896$; *Acaulospora sp. 1*, $Y = -0.1919x^3 + 2.7172x^2 - 2.5615x + 7.2082$ y un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9931$ y *Septoglomus constrictum*, $Y = -0.1831x^3 + 2.7052x^2 - 3.3197x + 7.8329$ y un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9857$.

Al derivar estas ecuaciones, se determinó la colonización máxima posible del patógeno *Fusarium oxysporum*, para cada uno de los medios de cultivo, siendo así: *Glomus maculosum* a los 8.761 días alcanzaría un máximo de colonización micelial de 59.937% de la placa; *Sclerocystis sinuosum* a los 9.125 días alcanzaría un máximo de colonización micelial de 59.515% de la placa; *Glomus mosseae* a los 9.013 días alcanzaría un máximo de colonización micelial de 61.419% de la placa; *Glomus ambisporum* a los 8.828 días alcanzaría un máximo de colonización micelial de 55.460% de la placa; *Diversispora spurca* a los 9.249 días alcanzaría un máximo de colonización micelial de 63.225% de la placa; *Claroideoglomus etunicatum* a los 8.98 días alcanzaría un máximo de colonización micelial de 58.475% de la placa; *Acaulospora sp. 1* a los 8.942 días alcanzaría un máximo de colonización micelial de 64.361% de la placa de Petri, y *Septoglomus constrictum* a los 9.193 días alcanzaría una colonización micelial de 63.682% de la placa. En el Gráfico 3.10 y de derivar los modelos cúbicos de regresión, se apreciar el efecto máximo de los metabolitos inhibitorios solubles, y se compara en el cuadro 3.12.

Cuadro 3.12. ANVA adicional para el Valor máximo de respuesta, para la inhibición micelial de los aislamientos de HMA sobre el patógeno *Fusarium oxysporum*

<i>Fuentes de variación</i>	<i>G.L</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr > Fc</i>
Tratamientos	7	178.703	25.529	2.7E+30	< .0001**
Error	16	1.51E-28	9.46E-30		
Total	23	178.703			

C.V = 0.01%

Se presenta el análisis de varianza para para el Valor máximo de respuesta, para la inhibición micelial, resultando con una alta significación estadística entre los metabolitos inhibitorios extraídos de los especímenes aislados, por lo que se procedió a realizar el análisis de Tukey (0.05) (ver gráfico 3.11).

En el gráfico 3.11 se observa que existen cinco grupos de similitud sin diferencia estadística entre ellos, para el Valor Máximo de Respuesta, para la inhibición micelial del patógeno *Fusarium oxysporum*.

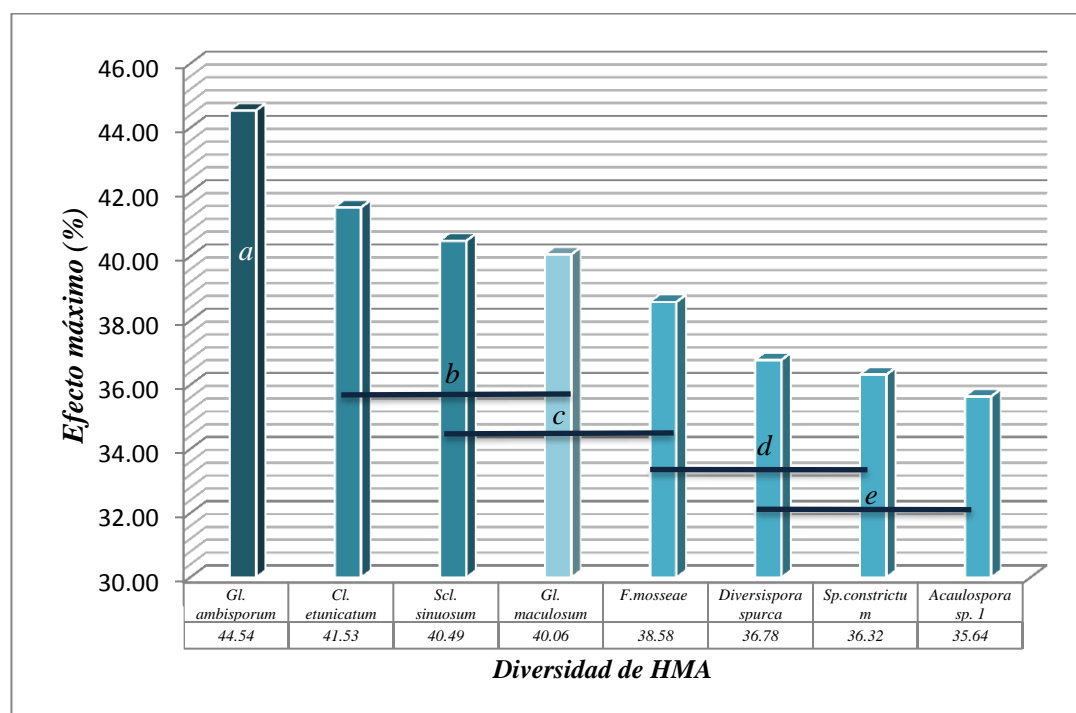


Gráfico 3.11. Prueba de Tukey (0.05) para el Valor máximo de respuesta, para inhibición micelial de los HMA sobre *Fusarium oxysporum*

El máximo valor corresponde al HMA *Gl. ambisporum*, con un 44.54% de inhibición micelial, el segundo grupo de similitud corresponde al HMA *Cl. Etunicatum*, con un 41.53% de inhibición micelial, el tercer grupo de similitud corresponde a los HMA *Scl. sinuosum*, y *Gl. maculosum* con un 40.49% y 40.06% de inhibición micelial, el cuarto grupo de similitud corresponde al HMA *Gl. mosseae*, con un 38.58% de inhibición micelial, el último grupo de similitud corresponde a los HMA *D. spurca*, *Septogloumus constrictum* y *Acaulospora sp. 1*, con 36.78, 36.32 y 35.64% de inhibición micelial respectivamente.

Cuadro 3.13. Resumen del Efecto máximo de respuesta

	Tiempo (días)	% Crecimiento Micelial	% Inhibición Micelial
<i>Gl. ambisporum</i>	8.828	55.5	44.54
<i>Cl. etunicatum</i>	8.980	58.5	41.53
<i>Scl. sinuosum</i>	9.125	59.5	40.49
<i>Gl. maculosum</i>	8.761	59.9	40.06
<i>Gl. mosseae</i>	9.013	61.4	38.58
<i>Diversispora spurca</i>	9.249	63.2	36.78
<i>Sp. constrictum</i>	9.193	63.7	36.32
<i>Acaulospora sp. 1</i>	8.942	64.4	35.64

Fernández y Suarez, (2009), en su trabajo “Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht. F en Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. Flavicarpa), del municipio zona bananera Colombia”, indica que in vitro, *Trichoderma spp.* mediante el mecanismo de antibiosis, inhibe al *Fusarium oxysporum*, en más del 50%. Mohandas et al., (2010) citado por Alejandro, (2011) en su trabajo “Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.* una revisión”, menciona que mediante el mecanismo de antagonismo-antibiosis, los géneros *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas fluorescens*, producen metabolitos secundarios, inhibitorios para *Fusarium oxysporum*, con un efecto superior al 60% de inhibición, el efecto máximo calculado para los metabolitos inhibitorios solubles de los aislamientos de HMA en el presente trabajo, se encuentran entre 44.54% y 35.64% (*Gl. ambisporum* y *Acaulospora sp. 1*, respectivamente).

Siddiqui y Akhtar, (2008), Oyekanmi et al., (2007), citados por Alejandro, (2011), menciona que no se han aislado ni observado un comportamiento antagónico-antibiosis, por parte de las HMA, siendo la relación patógeno/HMA de forma indirecta, esto último es afirmado por Franco, N. (s.f.) y Newsham et al. (1995); Sin embargo la extracción de metabolitos solubles a partir de los HMA, en el caldo

mínimo en sales, presentaron el efecto-antibiosis, ralentizando la tasa de crecimiento micelial así como una anticipada fase estacional de los aislamientos del hongo patógeno *Fusarium oxysporum*; como lo ha demostrado Guillermo, (2002) y Fernández et al., (2002), quienes emplean el medio MIN, como medio de desarrollo y pre-germinación para especies de HMA, así como Bailey et al., (2008) quien demostró que este medio no se muestra tóxico para el género *Fusarium*, y los controles del estudio permitieron un desarrollo dentro de los parámetros normales propios para este patógeno in vitro, queda señalar que se extrajeron metabolitos inhibitorios solubles a partir de los aislamientos de HMA *Gl. ambisporum*, *Cl. etunicatum*, *Scl. sinuosum*, *Gl. maculosum*, *Gl. mosseae*, *Diversispora spurca*, *Sp. constrictum* y *Acaulospora sp. 1*, por lo cual ahora se suma la antibiosis como un mecanismo de antagonismo directo propio de los hongos micorrízicos arbusculares.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

De acuerdo a la información obtenida a través de este estudio, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. La densidad poblacional de esporas de HMA, fue mayor en la época seca del año en comparación a la época de lluvias, para una muestra estándar de 100g de suelo. Se determinó 3164, 2393 y 1421 esporas (para la época seca) y 334, 262 y 152 esporas (para la época de lluvia), en “El Centro experimental Canaán”, “El fundo Wayllapampa” y “Comunidad de Luyanta”, respectivamente.
2. Se identificaron 9 especies de HMA entre las tres zonas de estudio, esta diversidad de especies micorrízicas son: Glomeraceae; *F. mosseae*^{wc}, *Gl. ambisporum*^{wcl}, *Gl. maculosum*^w, *Scl. sinuosum*^{wcl} y *Sp. constrictum*^{wcl}; Claroideoglomeraceae; *Cl. etunicatum*^{cl}; Diversispora; *D. spurca*^{wc}; y Acaulosporaceae; *Acaulospora* sp. 1^{wcl} y *Acaulospora* sp. 2^{wc}, (w: fundo Wayllapampa, c: C.E. Canaán, l: C. Luyanta).
3. El porcentaje de colonización por los HMA, se determinó entre 13.0% (*Sclerocystis sinuosum*) a 80.5% (*Septogloimus constrictum*), las estructuras que predominan son hifas y arbuscúlos; mientras que la colonización que incluye vesículas es condicional a los especímenes; *Zea mays* L. amiláceo, es susceptible a la colonización de HMA, *Septogloimus constrictum*, *Claroideogloimus etunicatum*, *Diversispora spurca*, *Glomus mosseae*, *Glomus*

ambisporum, y *Glomus maculosum*, (micorrización de 30 a 90%); y posee una baja susceptibilidad a los HMA, *Acaulospora sp 2*, *Acaulospora sp 1*, y *Sclerocystis sinuosum* (micorrización menor al 30%).

4. Con respecto a la capacidad antagónica por medio de antibiosis de los HMA frente a *Fusarium oxysporum*, se concluye:

- Los metabolitos extraídos de las especies *Glomus ambisporum*, *Sclerocystis sinuosum*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Glomus maculosum*, *Glomus mosseae*, *Diversispora spurca*, *Septoglomus constrictum* y *Acaulospora sp. 1*, mostraron efectos inhibitorios en el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, con valores que van de 48.38% a 39.80%, para un periodo de 7 días, mientras que *Acaulospora sp.2*, no muestra efecto antagónico para este patógeno.
- Las especies antes mencionadas, que presentaron el “efecto antibiosis”, mediante los metabolitos inhibitorios solubles extraídos de ellos, ralentizaron el crecimiento micelial del *F. oxysporum*, obteniendo tasas de crecimiento que van de 36.0% (*Gl. ambisporum*) a 39.0% (*Acaulospora sp. 1*), induciendo al patógeno a una fase estacional a partir del séptimo día.
- El micelio del patógeno *F. oxysporum*, en los medios de cultivo con metabolitos inhibitorios solubles, que presentaron el efecto antibiosis, describe un crecimiento logístico, donde el efecto máximo se logra a partir de los metabolitos obtenidos del HMA *Gl. ambisporum*, con 44.54% de inhibición micelial, mientras que los MIS procedentes de *Gl. maculosum*, son los más potentes con una respuesta a los 8.761 días y un efecto máximo de 40.06% de inhibición micelial.

4.2 RECOMENDACIONES

De acuerdo a las conclusiones, se plantea las siguientes recomendaciones:

1. Para un estudio referido a la diversidad y densidad poblacional de esporas de hongos formadores de micorrizas arbusculares, la época seca, sería la indicada para obtener esta fuente de inóculo.
2. Continuar investigaciones empleando esporas cuya relación con el hospedero permita una colonización mayor al 30%, de este modo se recomienda emplear fertilización nitrogenada, en la menor concentración posible para no generar falsa micorrización.
3. Se recomienda continuar con las investigaciones, identificando especies de HMA autóctonos de cada zona, y simbioses para otros cultivos de interés agrícola, a fin de recuperar o incrementar la biodiversidad de HMA.
4. Se recomienda realizar un análisis más profundo sobre los metabolitos secundarios obtenidos a partir de los HMA, para identificar sus mecanismos antagónicos de manera más concreta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.I. & HAYASHI, H. 2005.** Plant sesquiterpenes induce Hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*.
- **AKHTAR, M.S. & SIDDIQUI, Z.A. 2008.** Biocontrol of root-rot disease complex of chickpea by *Glomus intraradices*, *Rhizobium sp.* and *Pseudomonas straita*. *Crop Prot.* 27. Pp 410 – 417.
- **ALEJANDRO, M.C. 2011.** Interaccion de Microorganismos Beneficos en Plantas: Micorrizas, *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.* Una revisión. *Rev U. D. C.A. Act. & Div. Cient.* 14. pp 15-31.
- **ALLEN, E. B. 1991.** Impacts of early-and late-seral mycorrhizae during restoration in seasonal tropical forest Mexico. *Ecol. App.* 13. Pp 1701-1717.
- **ALLEN, B.E.; ALLEN, M.F.; HELM, D.J.; TRAPPE, J.M.; MOLINA, R. & RINCON, E. 1995.** Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil* 170. pp 47-62.
- **ALLEN, E. B. 2006.** Infuence of Vesicular arbuscular mycorrhizal on wáter movement trough *Boutelowa gracilis*. *New Phytol.*

- **ALEXANDER, D.E. 1988.** Breeding special nutritional and industrial maize types. In G.F. Sprague & J.W. Dudley, eds. *Corn and corn improvement*, 3rd ed., p. 869-880. Madison, WI, USA, American Society of Agronomy.
- **ALEXOPOULOS, C.J. & MIMS, W.C. 2000.** Introducción a la Micología. Omega. Barcelona España.
- **ALFONSO, E. 2011.** Análisis espacio-temporal de Morfotipos de esporas de micorrizas vesículo arbusculares en la rizosfera de *Ceiba aesculifolia*. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales – Maestría en Recursos Bióticos. Querétaro, México. 2011.
- **ÁLVAREZ-SÁNCHEZ & RAMOS, Z. 2004.** Micorrizas: Una gran Unión debajo del Suelo. Revista digital Universitaria. Vol 13 (7). Disponible en <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/art72.pdf> Accesado, 16 enero 2017.
- **ANTONIOLLI, Z. 1999.** Arbuscular mycorrhizal community in a permanent pasture and development of species primers for detection and quantification of two AM fungi. The university of Adelaide.
- **ARIAS, J. K. & JEREZ, A. 2008.** Atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos Fitopatógenos de Interés en especies cultivadas, Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 30,78,112.
- **AUGÉ, R.M. 2000.** Water relations, drought and vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza.
- **AUGÉ, R.M. 2001.** Water realtions, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza vol. 11. Pp 3-42.
- **AVALOS, J; LIMÓN, C.; DÍAZ-SANCHEZ, V; CASTRILLO, M. & RUGER, M. 2013.** Regulación del metabolismo secundario de hongos,

Universidad de Sevilla, Departamento de Genética. Disponible en <http://micelio.weebly.com/grupo-de-fusarium.html>, Accesado, 15 enero, 2017.

- **AZCÓN-AGUILAR, C. & BAREA, J.M. 1996.** Avances recientes en el estudio de las micorrizas V-A, Formación, funcionamiento y efectos en la nutrición vegetal.
- **BACON, C.W. 1989.** Biological control Of *Fusarium moniliforme* in maize. Environ. Health persp.
- **BAGO, B.; AZCON-AGUILAR, C. & PICHE. 1998.** Architecture and development dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, grown under monoxenic conditions. Mycologia 90. Pp 1-54.
- **BAILEY, B.A.; BAE, M.D.; STREM, J.; CROZIER, S.E.; THOMAS, G.J.; SAMUELS, B.T.; VINYARD, & HOLMES, K.A. 2008.** Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic isolates with biological control potential in *Zea mays*. Article in Press. Biological Control. 46. Pp 24-35
- **BECKER, W.N. & GERDEMANN, J.W. 1977.** *Glomus etunicatus* sp. nov. Mycotaxon pp.29-32.
- **BENTIVENGA, S.P. & MORTON J.B. 1995.** A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters. Mycologia 87. pp 719-731.
- **BERNAL, A.; ANDREU, C. & MOYA, M. 2004.** Utilización de *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* (EF Smith) Snyder & Hans. Cuba. (Accesado: 22 agosto 2016). Disponible en: [http://www.virtualcentr.org/es/enlIBTJ %20Tallr/bernalalezander.htm](http://www.virtualcentr.org/es/enlIBTJ%20Tallr/bernalalezander.htm)

- **BEVER, J.D.; MORTON, J.B.; ANTONOVICS, J. & SCHULTZ, P.A. 1996.** Host- dependent sporulation and species diversity of arbuscular fungi in a mown grassland. *J. Ecol.*
- **BEVER, J.D.; SCHULTZ, P.A.; PRINGLE, A. & MORTON, J.B. 2001.** Arbuscular Mycorrhizal Fungi: More Diverse than Meets the Eye, and the Ecological tale of Why the High Diversity of Ecological distinct species of arbuscular mycorrhizal fungi within an single community implications for plant ecology. *BioSci.* 51. Pp 923-932.
- **BLASZKOWSKI, J.; TADYCH, M. & MADEJ, T. 2001.** *Glomus arenarium*, a new species in Glomales (Zygomycetes). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 70: 97-101.
- **BLASZKOWSKI, J. 2016.** “Department of Plant Pathology of the Agricultural University of Szczecin, Poland”, Disponible en <http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/index.html>. Accesado 10 diciembre 2016.
- **BOLAN, G. & ABBOTT, L.K. 1983.** Early vesicular arbuscular mycorrhizal colonization in soil collected from an annual clover based, pasture in a mediterranean environment: Soil temperature and timing of autumn rains. *Aust. J. Agric.*
- **BONFANTE-FASOLO, P.; GENRE, A. & BIANCIOTTO, V. 2004.** “The Colonization Strategies of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: An Overview of their Cellular Interactions with Plants and Bacteria”, en: Frias-Hernandez J. T.; V. Olalde- Portugal; R. Ferrera-Cerrato (Eds.). *Avance en el conocimiento de la biología de las micorrizas*. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

- **BOWEN, G.D. 1987.** Endogone strain and host plant differences in development of vesicular- arbuscular mycorrhizas. In *Endomycorrhizas*. Academia Press. London.
- **BRUNDRETT, A.J.P. 1995.** Absence of nuclear DNA sybthesis in vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *New Phytol.*
- **BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T. & MALAJCZUK, N. 1996.** Woring whit mycorrhizas in forestry and agricultura. ACIAR Monograph, Canberra. Australia.
- **BRUNS, V.; CAMARGO-RICALDE, S. & JOHNSON, N. 2002.** Ecological Aspects Of Mycorrhizal Symbiosis: With Special Emphasis On The Functional Diversity Of Interactions Involving The Extraradical Mycelium. *Journal Of Experimental Botany*, 59. pp1115-1126.
- **CABRERIZO, C. 2012.** “El maíz en la alimentación Humana”. Disponible en: www.infoagro.com. Accesado: Diciembre 01, 2016.
- **CAMPBELL, R. 1989.** Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. Cambridge. p 218.
- **CAREY,E.V.; MARLER, M.J. & CALLAWAY. 2004.** Mycorrhizae transfer carbón from a native grass to an invasive weed:evidence from stable isotopes and physiology. *PI Ecol.* 172. Pp 133-141.
- **CHEN, X.; TANG, J.; ZHI, G. & HU, S. 2005.** Arbuscular mycorrhizal colonization and acquisitions of plants: Effect of coexisting plant species. *App. Soil Ecol.* 28. Pp 259-269.

- **CIAT, 1983.** Proyecto Micorriza, Manual de Métodos para la Investigación de la Micorriza Vesículo Arbuscular en el Laboratorio. Ewald Sieverding, Cali, Colombia. 1983.
- **CISNEROS, L.M.E. 2004.** *Fusarium oxysporum* (Sacc) Nirenberg en híbridos y progenitores de Maíz (*Zea mays*). Tesis de maestría. Colegio de Posgraduados. Montecillos, Texcoco, Edo de México.
- **CLAPP, J.P.; HELGASON, T.; DANIELL, T. & YOUNG, J. P. W. 2002.** Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. In *Mycorrhizal Ecology*. Eds MGA van der Heijden and IR Sanders pp. 202–224. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- **COLLINS, N.; ROELAND, N.D.; CORKIDI, L.; EGERTON-WABURTON & ALLEN, E.B. 2003.** Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grassland Ecol. 84. Pp 1895-1908.
- **COOK, J.R. & BAKER, K.F. 1983.** The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota. p 539.
- **CORWELL, W.; BEDFORD, B. & CHAPIN, C. 2001.** Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in a phosphorus poor wetland and mycorrhizal response to phosphorus fertilization. *American Journal of Botany*.
- **DANIELS, B. A. & SKIPPER, H. D. 1982.** Methods of recovery and quantitative estimation of propagules from soil. Pp. 29-35. In. *Methods and principles of mycorrhizal research*. Ed., N. C. Schenck. *American Phytopathological Society*, St. Paul, Minnesota.
- **DEHNE, H. W. 1982.** Interaction between vesicular arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72. Pp 1115-1118.

- **EGERTON-WARBURTON, L. M. & ALLEN, E. B. 2000.** Shifts in arbuscular mycorrhizal communities along an anthropogenic nitrogen deposition gradient. *Ecological Applications* 10: 484-496.
- **EGERTON-WARBURTON, L.M.; GRAHAM, R.C.; ALLEN, E.D. & ALLEN, M.F. 2001.** Reconstrucción of the historical changes in micorrhizal fungal communities under anthropogenic nitrogen deposition Proc. Soc. Lond. 268. Pp 2479-4284.
- **FAO. 2016.** Depósito de Documentos de la Fao. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/> Accesado, 1 enero 2017.
- **FAGGIOLI, V.; FREYTES, G. & GALARZA, C. (S.F.).** Micorrización natural del maíz y su relación con la absorción del fósforo del suelo en diferentes sistemas de labranzas y fertilización. Biología de Suelos. INTA EEA Marcos Juárez, Instituto de Ciencias Básicas Aplicadas, UNVM, Córdoba. Disponible en <http://inta.gov.ar/documentos/micorrizacion-natural-de-maiz-y-su-relacion-con-la-absorcion-de-fosforo-del-suelo-en-diferentes-sistemas-de-labranzas-y-fertilizacion>. Accesado 05 de marzo, 2017.
- **FERNÁNDEZ, R. & SUAREZ, C. 2009.** “Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht. F en Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. Flavicarpa), del municipio zona bananera Colombia”. Rev. Fac. Nal.Agr. Medellín 62(1). Pp 4743-4748.
- **FERNANDEZ, K.; FERNANDES, F.; GONZALES, M.; PEREZ, E.; MARIBAL, L. & PAZOS, M. 2002.** Micorrización *In Vitro* de plántulas de *Coffea canephora* Var. Robusta: ¿Una realidad?. Cultivos Tropicales, Vol. 23(3). Pp 47-52.
- **FERRERA-CERRATO, R. & ALARCÓN, A. 2007.** Microbiología agrícola. Editorial Trillas. México, D. F.

- **FIGUEROA-RIVERA, M.G.; RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; GUERRERO-AGUILAR, B.Z.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.M.; PONS-HERNÁNDEZ, J.L.; JIMÉNEZ-BREMONT, J.F.; RAMÍREZ-PIMENTEL, J.G.; ANDRIO-ENRÍQUEZ, E. & MENDOZA-ELOS, M. 2010.** Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28. Pp 124-134.
- **FINCH, H.C. & FINCH, A.N. 1983.** Los Hongos Comunes que Atacan Cultivos en América Latina. Trillas.
- **FRANCIS, R. & READ, D.J. 1984.** Direct transfer of carbón between plants connected by vesicular arbuscular mycorrhizal mycelium. *Nature*. 307. Pp 53-56.
- **FRANCO, N. (S.F).** Efectos Beneficiosos de las Micorrizas sobre las plantas. Universidad de Sevilla. Disponible en http://www.bioscripts.net/col/Apuntes/Nutricion_Vegetal/Trabajo_de_nutricion_vegetal.pdf. Accesado, 03 de marzo 2017.
- **FRANKEN, P.; DONGES, K.; GRUNWALD, U.; KOST, G.; REXER, K.H.; TAMASLOUKH, M.; WASCHKE, A. & ZEUSKE, D. 2007.** Gene expression analysis of arbuscule development and functioning *Phytochem*. 68. Pp 68-74.
- **FREDIS, E.; ALEXANDER, P.; ADER, N. & ROBERTO, J. 2014.** Diversidad de Géneros de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a pastos colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en suelos compactados y no compactados del municipio de San Marcos, departamento de Sucre. Memorias del II seminario de Ciencias Ambientales Sue-Caribe & VII Seminario Internacional de Gestión Ambiental, 2014.
- **GERDEMANN, J.W. 1975.** Vesicular arbuscular mycorrhize. In “The Development and Function of Roots”. Academic Press, London. Pp 575-591.

- **GERDEMANN, J.W. 1989.** VesicularArbuscular mycorrhiza and plant growth. *Ann. Rev. Phytopathol.* 6. Pp 397-418.
- **GERDEMANN, J. W. & BAKSHI, B. K. 1976.** Endogonaceae of India: two new species.*Transactions of the British Mycological Society* pp. 340-343.
- **GERDEMANN, J. W. & NICOLSON, T. H. 1963.** Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transaction of the British Mycological Society* 46. pp 235-244.
- **GIANINAZZI- PEARSON, V.; SEJALONS-DELMAS, N.; GENRE, A. & JEANDROZS, S. 1994.** Plants and arbuscular Mycorrhizal Fungi: Cues and Comunnication in the early steps of Symbiotic Interactions. *Ad. In Bot.* 46. Pp 181-219.
- **GILDON, A. & TINKER, P.B. 1983.** Interactions of Vesicular .arbuscular mycorrhizal infections and heavy metls in plant. *New Phytol.* 95. Pp 263-268.
- **GOSLING, P.; HODGE, A.; GOODLASS, G. & BENDING, G.D. 2006.** Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming *Agric. Ecosyst. Environ.* 113:17-35.
- **GONZÁLEZ, H.A.; VÁZQUEZ, G.L.; SAHAGÚN, C.J.; RODRÍGUEZ, P.J. & PÉREZ, L.D.J. 2007.** Rendimiento del maíz de temporal y su relación con la pudrición de mazorca. *Agricultura Técnica en México.*
- **GORANSSON, P.; OLSSON, P.A.; POSTMA, J. & FALKENGREN GREUP, U. 2008.** Colonization by arbuscular micorrhizal and fine endophytic fungo four Woodland grasses-variation in relation to pH and Aluminium. *SOil Biol. And Biochem.*

- **GRAY, L. & GERDEMANN, J. 1973.** Uptake of Phosphorus 32 by vesicular arbuscular mycorrhizae. *Plant Soil* 39. Pp 687-689.
- **GUADARRAMA, P. & ÁLVAREZ,-SANCHEZ, J. 1999.** Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores in different environments in a tropical rain forest, Veracruz, Mexico. *Mycorrhiza* 8. Pp 267-270.
- **GUILLERMO, R. 2002.** Inducción del enraizamiento en *Agave salmiana* Otto, con *Agrobacterium rhizogenes* y colonización de raíces transformadas por *Glomus intraradices*. Universidad de Colima. Tesis Doctoral, Área Biotecnología, Tecoman, Col. Octubre de 2002.
- **HARLEY, 1971.** Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13.
- **HARLEY, J. L. & HARLEY, E.L. 1987.** A Check-List of Mycorrhiza in the British Flora. *New Phytologist*, Vol. 105, No. 2, A Check-List of Mycorrhiza in the British Flora.
- **HARLEY & SMITH, 1983.** *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press London.
- **HARRIER, L.A. & WATSON, C.A. 2004.** The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) Fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Manag. Sci.* 60. Pp 149-157.
- **HARRISON, M.J. 1997.** *The Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press Inc. England.
- **HART, M.M.; READER, R.J. & KLIRONOMOS, J.N. 2003.** Plant coexistence mediated by arbuscular mycorrhizal fungi. *Trends in Ecol & Evol.* 18. Pp 418-423.

- **HAWKES, C.V.; HARTLEY, I.P.; INESON, P. & FITTER, A.H. 2008.** Soil temperature affects carbón allocation withisn arbuscular mycorrhizal network and carbón trnasport from plant to fungus. *Golb. Chan. Biología*. 14. Pp 1181-1190.
- **HAWKINS, H.J.; JHANSEN, A. & GEORGE, E. 2000.** Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and soil*. 226. Pp 275-285.
- **HE, X. H.; CRITCHEY, C. & BLEDSOE, C. 2003.** Nitrogen Transfer Within and Between plants Through Common Mycorrhizal Networks (CMNs). *Crit. Rev. In Pl. Sci*. 22. Pp 531-567.
- **HERIBERTO, M. 2012.** Diversidad de Hongos micorrízicos arbusculares asociados al cedro rojo (*Cedrela odorata L.*) en dos ecosistemas tropicales de Veracruz, México. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Forestales.
- **HONRUBIA, M. 1992.** Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. ICONA. MAPA. LUCDEME VIII. Monografía 54. Madrid.
- **HUSBAND, R.; HERRE, E. A. & YOUNG, J. P. 2002.** Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonizing seedlings in a tropical forest. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 131-136.
- **IBÁÑEZ, R. & AGUIRRE, G. 1983.** Fertilidad de suelos: Manual de prácticas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, UNSCH, Ayacucho. p 136.
- **INFOAGRO. 2012.** “El cultivo del maíz”. Disponible en: www.infoagro.com/herbaceos/cereales/maiz.asp. Accesado: Junio 05- 2016.
- **INVAM, 2016.** “International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi”, disponible en <http://invam.wvu.edu/> Accesado: julio 08. 2016.

- **JAKOBSEN, I. & ROSENDAHL, L. 1990.** Carbon flow into soil and external Hyphae from roots mycorrhizal cucumber plants. *New Phytol.* 115. Pp 77-83.
- **JANICK, J. 1962.** Inbreeding depression and heterosis. In: *Genetics and exploitation of heterosis in Crops.* Editors. J.Coors and S. Pandey, páginas 319-333. American Society of Agronomy, EEUU.
- **JONES, J.B. 2005.** *Hydroponic: a practical guide for the soilless grower.* 2nd ed. USA. CRC Press. Pp 41-43.
- **KAPOOR, R.; SHARMA, D. & BHATNAGAR, A.K. 2008.** Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturae.* 116. Pp 227-239.
- **KEDERA, C.J. 1994.** Genetic diversity of *Fusarium* section *Liseola* (*Giglerella fujikuroi*), in individual maize stalk. *Phytopathology.*
- **KLINDRONOMOS, J.N.; MCCUNE, J.; HART, M. & NEVILLE, J. 2001.** The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecol. Let.* 3. Pp 137-141.
- **KRAMADIBRATA, K.; WALKER, C.; SCHWARZOTT, D. & SCHÜBLER, A. 2000.** A new species of *Scutellospora* with a coiled germination shield. *Ann. Bot.* 86. pp 21-27.
- **LEIGHT, J.; HODGE, A. & FITTER, A.H. 2008.** Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytol.* 181. Pp 199-207.
- **LERAT, S.; GAUCI J.G.; GATFORD, H.; H. VIERHEILIG.; PICHÉ, Y. & L. LAPOINTE. 2002.** C^{14} Transfer between the spring ephemeral *Erythronium*

americanum and sugar maple sapling via arbuscular mycorrhizal fungi in natural stand. *Oecol.* 132. Pp 181-187.

- **LIU, A.; HAMEL, C.; HAMILTON, R.I.; MA, B.L. & SMITH, D.L. 2000.** Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.), grown in soil at different P and micronutrient levels. *Mycorrhiza*. 9. Pp 331-336.

- **LOPEZ-SANCHEZ, M. E.; DÍAZ, G. & HONRUBIA, M. 1992.** Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and P addition on growth and P nutrition of *Anthyllis cytisoides* L. and *Brachypodium retusum*.

- **LOVELOCK, C.; ANDERSEN, K.; & MORTON. J. 2003.** Arbuscular mycorrhizal communities in tropical forest are affected by host tree species and environments. *Ecol.* 135. Pp 268-279.

- **MANGAN, S. A. & G. H. ADLER. 2002.** Seasonal dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi by spiny rates in a neotropical forest. *Oecologia* 131. pp 587-597.

- **MANUAL AGROPECUARIO. 2001.** “Cultivo de maíz”. 3ra Edición. Editorial Idea Books. Barcelona-España.

- **MENDOZA, E.M.; LÓPEZ, B.A.O.; OYERVIDES, G.A.; MARTÍNEZ, Z.G.; DE LEÓN, C. & MORENO, M.E. 2003.** Herencia genética y citoplásmica de la resistencia a la pudrición de la mazorca de maíz (*Zea mays* L.) causada por *Fusarium moniliforme* Sheld. *Revista Mexicana de Fitopatología*.

- **MERRYWEATHER, J. W & FITTER, A. H. 1991.** A modified method for elucidating the structure of the fungal partner in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Mycological Research* 95. pp 1435-1437.

- **MICROSCOPIA (s.f.).** Disponible en <http://files.ariel-biologia.es/200000137-1163a125de/1%20Microscop%C3%ADa.pdf>. Webnode .es/200000137-1163a125de/1%20Microscop%C3%ADa.pdf. Accesado 25 marzo de 2017.
- **MILLER & WALKER. 1986.** *Glomus maculosum* sp nov. Endogonaceae and Endomycorrhizal Fungus:. *Mycotaxon* vol. 25, (1). pp 217-227.
- **MIRANSARI, M.; BAHRAMI, H.A.; REJALI, F. & MALAKOUTI, M.J. 2009.** Effects of soil compaction and arbuscular mycorrhiza on corn (*Zea mays* (L.) nutrient uptake. *Soil & Tillage Research*.
- **MOHANDAS, S.; MANJULA, R.; RAWAL, R.D.; LAKSHMIKANTHA, H.C.; CHAKRABORTY, S. & RAMACHANDRA, Y.L. 2010.** Evaluation of arbuscular mycorrhiza and other biocontrol agents in managing *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* infection in banana cv. Neypoovan. *Biocontrol Sci. Techn.* 20(2). Pp 165-181.
- **MORALES-RODRÍGUEZ, I.; YAÑEZ-MORALES, M.J.; SILVA-ROJAS, H.V.; GARCÍA-SANTOS G. & GUZMÁN-PEÑA, D.A. 2007.** Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia*.
- **MORENO, C. E. 2001.** Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tesis SEA, vol 1. Zaragoza, p 84 .
- **MOREIRA, M; BARETTA, D.; TSAI, S.; BRAN, E. & CARDOSO, N. 2006.** Spore density and root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in preserved or disturbed *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Ecosystems. Sci. Agric.* Vol. 63(4).

- **MOREIRA, M.; TSAI, S. M. & CARDOSO, N. 2007.** Spore density and root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in preserved or disturbed *Araucaria angustifolia* (Bert), O. Ktze. *Ecosystes. Sci.* Vol. 64.
- **MORTON, J.B. 1988.** Germ plasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development documentation, and Storage. *Mycotaxon*.
- **MORTON, J.B. 1990.** Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). Their role in macro and microevolutionary processes. *Mycotaxon* 37. Pp 493-515.
- **MORTON, J.B. 1992,** 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* 15. pp 44 - 50.
- **MORTON, J. B. 2002.** Germoplasm in the International Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon*. 48: 51-528.
- **MORTON, J. B. 2016.** International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. West Virginia University. Disponible en <http://invam.wvu.edu/>. Accesado: diciembre, 05 – 2016.
- **MORTON, J.B. & BENNY, L. 1990.** Morton, J.B. and Benny, G.L. 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. Pp 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. pp 181-195.
- **MOSSE, B. 1968.** The establishment of vesicular arbuscular mycorrhiza under aseptic condition J. Gen Microbiol 27. Pp 509-520.
- **MOSSE, B.; STRIBLEY, D. & LE TACON, F. 1981.** Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. *Advances in Microbial Ecology*. 5, pp. 137-210.
- **MOSSE, B. & TRAPPER J.M. 1981.** Fructifications associated with mycorrhizal stawberry roots, *Nature*. 43.
- **MURILLO, I. 1999.** Citology of infections of Maize seedengs by *Fusarium verticillioides* and immunolocalization of the pathogenesis.related PRms Protein. *Phytopathology*.
- **NEWSHAM, K.; FITTER, A.; & WATKINSON, A. 1995.** Hyphal contribution to wáter uptake in mycorrhizal plants as effected by the fingal species and wáter status. *Physiologia Plantarum* 95(3), pp. 472-478.
- **OEHL, F. & E. SIEVERDING. 2004.** *Pacispora*, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany* 78. pp 72-82.
- **OYEKANMI, E.O.; COYNE, D.L.; FAGADE, O.E. & OSONUBI, O. 2007.** Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes throughthe application of *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. *Crop Prot.* 26. Pp 1006-1012.

- **PANTONE® PROCESS COLOR SYSTEM GUIDE CMYK. 2016**; disponible en http://www.gestiondecolor.es/pantone_color_bridge_cmyk. Accesado julio 10. 2016.
- **PARNISKE, M. 2008.** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*. Vol 6. Pp 763-775
- **PEARSON, J.N. & JAKOBSEN, I. 1993.** Symbiotic Exchange of carbón and Phosphorous Between cucumber and three arbuscular mycorrhizal fungi. *Nec Phytol*. 124. Pp 481-488.
- **PÉREZ, S. 2001.** Prospección y aplicación de micorrizas en especies vegetales autóctonas del matorral, para favorecer la revegetación de ecosistemas mediterráneos degradados. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
- **PEYRONEL, B.; FASSF, A.; FONTANA, H. & TRAPPE, J.M. 1969.** Terminology of mycorrhizal Mychología.
- **PFEFFER, P.E.; DOUDS, D.D.; BUCKING, H.; SCHWARTZ, D.P. & SHACHAR-HILL, Y. 2004,** The fungus does not transfer carbón to or between roots in an arbuscular mycorrhizal simbiosis. *New Phytol*. 59.
- **PICONE, C. 2000.** Diversity and abundance of arbuscular-mycorrhizal fungal spores in tropical forest and pasture. *Biotropica* 32: 734-747.
- **PUGNAIRE, F. & F. VALLADARES, 1999.** Handbook of funtional Plant Ecology. Capítulo 10, Plant Survival in arid Enviromments. Marcel Dekker Inc. Nueva York, EUA. P 384.
- **REDECKER, D. 2001.** Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10. Pp 1756-1761.

- **REDECKER, D.; SCHÜBLER, A.; STOCKINGER, H.; STÜRMER, S.; MORTON, J. & WALKER, C. 2013.** Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales)- a possible way forward; disponible en <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00885447>, Disponible en <http://invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions> Accesado, junio 05.2016.

- **RITCHIE, S.W. & HANWAY, J.J. 1992.** *How a corn plant develops*. Special report No. 48. Ames, IA, USA, Iowa State University.

- **RODRIGUEZ, R. J.; REDMAN, R. S. & HENSON, J. M. 2004.** The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 9:261–272.

- **RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J.; VAN VOLKENBURGH, E.; HOY, M.; WRIGHT, L. & BECKWITH, F. 2008.** Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *International Society of Microbial Ecology* 2:404–416.

- **ROLLÁN, M.; MÓNACO, C.; LAMPUGNANI, G. & ARTETA, N. 1998.** Variación de la población de hongos antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* en el suelo por la aplicación de agroquímicos, Primer congreso argentino de control biológico de enfermedades de plantas. Acta de resúmenes. Universidad de Buenos Aires, Secretaría de Agricultura, Ganadería y pesca. Buenos Aires, Argentina.

- **SAIF, S.R. 1987.** Growth responses of tropical forage plant species to vesiculararbuscular mycorrhizae. *Plant Soil* 97: 25-35.

- **SÁNCHEZ, M.; POSADA, R.; VELASQUEZ, D. & NARVAEZ, M. 2010.** Metodologías básicas para el trabajo con microrra arbuscular y hongos formadores de micorriza arbuscular. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Primera edición.

- **SALAZAR-GARCÍA, S. 2002.** “Las micorrizas pueden mejorar la nutrición del árbol”, en *Nutrición del aguacate principios y aplicaciones*. INIFAPINPOFEOS. México.

- **SCHENCK, N.C. & PEREZ, Y. 1990.** Manual for the identification of VA-mycorrhizal fungi. 3rd ed., Synergistic Publication, Gainesville, U.S.A. 286 pp.
- **SCHENK, N. & SCHORODER, J. 1974.** Temperature response of Endogone mycorrhiza on soybena roots. Mycol. 72. Pp 445-456.
- **SCHULTHESS, K. F. 2002.** The effect to endophytic *Fusarium verticillioides* on infestation of two maize varieties.
- **SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D. & WALKER, C. 2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycological Research. 105(12). Pp 141-143.
- **SCHÜBLER, A. & WALKER, C. 2010.** *The Glomeromycota: a species list with new families*. Disponible en <http://www.amf-phylogeny.com>. Accesado: julio 07. 2016.
- **SCHÜBLER, A. & WALKER, C. 2010.** *The Glomeromycota. A species list with new families and new genera*. The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. Disponible en www.amfphylogeny.com accesado 10 de diciembre 2016.
- **SELOSSE, M. A.; BAUDOIN, E. & VANDENKOORNHUYSE, P. 2004.** Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies* 327:639–648.
- **SERRALDE, A.; RAMÍREZ, M. 2004.** Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Revista Corpoica* 5(1): 31-40.

- **SIEVERDING, E. & TORO, S. 1988.** Influence of soil Water Regimens on VA Mycorrhiza V. Performance of Different VAM fungal Species whit Cassava. *Journal of Agronomy and Crop Sciences*. 161. Pp 322-332.
- **SIEVERDING, E. 1991.** Influence of species of VA mycorrhizal fungi on cassava yield phosphorus fertilization. *Plant and Soil*.
- **SIEVERDING, E.; OEHL, F.; INEICHEN, K.; MÄDER, P.; BOLLER, T. & WIEMKEN, A. 2003.** Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular Mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2816-2824
- **SILVIA-PÉREZ, V.; GÓMEZ, C.; GARCÍA, J.; BURGUEÑO, J.; SANTACRUZ, A. & PALACIOS, N. 2012.** QTLs asociados al contenido de carotenos en hojas de maíz. *Centro Internacional del Mejoramiento de Maiz y Treigo Agrociencia* 46 (4). Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952012000400002, Accesado, 12 febrero, 2017.
- **SIMON, L. 1996.** Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular- arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol*
- **SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LEVESQUE, R.C. & LALONDE. 1993.** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence whit vascular land plants. *Nat.* 363. Pp 67-69.
- **SIMPSON, E.H. 1949.** Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.
- **SKUJINS, J. 1991.** Semiarid lands and Desert. Soil resource and Reclamation. Marcel Dekker Inc. Nueva York. EUA. Pp 1-632.

- **SMITH, J.P. 1978.** Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. New York. USA.
- **SMITH, G.S. & SCHENCK, N.C. 1985.** Two new dimorphic species in the Endogonaceae: *Glomus ambisporum* and *Glomus heterosporum*. *Mycologia* 566-574.
- **SPAIN J.L.; SIEVERDING, E. & OEHL, F. 2006.** *Appendicispora*: a new genus in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes, with a discussion of the genus *Archaeospora*. *Mycotaxon* 97. pp 163-182.
- **SRINIVASAN, U.; STAINES, H. J. & BRUCE, A. 1992.** Influence of media type on antagonistic modes of *Trichoderma* spp. against Wood decay basidiomycetes. *Material organismen* 27. Pp 301-321.
- **STRULLU-DERRIEN, C.H. & STRULLU, D.G. 2007.** Mycorrhization of fossil and living plants. *Systematic Palaeontology (Palaeobotany)*.
- **STUTZ, J. C.; COPEMAN, R.; MARTIN, C. A. & MORTON, J. B. 2000.** Patterns of species composition and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in arid regions of southwestern North America and Namibia, Africa. *Canad. J. Bot.* 78. Pp 237-2485
- **STUTZ, J. C. & MORTON, J. B. 1996.** Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular mycorrhizal fungi in arid ecosystems. *Canadian Journal of Botany* 74: 1883-1889.
- **TANG F.; WHITE, J. & CHARVAT, I. 2001.** The effect of phosphorus availability on arbuscular mycorrhizal colonization of *typha angustifolia*.
- **TRAPPE, J. W. 1977.** Three new Endogonaceae: *Glomus constrictus*, *Sclerocystis clavispora*, and *Acaulospora scrobiculata*. *Mycotaxon* p. 359-366.

- **TROUVELOT, A.; KOUGH, J.L. & GIANINAZZI-PEARSON, V. 1986.** Measure du taux de mycorhization va d'un systeme radiculare. recherche de methods diestimation ayant une signification fonctionnelle.
- **TUMMERUP, D.L. & KIDBY, J. 1985.** Aguments for Diagnoses base don unaltered Wall and spored structures. Mycotaxon15. Pp 515-522.
- **ULHOA, C.J. 1996.** Enzimas micolíticas produzidas pelo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*. p.234-238 en V sincobiol Simposio de control biológico. Anais: conferencias y palestras.Foz de Iguacu-Parana-Brasil.
- **VALADEZ, M.E. 1994.** Huellas de ADN en Genomas de Plantas. Mundi Prensa. México, D.F. p 147.
- **VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. 1998.** Control biológico de enfermedades de frutas en postcosecha. p. 56-57 en Primer congreso argentino de control biológico de enfermedades de las plantas. Acta de resúmenes. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca.
- **VANKUREN, N. W.; DEN BAKKER, H. C.; MORTON, J. B. & PAWLOWSKA, T. 2012.** Ribosomal RNA gene diversity, effective population size, and evolutionary longevity in asexual *Glomeromycota*. *Evolution*.
- **VAN DE HEIJDEN, M.G.A. & HORTON, T.R. 2009.** Socialism in soil? The importance of Mycorrhizal Fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *J. Ecol.* 97. Pp 1139-1150.
- **VOETS, L.; GOUBAU, L.; OLSSON, P.A. & DECLERK, S. 2008.** Absence F carbón transfer between *Medicago truncatula* plants linked by a mycorrhizal network, demonstrated in an experimental microcosm. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65. Pp 350-360.

- **WALKER, C. 1983.** Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore Wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon* 15. Pp 310 – 455.
- **WALKER, C. 1986.** Taxonomic concepts in the Endogonaceae. II. A fifth morphological wall type in endogonaceous spores. *Mycotaxon* 25. pp 95-99.
- **WALKER, C.; VESTBERG, M.; DEMIRCIK, F.; STOCKINGER, H; SAITO, M.; SAWAKI, H.; NISHMURA, I. & Schüßler, A. 2007.** Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., Ambisporaceae fam. nov., and emendation of *Archaeospora* and Archaeosporaceae. *Mycological Research* 111. pp 137-13.
- **WALKER, C. 2008.** *Ambispora* and Ambisporaceae resurrected. *Mycol. Res.* Pp 112-125.
- **WALKER, C. & SANDERS, F. E. 1986.** Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from, *Gigaspora* Gerd. & Trappe. *Mycotaxon* 27. pp 169-182.
- **WALKER, C. & SCHÜBLER, A. 2004.** Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota. *Mycological Research* pp 979-982.
- **WANG, B. & QIU, L. 2006.** Phylogenetic distribution and evolution of micorrhizal in land plants. *Mycorrhiza*. 16(5). Pp 299-363.
- **WILKINSON, D.M. 2001.** Micorrhizal evolution. *Trend in Ecol. & Evol.*16 (2). Pp 64-65.
- **WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, E.; EL-GHAOUTH, A.; DROBY, S. & CHALUTZ, E. 1996.** Comercialization of antagonistic yeasts for the biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. *SIM News*, 46. pp 237-242.

- **WOLLENWEBER, H. & REINKING, O. A. 1935.** Die *Fusarium*, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung Rev. Paul Parey, Berlin.
 - **YANEZ, C.; ZAMBRANO, J.; CAICEDO, M. & HEREDIA, J. 2005.** “Inventario Tecnológico del Programa del Maíz”. INIAP-EESC. Quito-Ecuador.
 - **YUAN, Y. S.; XIN, S. & LIANG, D. G. 2011.** Seasonality and host preference of arbuscular mycorrhizal fungi of five plant species in the inner Mongoliassteppe, China. *Brazilian Journal of Microbiology* 42. pp 57-65.
 - **ZABINSKI, C.A.; QUINN, L. & CALLAWAY R.M. 2002.** Phosphorus uptake, not carbón transfer, explains arbuscular mycorrhizal enhancement of *Centaurea maculosa* in the presence of native grassland species. *Funct Ecol.* 16(6) pp 758-765.
 - **ZANGARO, W.; BONONI, V.L. & TRUFFEN, S.B. 2000.** Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 16. pp 603-622.
- ZHU, Y.G.; CHRISTIE, P. & LAIDLAW, A.S. 2001.** Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal White clover from Zn-contaminated soil. *Chemosphere.* 44. Pp 193-199.

ANEXO

Anexo 1. Simbología utilizada

Nombre	Símbolo
Minuto	min
Litro	l
Mililitro	ml
Microlitro	μl
Gramo	g
Miligramo	mg
Metro	m
Centímetro	cm
Revoluciones Por Minuto	RPM
Partes Por Millón	ppm
Libras	lb
Por ciento	%

Unidades de medición del Sistema Internacional de Unidades (SI).

Anexo 2. Preparación de Reactivos

- **Hipoclorito de sodio 0.5%**

Se prepara a partir de hipoclorito comercial que tiene una concentración del 5%, se toma 10 ml de hipoclorito comercial y se lleva a un balón de 100ml se afora con agua destilada.

- **Hipoclorito de sodio 1%**

Se prepara a partir de hipoclorito comercial que tiene una concentración del 5%, se toma 20 ml de hipoclorito comercial y se lleva a un balón de 100ml se afora con agua destilada.

- **HCL 2% (v/v de ácido clorhídrico)**

Tomar 20 ml de ácido clorhídrico (10%) con una pipeta de succión, agregar el ácido sobre el agua destilada diluir y completar a 100ml en balón aforado y homogenizar la solución.

- **KOH al 10% (w/v hidróxido de potasio)**

Pesar 10 gr de KOH, y disolver en agua destilada, verterlo en un balón aforado y completar el volumen a 100ml con agua destilada, homogenizar la solución.

- **Fucsina Ácida 0.05% (w/v)**

Tomar 100 ml de glicerina, 5 ml de ácido clorhídrico al 1%, pesar 0.1 gr de Fucsina ácida, disolver y mezclar los componentes finalmente completar el volumen a 200ml con ácido láctico.

- **H₂O₂ 10% (v/v)**

Se prepara a partir de peróxido de hidrogeno, 87% del cual se toma 11.4ml en un balo aforado de 100ml y se completa el volumen con agua destilada, se homogeniza la solución.

- **Lacto-glicerol**

Se toma 50 ml de glicerina en un balón aforado de 100ml, completar el volumen con agua destilada y homogenizas la solución.

- **PVLG, Poli vinil Lacto Glicerol**

En un matraz, a baño maría a 70°C, 50 ml de agua destilada, 50 ml de ácido láctico, glicerol 5 ml, 8.3 g de alcohol Polivinil, agitar constantemente por 30 min hasta apreciar que no quedan alcohol Polivinil.

- **Solución de Sucrosa 50% (p/v)**

Se prepara con 50 gr de azúcar común diluidos en 50 ml de agua destilada a temperatura ambiente.

- **Reactivo de Melzer**

Es una solución yodada a la cual se le ha añadido hidrato de cloral, para medir la reacción amiloide-dextrinoide; la solución madre se prepara con 1.5 g de Yoduro de potasio, 0.5g de Yodo, agua destilada 20 ml y agitar. Para prepara el

reactivo de Melzer se toma 5ml de solución madre y se añade 5g de cristales de hidrato de cloral y agitar (se guarda en un frasco ámbar en oscuridad).

- **PVLG : Melzer 50% (v/v)**

Se toma 3 ml de reactivo de Melzer y se agrega 3 ml de PVLG, se agita por 2 minutos para su homogenización.

Anexo 3. Preparación de Medios de Cultivo

- **Potato Agar Dextrosa**, es un medio sólido complejo de uso general para el cultivo de hongos.

Ingredientes	(g/L)
Glucosa	20.0
Extracto de papa	4.0
Agar	30

- Disolver cuidadosamente los ingredientes en agua estéril destilada.
- Calentar a ebullición durante 1 minuto, para terminar de homogenizar.
- Esterilizar en autoclave a 121°C a una presión de 15lb/pulg² durante 30 minutos.
- Es de uso inmediato, caso contrario mantener a baño maría por un máximo de 1 hora a 80°C.

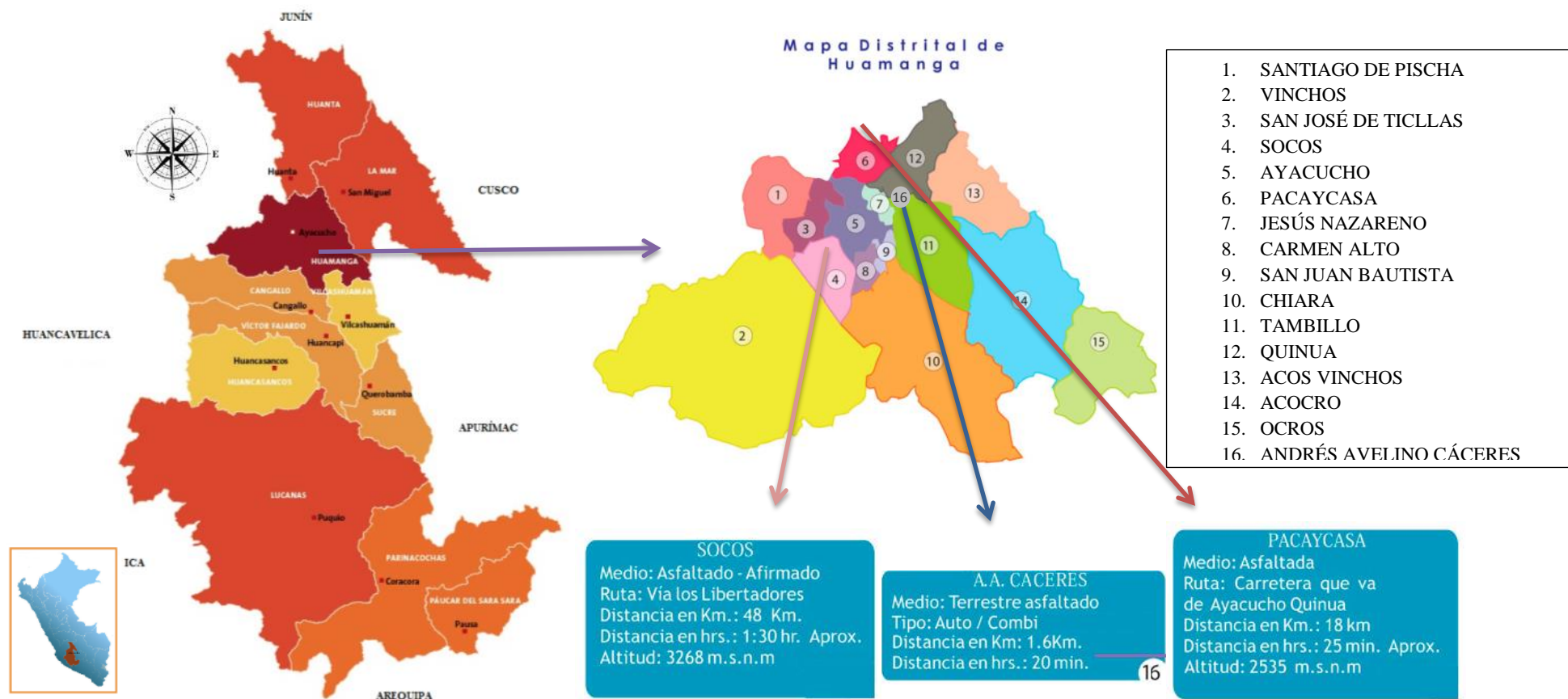
- **Caldo Mínimo en Sales**, es un medio químicamente definido de uso general para el cultivo de microorganismos poco exigentes.

Ingredientes	(g/L)
Glucosa	10.0
Dextrosa	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sulfato di amónico)	5.0
MgSO ₄ *7H ₂ O (sulfato de magnesio Heptahidratado)	2.0
K ₂ HPO ₄ (Fosfato acido de potasio)	2.0
FeSO ₄ *H ₂ O	0.1
pH	6.0 – 7.0

- Disolver cuidadosamente los ingredientes en el orden indicado, excepto la glucosa.

- b. La glucosa y dextrosa deberán disolverse en 500ml de agua destilada y estéril, en un recipiente separado de las sales.
- c. En un balón de 1l, poner 500ml de agua estéril y destilada, en el siguiente orden mezclar por agitación hasta su completa disolución, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 y $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.
- d. Ajustar el pH en el medio de sales (6.0).
- e. Mezclar el contenido de ambos balones y agitar hasta homogenizar.
- f. Esterilizar en autoclave 121°C a una presión de 15lb/pulg^2 durante 30 minutos.

Anexo 4. Ubicación de las Zonas de estudio



Anexo 5. Ubicación de las zonas de recolección de muestras biológicas



Distrito de Ayacucho - Centro Experimental Canaán



Distrito de Socos – Comunidad de Luyanta.



Distrito de Pacaycasa - Fundo Wayllapampa

Anexo 6. Estándar de muestra rizosférica – época



Cultivo de maíz época de lluvia (iz), Restos de cosecha época seca (De).

Mayo - 2016

Julio - 2016



Muestra biológica estándar, Izquierda muestra en época de lluvia, Derecha muestra época seca.

Anexo 7. Extracción y desinfección superficial de esporas

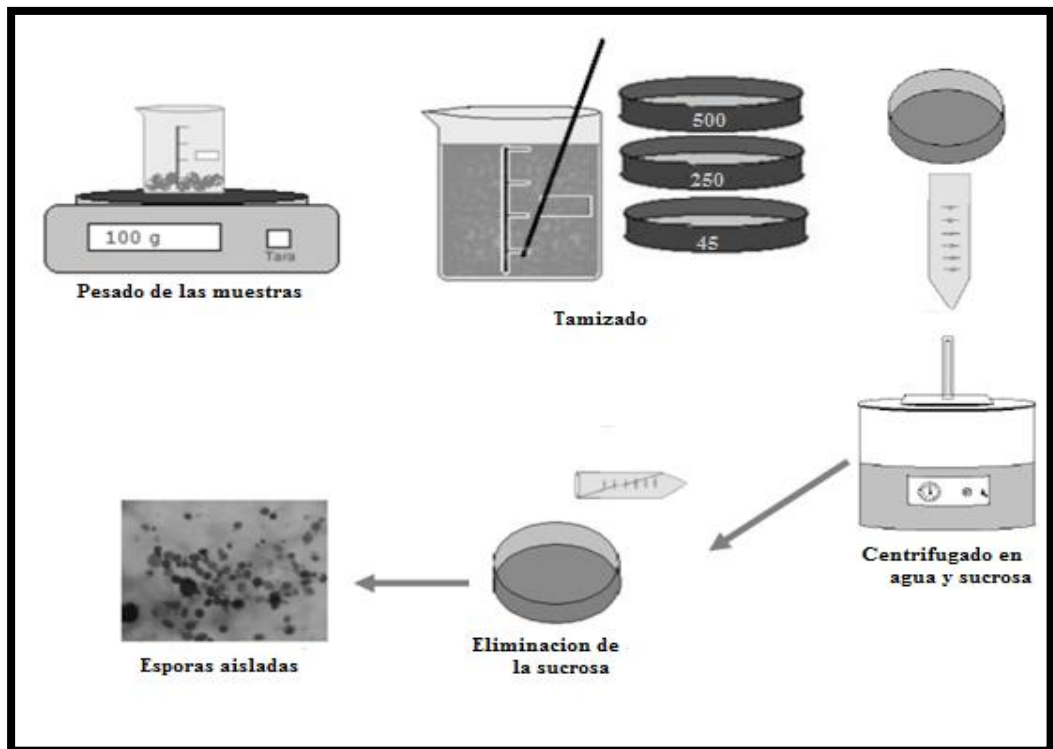


Diagrama para la extracción de esporas de acuerdo al protocolo propuesto Gerdemann y Nicholson (1963), con modificación de Daniels y Skipper (1982).

Anexo 8. Tamizado de suelo rizosférico



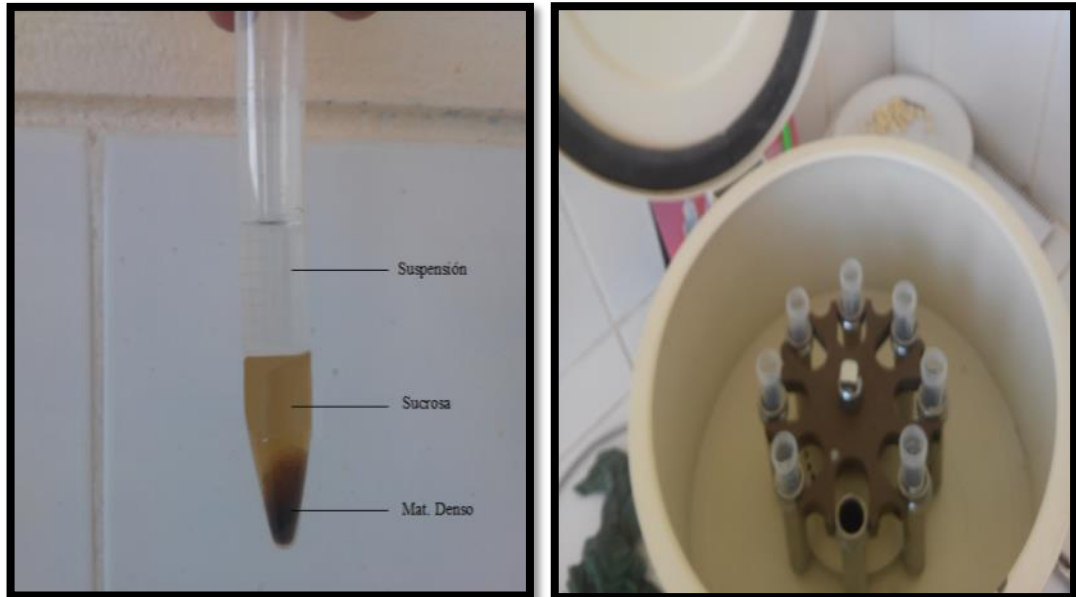
Tamiz superior 500 μm (izquierda), raíces y partículas de suelo – detritos; Tamiz inferior 45 μm (derecha), esporas, detritos y partículas finas del suelo.

Anexo 9. Extracción de esporas en la raíz

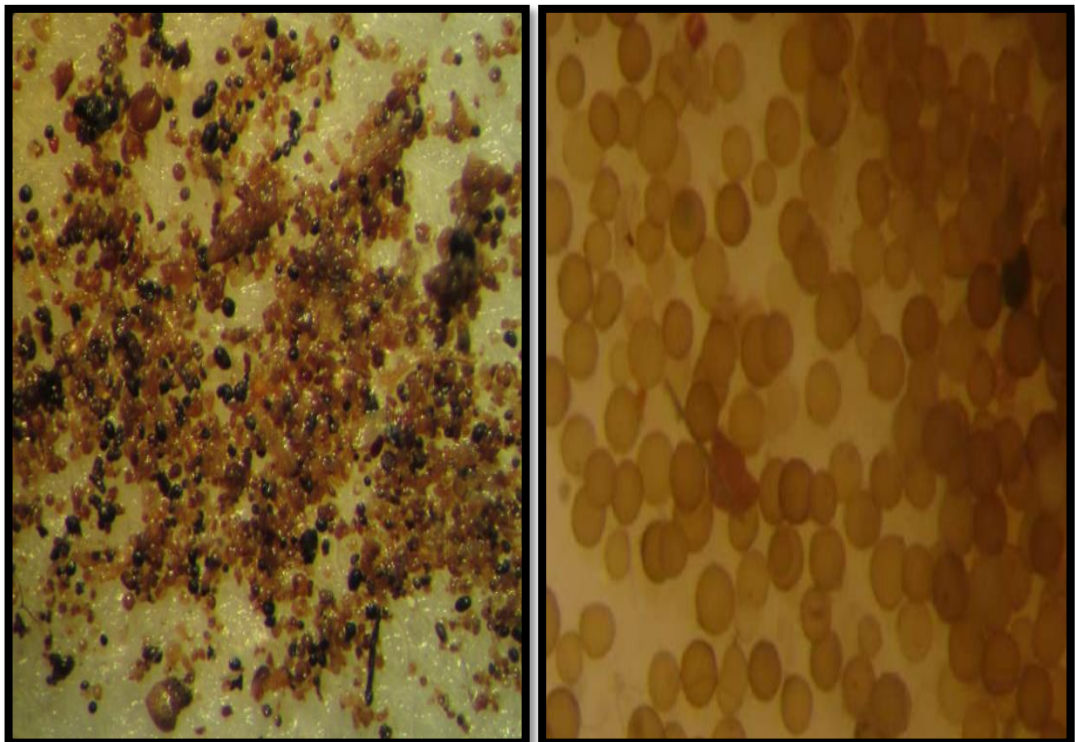


Raíces retenida en el tamiz de 500 μm (izquierda), fragmentación de raíces en licuadora (derecha).

Anexo 10. Tubo de ensayo para centrifuga (izquierda), conteniendo suspensión de agua y esporas (superior) y sucrosa (50% p/v; inferior); centrifuga y tubos dispuestos (derecha).



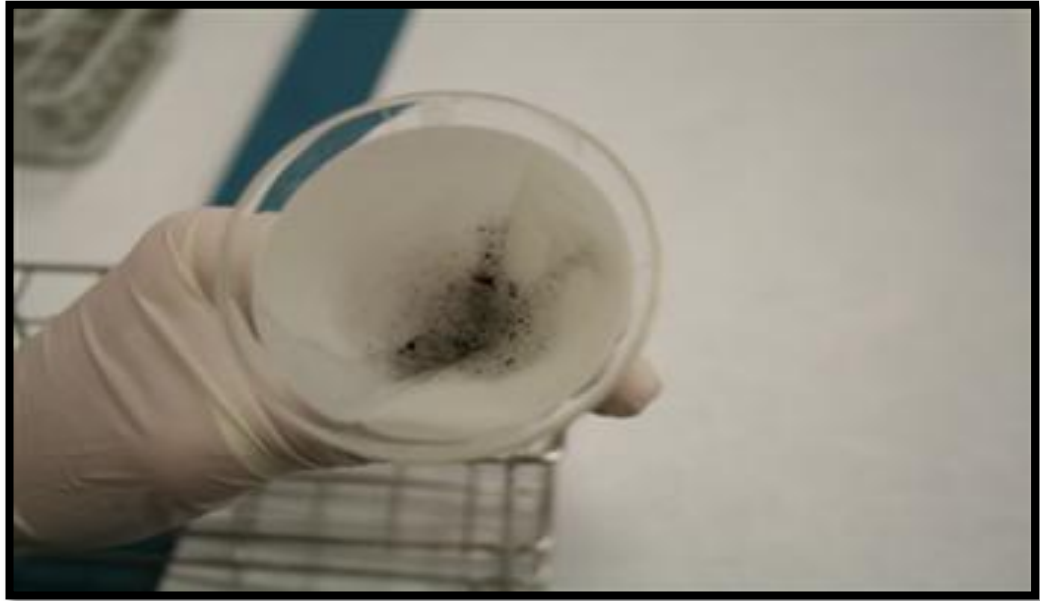
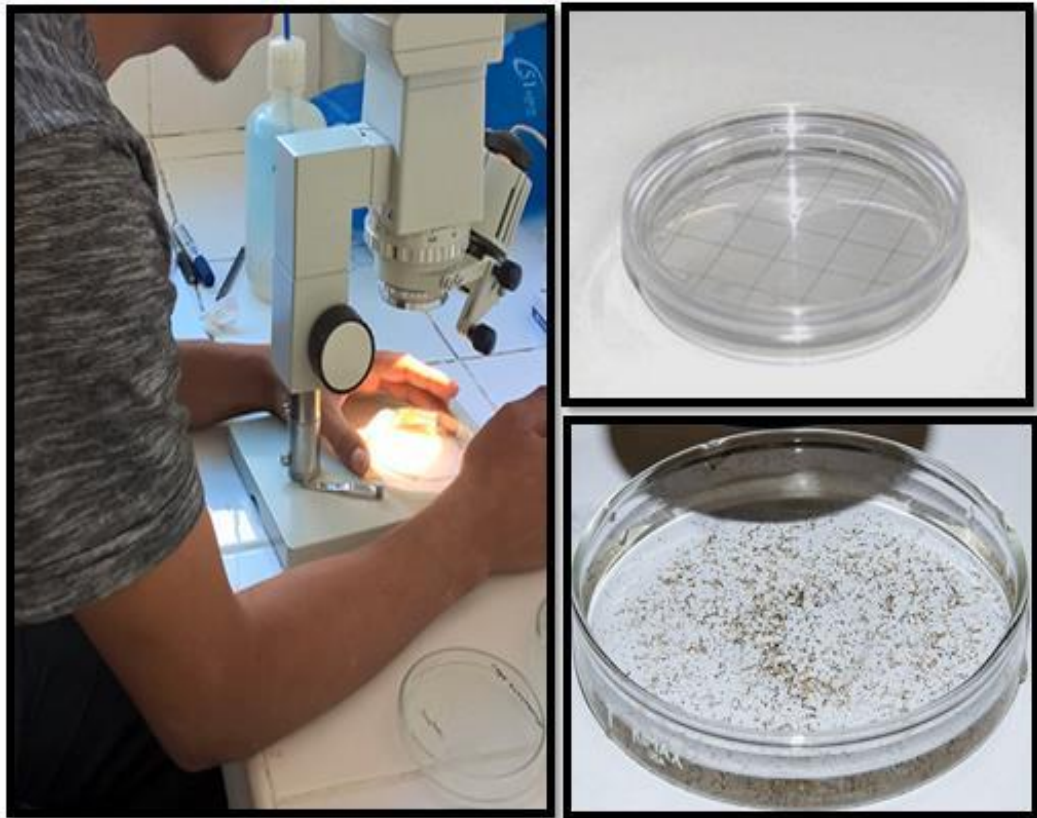
Anexo 11. Esporas de HMA, vista al estereoscopio



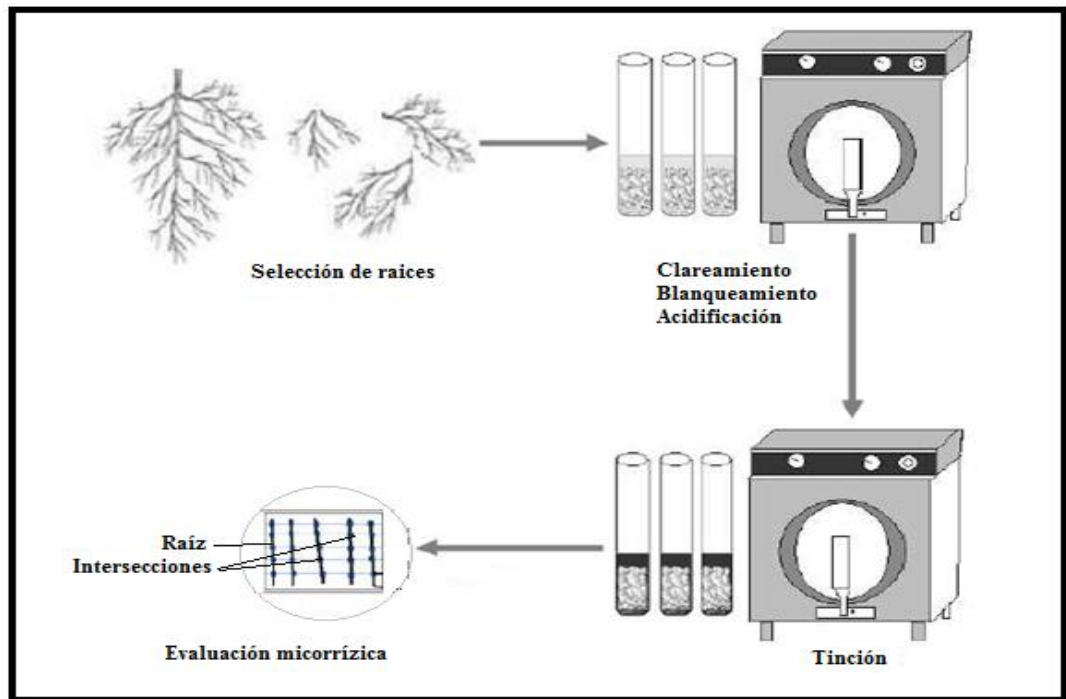
Esporas extraídas de material de campo (izquierda), esporas extraídas de sustrato del cultivo monoespecífico (derecha).

Anexo 12. Desinfección superficial de esporas

Preparación en matraz (por separado) de: Hipoclorito de sodio 0.5%; 200mg.lt⁻¹ de estreptomicina y 100 mg.lt⁻¹ de gentamicina; solución de Tween 40(izquierda superior). Extracción de las soluciones con ayuda de una jeringa (derecha superior). Tubos de ensayo para centrifuga conteniendo 10ml de las soluciones (izquierda inferior). Tubo de ensayo con 10ml de agua destilada estéril, para el enjuague de esporas.

Anexo 13. Filtrado del material de los tubos de ensayo**Anexo 14.** Cuantificación de esporas

Anexo 15. Esquema del proceso de tinción de raíces



Tomado de Merryweather y Fitter (1991), esquema del proceso de tinción de raíces.

Anexo 16. Especímenes con 100 días desde la inoculación



Plantas con 100 días desde la inoculación (izquierda); raíz procedente del cultivo monoespecífico (derecha).

Anexo 17. Lavado y selección de raíces, y homogenización de pesos



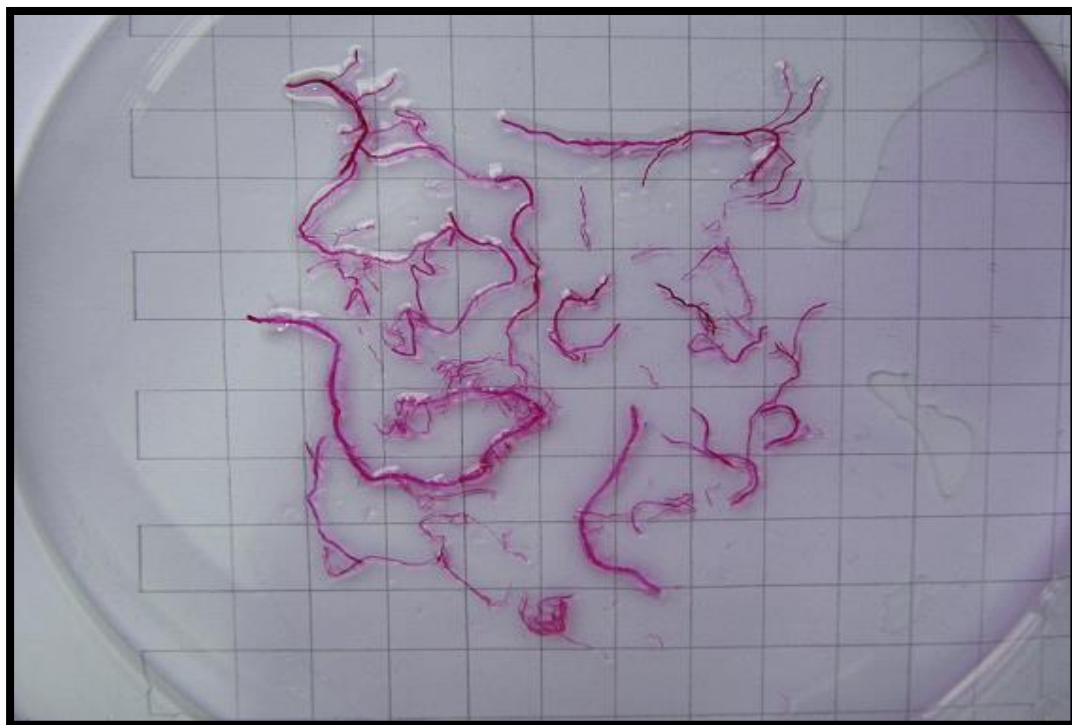
Anexo 18. Proceso de tinción de raíces



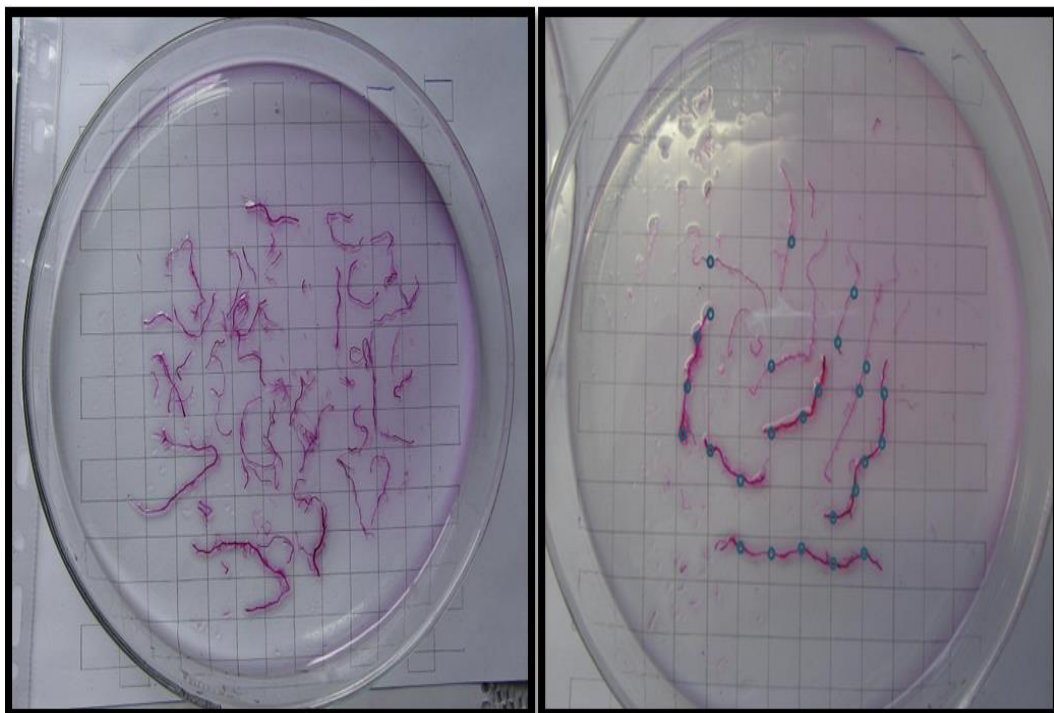
Clareamiento de raíces (KOH 10% y H_2O_2 10%; izquierda),
 Blanqueamiento y acidificación (HCl 2%; derecha),
 Tinción de raíces, eliminación del exceso de pigmento
 (Lacto-glicerol; derecha inferior).



Anexo 19. Obtención de raíces teñidas libres de exceso de pigmento

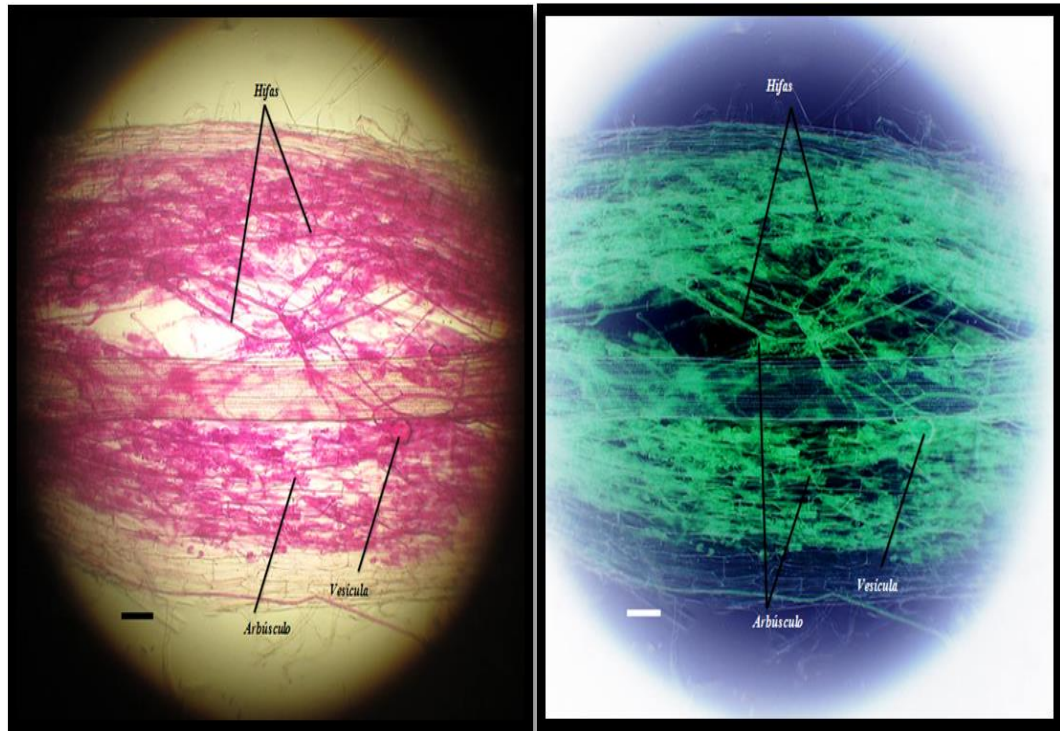


Anexo 20. Determinación de colonización en raíces

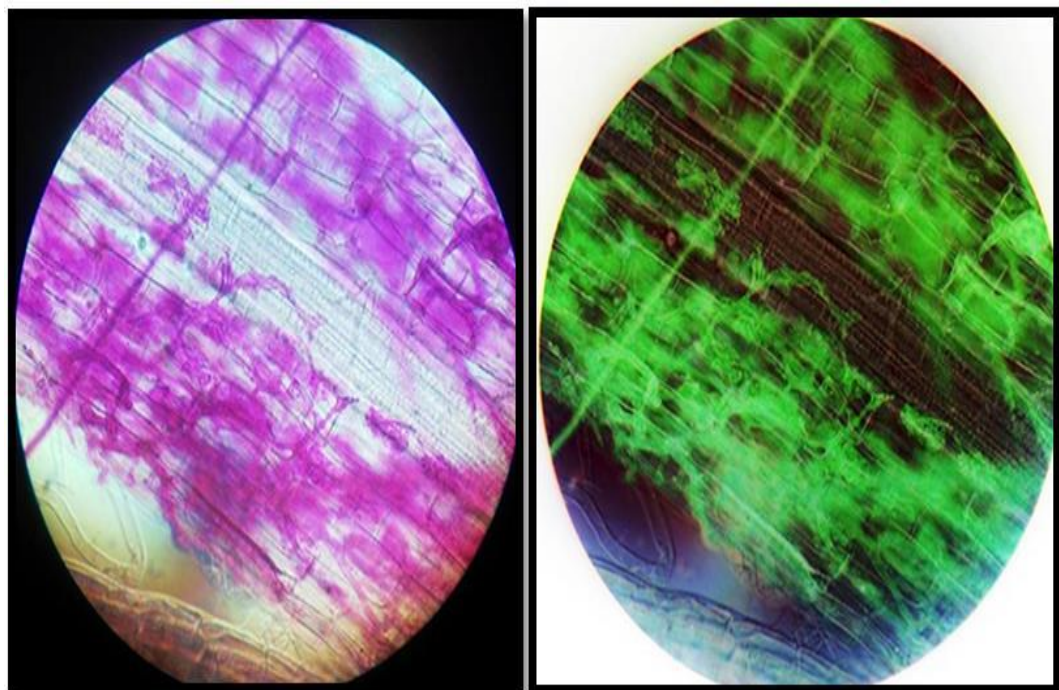


Raíces teñidas en Fucsina ácida 0.5% (izquierda); conteo de intersecciones con raíz micorrizadas y no micorrizadas (26/40 intersecciones; derecha).

Anexo 21. Observación de estructuras micorrízicas

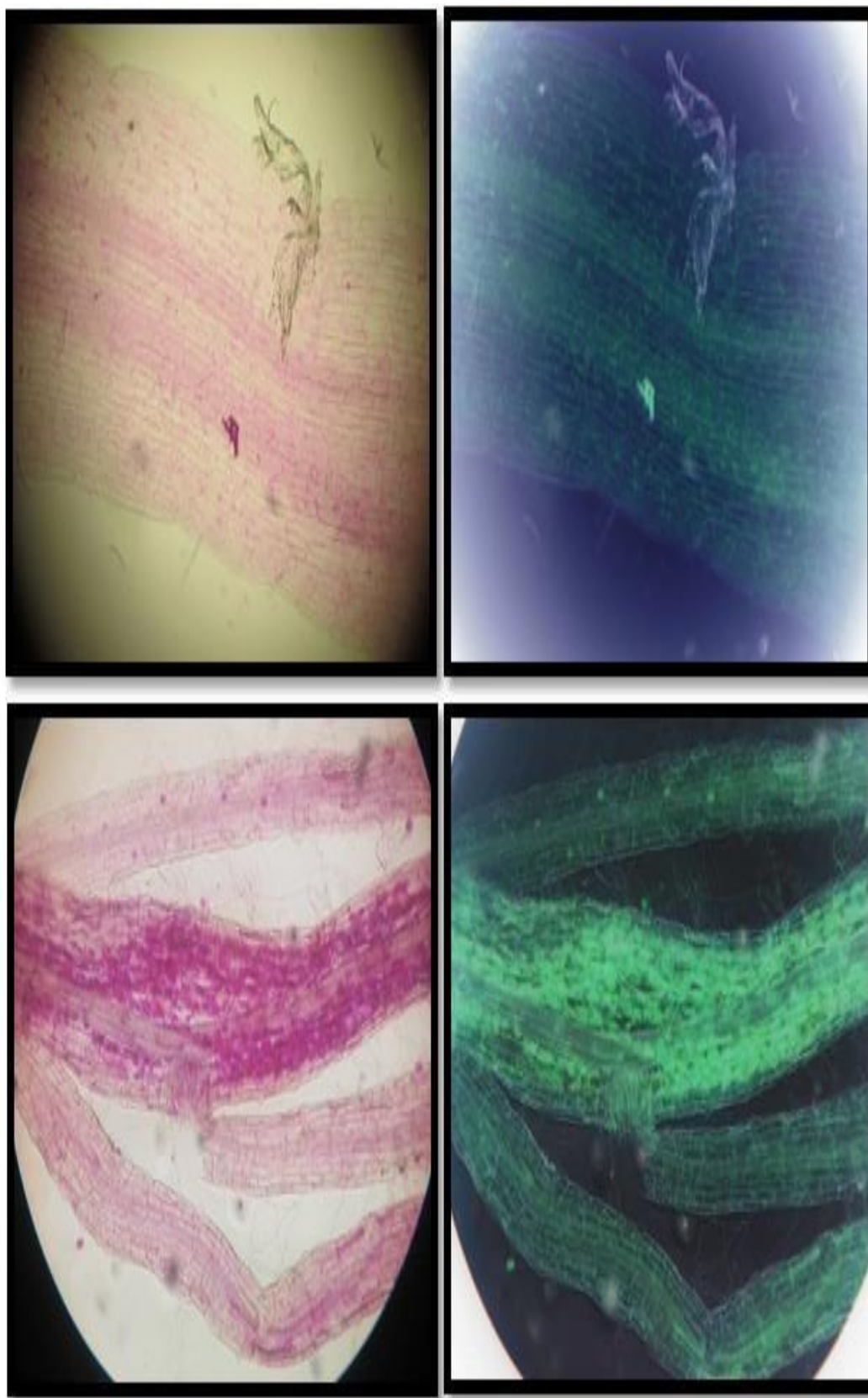


Apreciación de estructuras micorrízicas, arbusculos, hifas y vesículas (derecha imagen original, izquierda imagen con colores invertidos).

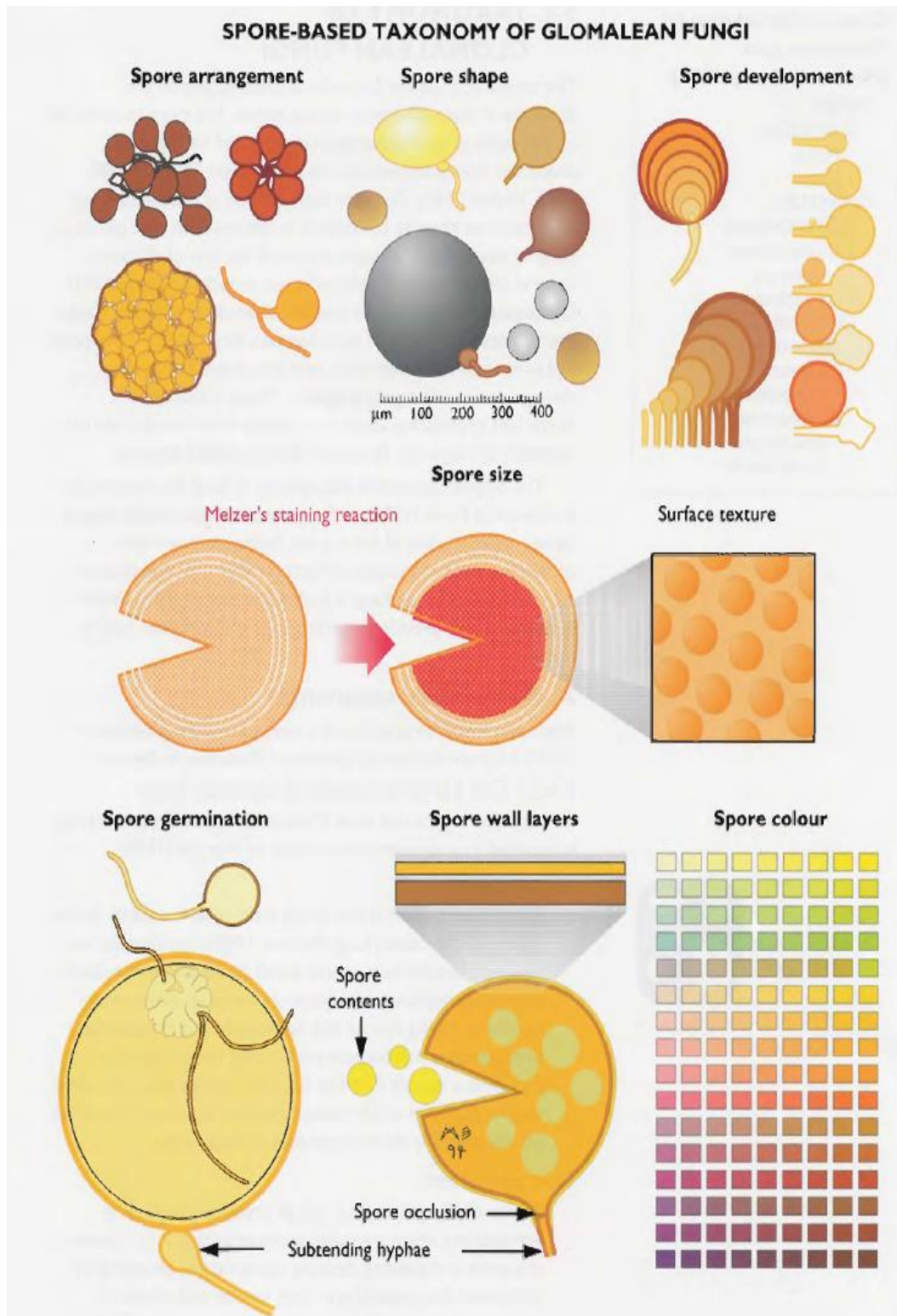


Apreciación de arbusculos e hifas.

Anexo 22. Contraste de raíces no micorrizadas y micorrizadas (vista a 100x; superior y 40x; inferior)



Anexo 23. Caracterización morfológica de esporas

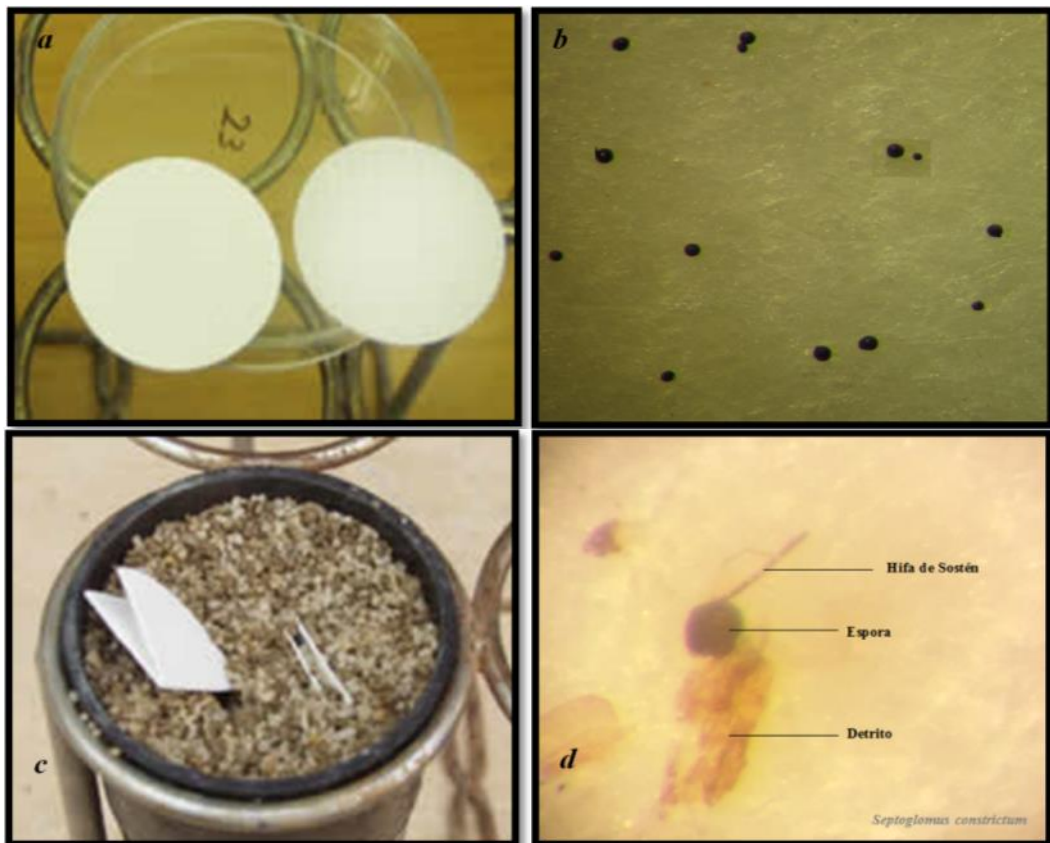


Consideraciones básicas para la identificación de hongos micorrízicos arbusculares (Tomado de Brundrett *et al.*, 1996).

Anexo 24. Almacenamiento de esporas



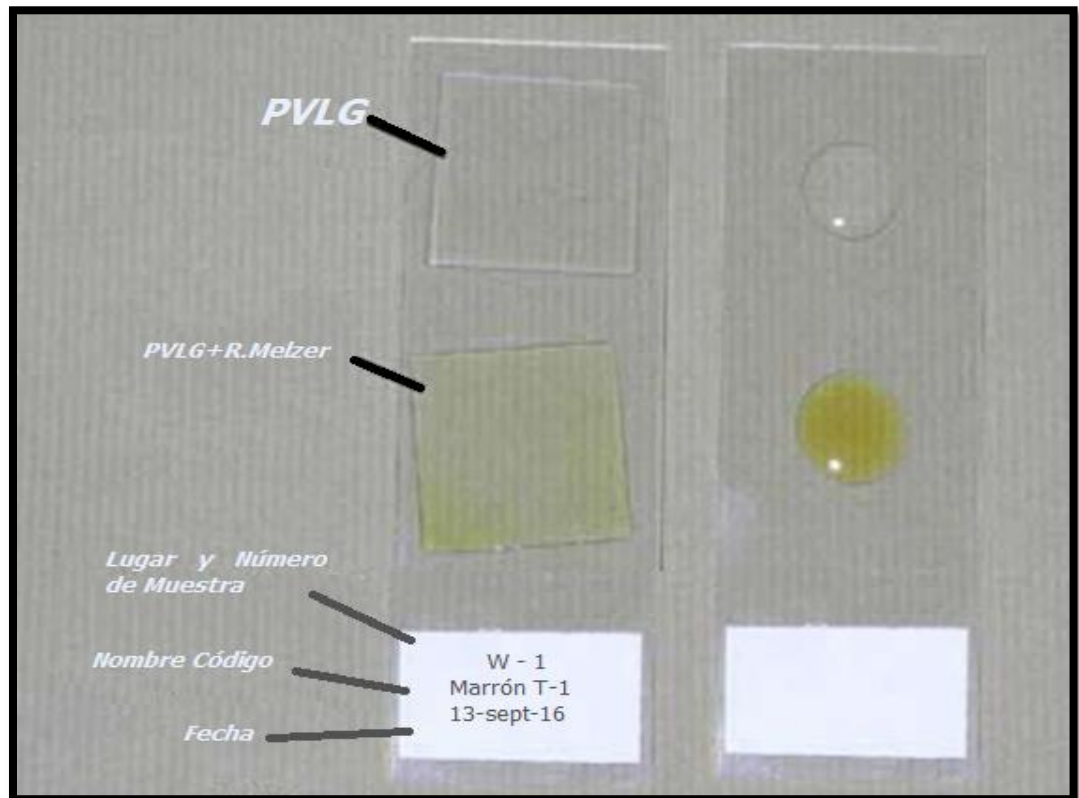
Anexo 25. Germinación de esporas



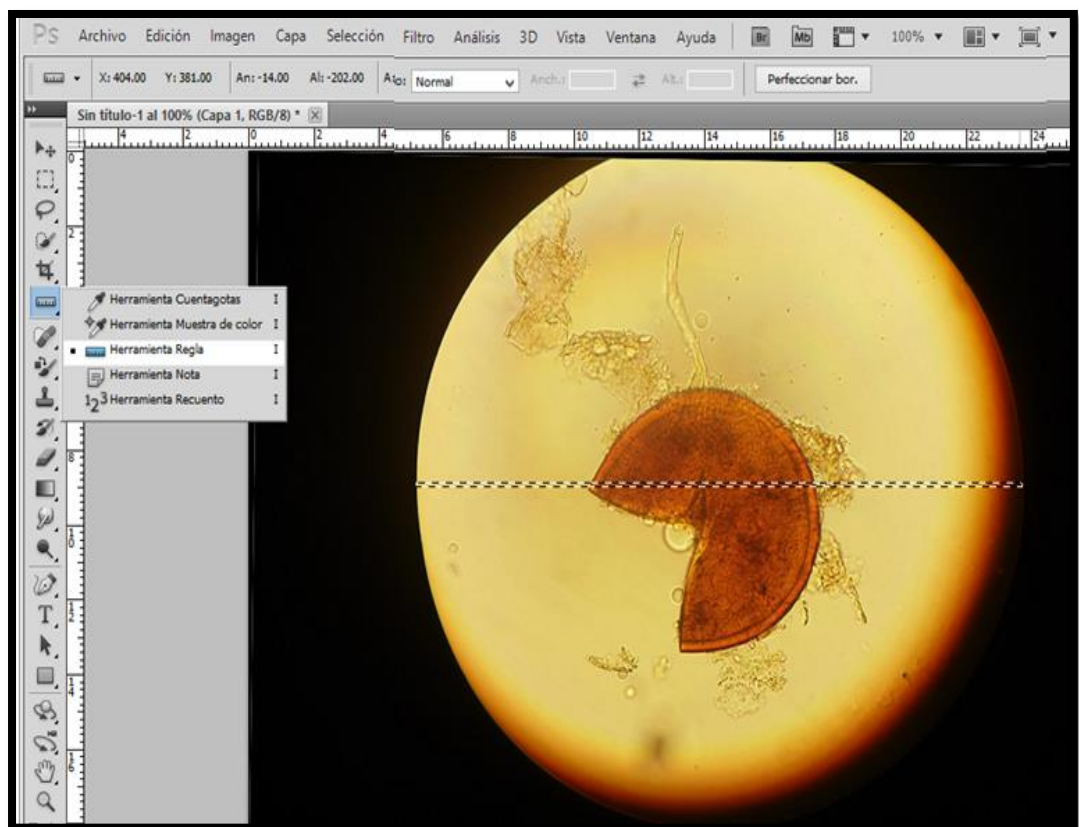
Germinación de esporas; **a**, papel filtro esterilizado; **b**, distribución de las esporas; **c**, papel filtro más esporas en el sustrato humedecido; **d**, vista en estereoscopio.

Anexo 26. Preparación del semillero**Anexo 27. Inoculación de raíces a los 10 días desde la germinación**

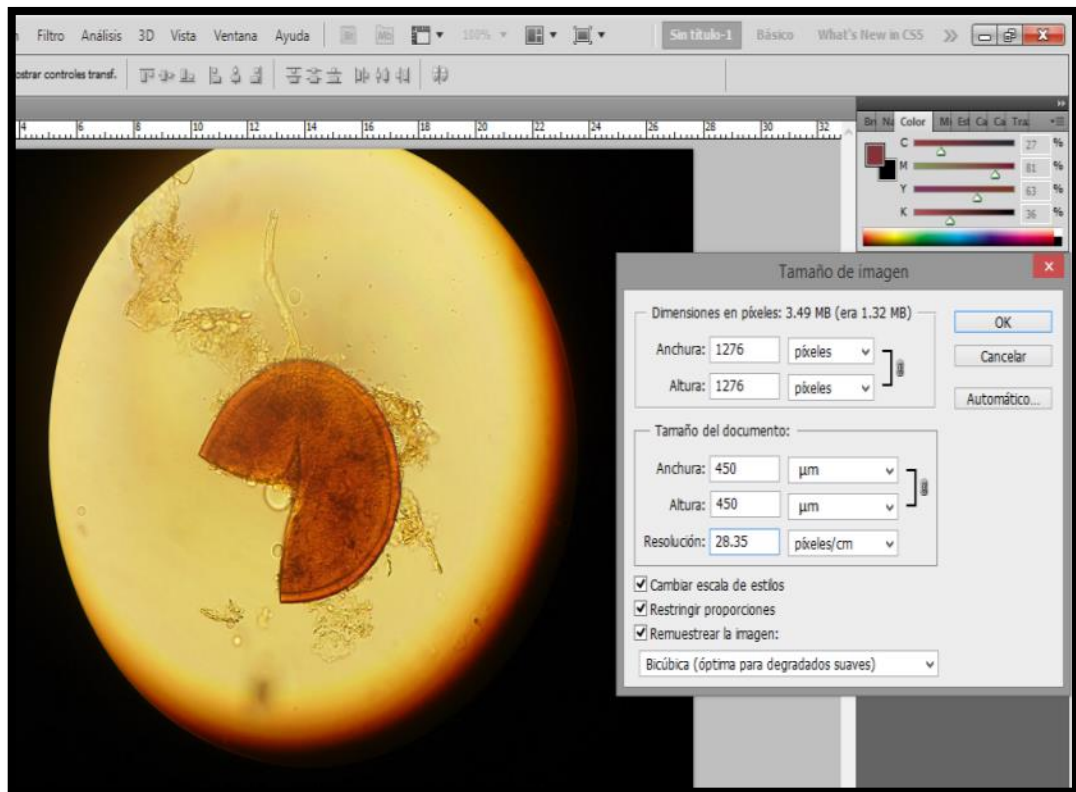
Anexo 28. Montaje de esporas



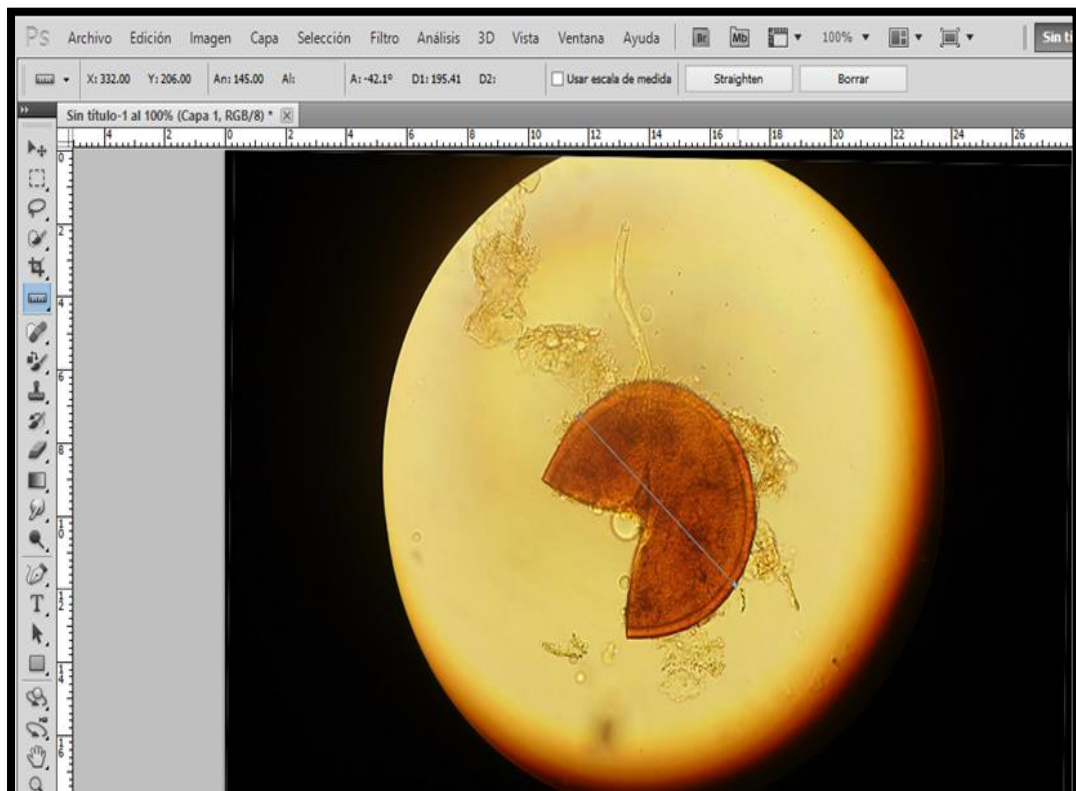
Anexo 29. Medición del tamaño de campo visual, observado a 40x



Anexo 30. Medición del tamaño de esporas, relación imagen tamaño de campo visual



Anexo 31. Medición del tamaño de esporas



Anexo 32. Cartilla de colores Pantone ® color bridge™ CMYK

PANTONE® color bridge™ CMYK PC Page: 1 of 14

PANTONE 100 PC C:0 M:0 Y:98 K:0	PANTONE 106 PC C:0 M:1 Y:70 K:0	PANTONE 113 PC C:0 M:4 Y:71 K:0	PANTONE 120 PC C:0 M:8 Y:80 K:0	PANTONE 1205 PC C:0 M:5 Y:35 K:0	PANTONE 127 PC C:0 M:5 Y:57 K:0	PANTONE 134 PC C:0 M:11 Y:56 K:0	PANTONE 1345 PC C:0 M:15 Y:47 K:0	PANTONE 141 PC C:0 M:17 Y:62 K:0	PANTONE 148 PC C:0 M:17 Y:42 K:0	PANTONE 1485 PC C:0 M:34 Y:54 K:0
PANTONE 101 PC C:0 M:0 Y:70 K:0	PANTONE 107 PC C:0 M:2 Y:80 K:0	PANTONE 114 PC C:0 M:5 Y:77 K:0	PANTONE 121 PC C:0 M:8 Y:69 K:0	PANTONE 1215 PC C:0 M:5 Y:48 K:0	PANTONE 128 PC C:0 M:7 Y:66 K:0	PANTONE 135 PC C:0 M:21 Y:74 K:0	PANTONE 1355 PC C:0 M:22 Y:58 K:0	PANTONE 142 PC C:0 M:25 Y:78 K:0	PANTONE 149 PC C:0 M:22 Y:47 K:0	PANTONE 1495 PC C:0 M:45 Y:59 K:0
PANTONE 102 PC C:0 M:0 Y:66 K:0	PANTONE 108 PC C:0 M:2 Y:66 K:0	PANTONE 115 PC C:0 M:7 Y:80 K:0	PANTONE 122 PC C:0 M:14 Y:80 K:0	PANTONE 1225 PC C:0 M:17 Y:68 K:0	PANTONE 129 PC C:0 M:11 Y:70 K:0	PANTONE 136 PC C:0 M:28 Y:67 K:0	PANTONE 1365 PC C:0 M:33 Y:75 K:0	PANTONE 143 PC C:0 M:35 Y:66 K:0	PANTONE 150 PC C:0 M:36 Y:70 K:0	PANTONE 1505 PC C:0 M:62 Y:60 K:0
PANTONE Yellow PC C:0 M:1 Y:100 K:0	PANTONE 109 PC C:0 M:10 Y:100 K:0	PANTONE 116 PC C:0 M:12 Y:100 K:0	PANTONE 123 PC C:0 M:21 Y:88 K:0	PANTONE 1235 PC C:0 M:30 Y:85 K:0	PANTONE 130 PC C:0 M:30 Y:100 K:0	PANTONE 137 PC C:0 M:38 Y:85 K:0	PANTONE 1375 PC C:0 M:45 Y:85 K:0	PANTONE 144 PC C:0 M:52 Y:100 K:0	PANTONE 151 PC C:0 M:55 Y:100 K:0	PANTONE 1515 PC C:0 M:68 Y:100 K:0
PANTONE 103 PC C:5 M:10 Y:100 K:15	PANTONE 110 PC C:2 M:24 Y:100 K:7	PANTONE 117 PC C:2 M:22 Y:100 K:15	PANTONE 124 PC C:0 M:27 Y:100 K:0	PANTONE 1245 PC C:7 M:35 Y:100 K:13	PANTONE 131 PC C:3 M:39 Y:100 K:6	PANTONE 138 PC C:0 M:50 Y:100 K:0	PANTONE 1385 PC C:0 M:56 Y:100 K:7	PANTONE 145 PC C:0 M:56 Y:100 K:8	PANTONE 152 PC C:0 M:62 Y:100 K:0	PANTONE 1525 PC C:1 M:75 Y:100 K:9
PANTONE 104 PC C:7 M:13 Y:100 K:28	PANTONE 111 PC C:7 M:18 Y:100 K:29	PANTONE 118 PC C:5 M:28 Y:100 K:27	PANTONE 125 PC C:8 M:31 Y:100 K:19	PANTONE 1255 PC C:8 M:30 Y:98 K:30	PANTONE 132 PC C:8 M:38 Y:100 K:31	PANTONE 139 PC C:5 M:48 Y:100 K:21	PANTONE 1395 PC C:10 M:51 Y:100 K:36	PANTONE 146 PC C:7 M:55 Y:100 K:34	PANTONE 153 PC C:3 M:61 Y:100 K:16	PANTONE 1535 PC C:8 M:75 Y:100 K:40
PANTONE 105 PC C:14 M:20 Y:88 K:30	PANTONE 112 PC C:10 M:20 Y:100 K:38	PANTONE 119 PC C:15 M:21 Y:100 K:46	PANTONE 126 PC C:10 M:30 Y:100 K:34	PANTONE 1265 PC C:15 M:34 Y:98 K:45	PANTONE 133 PC C:16 M:32 Y:100 K:61	PANTONE 140 PC C:13 M:42 Y:100 K:56	PANTONE 1405 PC C:14 M:49 Y:100 K:66	PANTONE 147 PC C:18 M:40 Y:85 K:65	PANTONE 154 PC C:7 M:64 Y:100 K:36	PANTONE 1545 PC C:20 M:78 Y:100 K:78

PANTONE® Colors displayed here may not match PANTONE-identified standards. Consult current PANTONE Color Publications for accurate color.

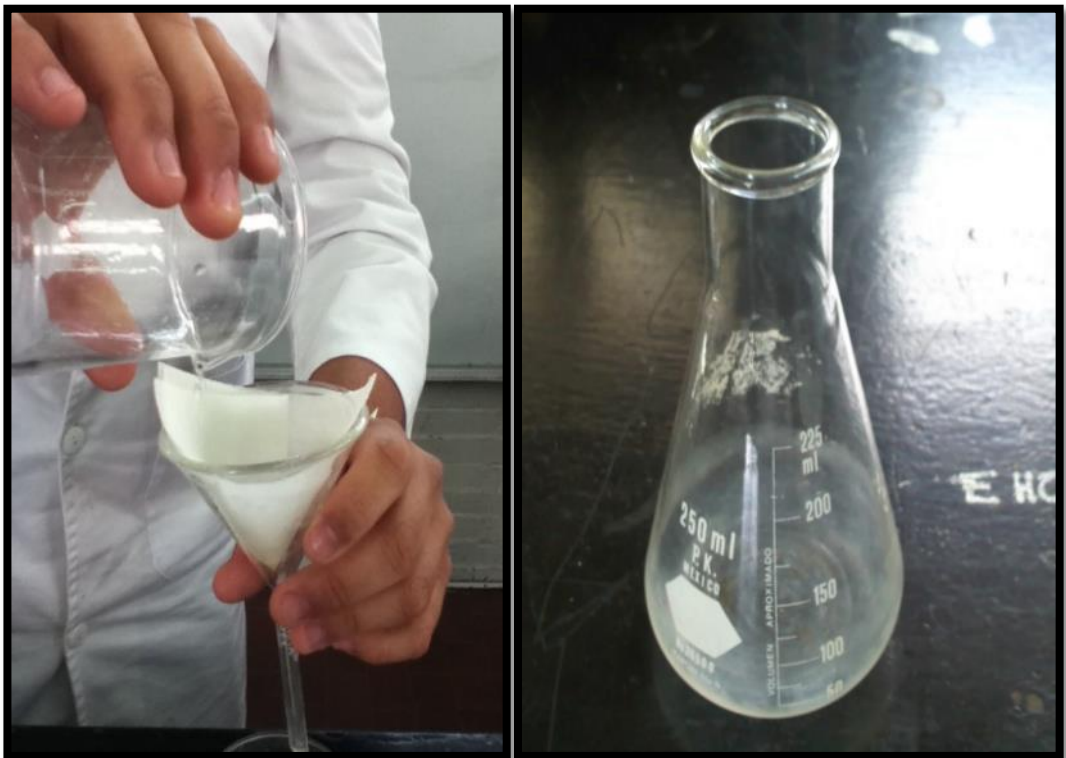
PANTONE® and other Pantone, Inc. trademarks are the property of Pantone, Inc. © Pantone, Inc., 2005. All rights reserved.

Hardcopies of PANTONE Color Charts and reproductions thereof MAY NOT BE SOLD in any form.

Pantone, Inc. is not responsible for any modifications made to such Charts which have not been approved by Pantone, Inc.

PC = four-color Process (process) simulations of solid colors Coated (stock)

Colores basados en el porcentaje de saturación de CMYK

Anexo 33. Extracción e incorporación de esporas en el Medio MIN + ácido aspártico**Anexo 34.** Filtrado del caldo MIN al séptimo día desde la incorporación de HMA y ácido aspártico

Anexo 35. Homogenización del medio de cultivo PDA + MIN conteniendo material filtrado



Anexo 36. Placas de petri con PDA + MIN (material filtrado) Corte y extracción de medio de cultivo PDA con *Fusarium oxysporum*, (edad 7 días)





Anexo 37. Disposición del disco de PDA con *Fusarium oxysporum*, en medio PDA + MIN (material filtrado)



Anexo 38. Ruta metabólica de los tetraterpenoides

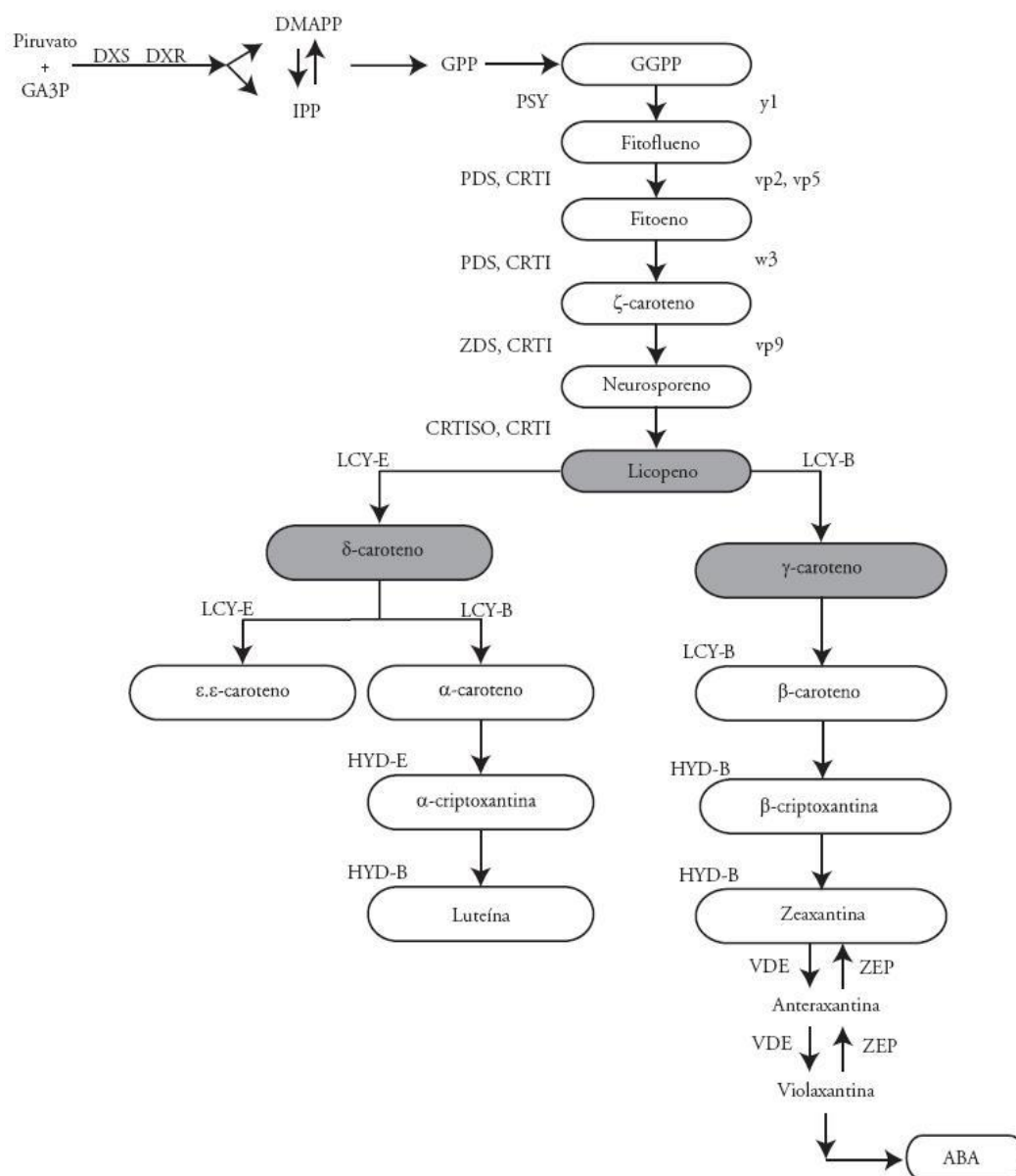


Figura 1. Ruta mevalónica independiente de los tetraterpenoides que da lugar a los diferentes carotenos de las plantas y la hormona ABA. GA3P: D-gliceraldehido-3-fosfato; DXS: 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa; DXR: reductoisomerasa; DMAPP: dimetilalil pirofosfato; IPP: isopentenil bifosfato; GPP: geranyl pirofosfato; GGPP: geranyl geranyl pirofosfato; PSY: fitoeno sintasa; PDS: fitoeno desaturasa; CRTI, ZDS: ζ-caroteno desaturasa; CRTISO: caroteno isomerasa; LCY-E: ε-licopeno ciclasa; LCY-B: β-licopeno ciclasa; HYD-E: ε-hidroxilasa; HYD-B: β-hidroxilasa; VDE: violaxantina de-epoxidasa; ZEP: zeaxantina epoxidasa; ABA: ácido abscisico. Enzimas asociadas a mutantes en maíz: *yellow 1* (*y1*), *viviparous 2* (*vp2*), *viviparous 5* (*vp5*), *white seedling* (*w3*), *viviparous 9* (*vp9*). (Li *et al.*, 1996; Fraser y Bramley, 2004; Wong *et al.*, 2004).

Figure 1. Mevalonate-independent pathway of tetraterpenes which produces carotenoids and the ABA hormone in plants. GA3P: D-glyceraldehyde-3-phosphate; DXS: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase; DXR: reductoisomerase; DMAPP: dimethylallyl diphosphate; IPP: isopentenyl diphosphate; GPP: geranyl pyrophosphate; GGPP: geranyl geranyl pyrophosphate; PSY: phytoene synthase; PDS: phytoene desaturase, CRTI, ZDS: ζ-carotene desaturase, CRTISO: carotenoid isomerase, LCY-E: ε-Lycopene cyclase, LCY-B: carotene β-lycopene cyclase, HYD-E: carotene ε-hydroxylase, HYD-B: β-hydroxylase, VDE: Violaxanthin de-epoxidase ZEP: Zeaxanthin epoxidase ABA: Abscisic acid. Enzymes related to maize mutants: *yellow 1* (*y1*), *viviparous 2* (*vp2*), *viviparous 5* (*vp5*), *white seedling* (*w3*), *viviparous 9* (*vp9*). (Li *et al.*, 1996; Fraser and Bramley 2004; Wong *et al.*, 2004).

Fuente: Silvia-Perez, et al.,(2012)

Anexo 39. Fuente de ácido aspártico



Medicamentos	P.A.	Monografías PA	Clasificación ATC	Laboratorios
--------------	------	----------------	-------------------	--------------

SORBENOR Sol. oral 1 g

Datos generales Prospecto Interacciones
Equivalencias internacionales Dopaje/ deporte

Alertas por composición:

PA:
Aspártico ácido, Glutámico ácido, Asparragina monohidrato, Fenilalanina

Envases

Env. con 20 ampollas bebibles de 5 ml
EFP: Medicamento publicitario
Comercializado: Si
Situación: Alta
Código Nacional: 826230

Datos generales de SORBENOR

Composición de SORBENOR

Principio Activo:

Aspártico ácido 1000 mg/1 ampolla bebible

Excipiente:


Sacarosa
Y otros.

Clasif. Terapéutica de SORBENOR

Astenia. Estrés. Insomnio

Fuente: Dominio en http://www.vademecum.pe/medicamento-sorbenor_4440

Anexo 40. Resultado del análisis de caracterización realizado al suelo del Fundo Wayllapampa, Pacaycasa, 2016; certificado por el laboratorio de Análisis de Suelo y Análisis Foliar “Nicolás Roulet” del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNSCH




UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
PROGRAMA DE INVESTIGACION EN PASTOS Y GANADERIA
LABORATORIO DE SUELOS Y ANALISIS FOLIAR
Jr. Abraham Valdelomar N° 249 – Telf. 315936 RPM # 151505
Ayacucho – Perú
"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

Región : Ayacucho
Provincia : Huamanga
Distrito : Pacaycasa
Comunidad : Huayllapampa
Proyecto : "Tesis"
Solicitante : Sr. Mario Darwin Orihuela Ascarza

ANALISIS DE CARACTERIZACION

Muestra	Análisis mecánico (%)			Clase Textural	pH (H ₂ O) 1:2.5	C. E. (dS/m.) 1:1	CaCO ₃ (%)	M.O. (%)	Nt (%)	Elementos Disp. (ppm)		Cationes cambiabiles (Cmol(+)/Kg)						C. I. C. (Cmol(+)/Kg)
	Arena	Limo	Arcilla							P	K	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ⁺³	H ⁺	
FW1	39.4	24.6	36.0	Fr-Ar	7.18	0.525	0.0	1.11	0.05	10.1	98.6	7.9	2.5	0.51	--	0.0	0.0	12.4
FW2	40.1	23.5	36.4	Fr-Ar	7.25	0.201	0.0	1.05	0.05	10.1	97.4	7.9	2.5	0.51	--	0.0	0.0	12.3
FW3	45.4	22.6	32.0	Fr-Ar-Ao	7.90	0.188	0.8	0.87	0.04	9.5	112.4	6.6	2.4	0.58	--	0.0	0.0	11.9

Ayacucho, 10 de Octubre del 2016.

LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS
PLANTA, AGUAS Y FERTILIZANTES
RESPONSABLE

Juan B. Girón Molina
C.I.P. 77120

Ao: Arenoso; AoFr: Arena franca; FrAo: Franco arenosos; Fr: Franco; FrL: Franco limoso; L: Limoso; FrArAo: Franco arcillo arenoso; FrAr: Franco arcilloso; FrAr: Franco arcillosos; FrArL: Franco arcillo limoso; ArAo: Arcillo arenoso; ArL: Arcillo limoso; Ar: Arcilloso

Anexo 41. Resultado del análisis de caracterización realizado al suelo del Centro Experimental Canaán, Andrés Avelino Cáceres, 2016;

certificado por el laboratorio de Análisis de Suelo y Análisis Foliar "Nicolás Roulet" del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNSCH



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA
 FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
 PROGRAMA DE INVESTIGACION EN PASTOS Y GANADERIA
LABORATORIO DE SUELOS Y ANALISIS FOLIAR
 Jr. Abraham Valdelomar N° 249 – Telf. 315936 RPM # 151505
 Ayacucho – Perú
 "Año de la Consolidación del Mar de Grau"

Región : Ayacucho
 Provincia : Huamanga
 Distrito : Andrés Avelino Cáceres
 Localidad : Canaán Bajo
 Proyecto : "Tesis"
 Solicitante : Sr. Mario Darwin Orihuela Ascarza

ANALISIS DE CARACTERIZACION

Muestra Hz	Análisis mecánico (%)			Clase Textural	pH (H ₂ O) 1:2.5	C. E. (dS/m.) 1:1	CaCO ₃ (%)	M.O. (%)	Nt (%)	Elementos Disp. (ppm)		Cationes cambiabiles (Cmol(+)/Kg)						C. I. C. (Cmol(+)/Kg)
	Arena	Limo	Arcilla							P	K	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ⁺⁺⁺	H ⁺	
Canaán -01	44.6	24.5	30.9	Fr-Ar	7.61	0.618	0.0	2.49	0.12	12.8	168.9	10.6	5.1	0.86	0.98	0.0	0.0	18.0
Canaán -02	44.5	25.0	30.5	Fr-Ar	7.60	0.600	0.0	2.51	0.12	12.8	169.3	10.8	5.0	0.86	0.97	0.0	0.0	17.9

Ayacucho, 10 de Octubre del 2016.

LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELO:
 PLANTA, AGUAS Y FERTILIZANTES
 RESPONSABLE

 Juan B. Giron Molina
 C.I.P. 77120

Ao: Arenoso; AoFr: Arena franca; FrAo: Franco arenosos; Fr: Franco; FrL: Franco limoso; L: Limoso; FrArAo: Franco arcillo arenoso; FrAr: Franco arcilloso; FrAr: Franco arcillosos; FrArL: Franco arcillo limoso; ArAo: Arcillo arenoso; ArL: Arcillo limoso; Ar: Arcilloso

Anexo 42. Resultado del análisis de caracterización realizado al suelo de la Comunidad de Luyanta, Socos, 2016; certificado por el

laboratorio de Análisis de Suelo y Análisis Foliar “Nicolás Roulet” del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNSCH



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
PROGRAMA DE INVESTIGACION EN PASTOS Y GANADERIA
LABORATORIO DE SUELOS Y ANALISIS FOLIAR
Jr. Abraham Valdelomar N° 249 – Telf. 315936 RPM # 966942996
Ayacucho – Perú

"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

Región : Ayacucho
Provincia : Huamanga
Distrito : Socos
Comunidad : Luyanta - CC. PP. Santa Rosa de Cochabamba
Proyecto : "Tesis"
Solicitante : Sr. Mario Darwin Orihuela Ascarza

ANALISIS DE CARACTERIZACION

Calicata	Análisis mecánico (%)			Clase Textural	pH (H ₂ O) 1:2.5	C. E. (dS/m.) 1:1	CaCO ₃ (%)	M.O. (%)	Nt (%)	Elementos Disp. (ppm)		Cationes cambiabiles (Cmol(+)/Kg)						C. I. C. (Cmol(+)/Kg)
	Arena	Limo	Arcilla							P	K	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺	H ⁺	
01	66.7	14.6	18.7	Fr-Ao	8.59	0.468	2.25	1.90	0.09	15.2	166.8	4.3	0.1	0.85	-,-	0.0	0.0	6.5
02	64.3	17.2	18.5	Fr-Ao	8.43	0.450	2.10	1.90	0.09	15.0	167.2	4.1	0.1	0.86	-,-	0.0	0.0	6.4

An

Ayacucho, 12 de Octubre del 2016.

LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELO,
PLANTA, AGUAS Y FERTILIZANTES
RESPONSABLE
Juan E. Grón Molina
Juan E. Grón Molina
C.I.P. 77120

Ao: Arenoso; AoFr: Arena franca; FrAo: Franco arenosos; Fr: Franco; FrL: Franco limoso; L: Limoso; FrArAo: Franco arcillo arenoso; FrAr: Franco arcilloso; FrAr: Franco arcillosos; FrArL: Franco arcillo limoso; ArAo: Arcillo arenoso; ArL: Arcillo limoso; Ar: Arcilloso

. Temperatura máxima, media, mínima, correspondiente a la campaña agrícola 2016, registrado en la Estación Meteorológica INIA – Ayacucho.

