

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Departamento Académico de Ciencias Agrarias



IDENTIFICACION DE MICORRIZAS

VESICULO-ARBUSCULARES EN ESPECIES AGRICOLAS

Y FORESTALES EN LA ZONA DE TINGO MARÍA

TESIS

Para optar el título de

INGENIERO AGRÓNOMO

MÁXIMO VIDAL VEGA MIRANDA

TINGO MARÍA – PERÚ

2011



P34

V37

Vega Miranda, Máximo V.

Identificación de Micorrizas Vesículo-Arbusculares en Especies Agrícolas y Forestales
En la Zona de Tingo María. Tingo María, 2011

64 h.; 5 cuadros; 6 fgrs.; 40 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. Agrónomo) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María
(Perú). Facultad de Agronomía.

1. IDENTIFICACION-MVA 2. ESPECIES AGRICOLAS-FORESTALES 3. FERTILIDAD

- SUELO 4. MICROORGANISMOS-SUELO 5. MEJORAMIENTO-SUELO 6. PERU.

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso que me bendijo
con mi profesión.

A mi querida madre Francisca que en
paz descansa y a mi querido padre
Fortunato, quienes con mucho amor y
sacrificio, formaron en mí, principios
morales y éticos, e hicieron realidad mi
más grande anhelo.

A mis queridos hijos Frank y Carlos,
que significa en cada instante de mi
vida una motivación especial; a Ana
María, Madre de mis hijos.

A mis hermanos Justo, Margarita,
Hugo, Roger y Rolando, por su
invalorable apoyo durante mis estudios.

“Que Dios bendiga, a todas aquellas personas, que de una u otra forma
hicieron posible culminar con éxito mi carrera profesional”

AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por su contribución en mi formación profesional.
- A los docentes de la Facultad de Agronomía, que con arduo trabajo y empeño inculcaron sus conocimientos para ser un profesional de éxito.
- Al Dr. Tito Hernández Terrones un excelente profesor y amigo que encamino esta tesis.
- Al Ing. José Olivera Núñez, asesor del presente trabajo.
- A los miembros del Jurado de Tesis: Ing. Manuel Tito Viera Huiman, Ing. M. Sc. Hugo Alfredo Huamaní Yupanqui e Ing. M. Sc. José Wilfredo Zavala Solórzano, por su colaboración en el presente trabajo de investigación.
- Al Ing. Oscar Cabezas Huayllas, por su invaluable apoyo en la presente tesis.
- A Ana María Robles Flores, por su apoyo en la traducción de algunos términos.
- A todos mis amigos que contribuyeron en la ejecución del presente trabajo.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	08
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	10
2.1 De las micorrizas.....	10
2.2 Tipos de micorriza.....	12
2.2.1 Ectomicorizas.....	12
2.2.2 Endomicorizas.....	14
2.2.3 Ectoendomicorizas.....	16
2.3 De las micorrizas vesiculo-arbusculares (MVA).....	17
2.3.1 Distribución.....	17
2.3.2 Rango de hospedantes.....	18
2.3.3 Posición taxonómica.....	20
2.3.4 Morfología.....	21
2.3.5 Principales géneros.....	24
2.3.6 Función de las micorrizas VA.....	32
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.1 Ubicación.....	36
3.2 Zonas de muestreo.....	36
3.3 Proceso de muestreo de suelo y raíces.....	37
3.4 Método de identificación de hongos MVA.....	38
3.4.1 Separación de esporas del hongo MVA.....	38
3.4.2 Proceso de identificación.....	39

3.5	Métodos de identificación de plantas hospederas del hongo	
	MVA	39
3.6	Estudio taxonómico de los hongos MVA	41
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1	De las especies muestreadas	42
4.2	De la presencia de hongos MVA	42
V.	CONCLUSIONES.....	53
VI.	RECOMENDACIONES.....	54
VII.	RESUMEN.....	55
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	56
IX.	ANEXO.....	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1.	Comparación de algunos hongos que forman los tres diferentes tipos de micorrizas, y algunos géneros de especies forestales asociados	13
2.	Ubicación de las zonas de muestreo de raíces de especies forestales y agrícolas para el aislamiento de hongos micorríticos MVA	37
3.	Número de especies agrícolas y forestales muestreadas en las seis zonas.....	42
4.	Géneros de hongos MVA asociados a plantas agrícolas, forestales y otros usos obtenidos en las seis zonas de muestreo (octubre 1988 y enero 1989)	43
5.	Géneros de micorrizas vesículo-arbusculares en especies vegetales identificados en Tingo María	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.	<i>Acaulospora</i> sp. A. Espora completa. B. Detalle de la composición de la pared, incluida la cicatriz. C. Espora completa unida al sáculo.....	26
2.	<i>Gigaspora</i> sp. A. Espora completa con célula suspensoria; B. Detalle de la célula bulbo; C. Reacción de Melzer positiva observada en forma parcial en la pared externa de la espora	27
3.	<i>Glomus</i> sp. A. Grupo laxo de esporas con una capa de mucilago externo. B. Esporas con hifas sin septas. C. Detalle de la conexión hifal y la composición de la pared esporal.....	29
4.	<i>Entrophospora</i> sp. A. Espora rota donde se aprecian las diferentes paredes; B. Espora unida al sáculo esporal y en posición distal a este se aprecia la segunda cicatriz; C. Detalle de la composición de la pared esporal.....	31
5.	Número (A) y porcentaje (B) de especies vegetales asociados a cantidad de géneros de hongos MVA	51
6.	Número (A) y porcentaje (B) de géneros de hongos MVA asociados a especies vegetales.....	52

I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha intentado cambiar en el ámbito global los paradigmas de la producción agrícola que implicaban el uso intensivo de energía, maquinaria, fertilizantes, y pesticidas por un nuevo concepto, el de la agricultura sustentable. Ese nuevo paradigma es un “sistema integrado de prácticas de producción vegetal y animal que a largo plazo debe satisfacer las necesidades humanas de fibra y alimentos, mejorar la calidad ambiental y la base de recursos naturales de los cuales depende la economía agrícola, hacer un uso eficiente de los recursos no renovables sostener la viabilidad económica de las actividades agrícolas y aumentar la calidad de vida de los agricultores y de la sociedad como un todo” (JEFFRIES y BAREA, 2001).

El aprovechamiento sustentable de los recursos incluye el componente microbiológico del suelo, básico en los procesos de transformación y uso de los nutrientes por parte de las diferentes especies vegetales. Dentro de la gran diversidad de los microorganismos existentes en el suelo y sus diferentes interacciones, los hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares (MVA), destacan por el papel clave que juegan en los ciclos de nutrientes del ecosistema y en la protección de las plantas frente a diferentes tipos de estreses. Estos hongos, también permiten aumentar el área de exploración de las raíces en el suelo, mejorando la absorción de nutrientes y de agua. Favorecen además, la agregación de las partículas minerales y orgánicas del suelo, colaborando eficazmente para minimizar la pérdida de suelo en los procesos de erosión.

Los hongos formadores de micorrizas son nativos de todos los suelos tropicales y de todos los ecosistemas terrestres; por ello, se considera necesario incluir estos microorganismos simbiotes en el diseño de cualquier sistema de producción agrícola, forestal o pecuaria ya que su presencia garantiza la fertilidad de los suelos y son indicadores de excepción de la salud de los agroecosistemas. A pesar de la importancia de estos microorganismos para la producción y sostenibilidad de dichos sistemas, hay poca información nacional sobre la presencia de estos simbiotes y su relación con las especies vegetales locales.

Teniendo en cuenta las consideraciones antes mencionadas se ha planteado el presente trabajo, con el objetivo siguiente:

- Identificar a nivel de género los hongos que forman la asociación de micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) en especies vegetales agrícolas y forestales en Tingo María.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. De las micorrizas

El termino micorriza proviene de la palabra griega: Mykes = Hongo, Rhiza = raíz, se refiere a la relación existente entre un hongo y las raíces de una planta (ZAMBOLIM y SIQUEIRA, 1985). Las micorrizas es una asociación simbiótica no patogénica o ligeramente patogénica de un hongo y las raíces de una planta HAWKSWORTH, *et al.* (1995). Es una simbiosis mutualista entre las plantas y los hongos localizados en la raíz o en una estructura similar a la raíz en la cual se mueve energía de la planta al hongo y recursos inorgánicos del hongo a la planta BONFANTE– FASOLO (1984). Se considera a la micorriza como una asociación mutualística altamente evolucionada que se establece entre hongos del suelo y las raíces de las plantas BRUNETT *et al.*, (1985).

El término “micorriza” no establece con claridad que la relación es entre dos organismos completos e independientes en la que sus demás órganos (estructuras reproductoras y micelio de los hongos y tronco corona de los árboles) son incorporados en la simbiosis. Tomando como punto de partida lo anterior, propone la adopción del término micodendron (mykodendron) – acuñado por Becker en 1994- que se aplica para describir los dos organismos, hongo y árbol, los cuales constituyen una entidad fisiológica única sobre las bases de una simbiosis obligatoria que da lugar a una micorriza sobre la raíz de los árboles. Esta propuesta se debe a que el término mycodendron (del Griego mykes = hongo y dendron = árbol) toma en cuenta la relación estrecha entre ambos organismos, por lo que considera que debe usarse en el futuro para

describir a la simbiosis que se establece entre árboles y hongos (ALLEN, 1993).

Frank en 1887, describió dos tipos de micorrizas, a los que llamó: ectotrófico y endotrófico. La clasificación actual de los diferentes tipos de micorrizas evita el empleo sufijo "trófico" y reconoce los siguientes tipos: Ectomicorrizas, Vesicular-Arbusculares (MVA), Ericoides, Orchidáceas, Arbutoides y Monotroides (Lewis 1973 citado en HAWKSWORTH *et al.*, 1995).

Otros investigadores lo describen en tres tipos de micorrizas en base a la anatomía de las raíces de las plantas colonizadoras en: ectomicorrizas, endomicorrizas y un grupo intermedio denominado ectoendomicorrizas (VILAR *et al.*, 2000).

Todas las definiciones precisan la existencia de un beneficio recíproco de ambos simbioses, indica que la planta suministra la fuente de carbono y un nicho ecológico, ejerciendo las raíces un efecto homeostático para el hongo, comparado con las condiciones que se presentan en el suelo. El hongo por su parte, aporta nutrientes minerales especialmente los poco móviles como fósforo, zinc, cobre y amonio, absorbidos de la solución del suelo por medio de las hifas (2 μm de diámetro) que exploran los poros del suelo donde no pueden penetrar las raíces de (200 μm en diámetro); además, las hifas de absorción se asocian a la materia orgánica del suelo donde la mineralización ocurre. Las plantas micorrizadas tienen ventajas sobre las no micorrizadas porque el micelio externo se extiende a mayor distancia de los pelos radiculares. Además, les imparten otros beneficios como: mejoran la agregación del suelo, aumentan la

fijación del suelo, incrementan la tasa fotosintética, reducen la proporción raíz: parte aérea, aumenta la actividad microbiológica del suelo, aumentan la fijación de nitrógeno por las bacterias simbióticas, incrementan la resistencia a enfermedades, y estrés ambiental, estimulan la actividad de las sustancias reguladoras de crecimiento, aumentan la tolerancia a la sequía y son mediadores de muchas acciones e interacciones de la microflora y microfauna, que ocurre en el suelo alrededor de las raíces. Todas las principales plantas terrestres del planeta forman algún tipo de micorriza (BLANCO y SALAS, 1997).

2.2. Tipos de micorrizas

Aunque no existe una única forma de agrupar los diferentes tipos de micorrizas, en el presente manuscrito se empleará lo propuesto por VILAR *et al.* (2000) quien clasifica a las micorrizas en: ectomicorrizas, endomicorrizas y ectoendomicorrizas; esta clasificación es adoptado en muchos reportes bibliográficos que se realizan sobre este tema (Cuadro 1).

2.2.1. Ectomicorrizas

Las ectomicorrizas pueden ser fácilmente reconocidas por la característica cubierta fúngica o manto que envuelve a las raíces activas; a menudo el micelio fúngico, o crecimiento de moho en forma de fibra, puede ser visto emergiendo directamente del manto y colonizando el suelo o el sustrato de enraizamiento. Cuando una ectomicorriza es seccionada y su anatomía interna es examinada bajo el microscopio, es posible ver la segunda característica principal de las ectomicorrizas: el crecimiento intercelular del

Cuadro 1. Comparación de algunos hongos que forman los tres diferentes tipos de micorrizas, y algunos géneros de especies forestales asociados.

Topos de micorriza	Hongo involucrado		Especie forestal normalmente asociado
	Clase	Género representativo	
Ectomicorrizas	Basidiomycetes	<i>Boletus, Suillus, Leccinum, Tricholoma, Russula, Amanita, Rhizopogon, Hymenogaster, Gauteria, Hysterangium, Paxillus, Lactarius, Gastrobolutus, Martella y Scleroderma</i>	<i>Fagus sp., Cotinarius, Betula sp., Pseudotsuga Menziesii, Eucaliptos spp. Corylus spp. Tsuga spp. Larix spp., Qersus spp. Pinus spp. Populus spp. Picea spp. y Salix spp</i>
	Ascomycota	<i>Tuber, Genea, Elephomyces Hydnotrya, Geopora, Balsamia, Sphaerosporella y Cenococcum,</i>	<i>Fagus sp., Betula sp., Pseudotsuga menziesii, Eucaliptos spp., Corylus spp Qersus spp. Populus spp Picea sp. y Salix spp</i>
Ectoendomicorrizas	Zygomycetes	<i>Endogone</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>
	Ascomycetes	<i>Phialophora y Cloridium</i>	<i>Betula sp., Pinus spp. y Picea spp.</i>
Endomicorrizas	Zygomycetes	<i>Acaulospora, Endogone, Entrophospora, Gigaspora, Glomus, Sclerocystis y Scutellospora.</i>	<i>Fraxinus spp. Tilia sp. Taxodium distichum, Chamaecyparis sp. Thuja sp. Eucaliptos sp. Sequoiadendron giganteum, Acer sp. y Planatus spp.</i>

Fuente: Elaborado a partir de HAWKSWORTH, *et al.* (1995) y HALL (1984).

hongo entre las células epidérmicas y corticales, que forma la red de Hartig. En el interior de esta extensiva zona de contacto entre hongo y células radiculares, es donde se realiza el intercambio de los nutrientes y el agua entre el hongo y el hospedante; el hongo trae y libera los nutrientes y el agua hacia su hospedante, recibiendo a cambio azúcares y otros productos de la fotosíntesis generados por la planta (BOWEN, 1980; MOSSE and HAYMAN, 1980).

Los hongos que forman las ectomicorrizas son principalmente los Basidiomycetes y los Ascomycetes, incluyen muchos géneros de los Basidiomycetes como *Amanita*, *Boletus*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Scleroderma*, *Suillus* y *Tricholoma*, y Ascomycetes como *Cenococcum* y *Tuber*. Estos géneros están asociados al grupo de especies de coníferas de la familia *Pinaceae*, y latifoliadas de las familias *Fagaceae* y *Betulaceae*. Las ectomicorrizas son relativamente poco frecuentes en la naturaleza, sólo un 3 a 5% de las plantas terrestres establecen este tipo de simbiosis (BOWEN, 1980; SÁNCHEZ, 1981).

2.2.2. Endomicorrizas

Se caracterizan por la penetración del hongo inter e intracelularmente, la ausencia de manto y las acentuadas modificaciones anatómicas en las raíces no visibles a simple vista (TRAPPE, 1982).

Dentro de las endomicorrizas se distinguen varios subtipos: vesículo-arbusculares, ericoides, orchidáceas, ectendomicorriza, arbutoides, y los monotropoides (SIEVERDING, 1983). El sub grupo importante desde el

punto de vista de producción agrícola y forestal son los vesículo-arbusculares comúnmente simbolizados como VA o MVA.

2.2.2.1. Vesículo-arbuscular (VA o MVA)

Las micorrizas vesículo-arbusculares (VA), son muy diferentes de las ectomicorrizas: no modifican la morfología radicular y los componentes del hongo son invisibles a simple vista. Las raíces deben ser teñidas y observadas bajo el microscopio para verificar su estructura y el grado de colonización en la raíces. Como está implicado en el nombre, dos estructuras caracterizan a las micorrizas VA, las vesículas y los arbusculos. Las vesículas son estructuras en forma de un balón, usualmente compuestas de lípidos (gotitas de aceite), que sirven tanto de órganos almacenamiento de energía, como de estructuras reproductivas. Los arbusculos son estructuras finamente ramificadas, intracelulares, de vida corta, que sirven tanto de sitios para el intercambio de nutrientes con su hospedante. Este tipo de micorrizas además tienen abundantes micelios que se ramifican a través de la corteza de la raíz y se extienden hasta el suelo. Se presentan en todo tipo de plantas, aunque predominan en hierbas y gramíneas. Abundan en suelos pobres como los de las praderas y estepas, la alta montaña y las selvas tropicales. En el bosque atlántico aparecen junto a las ectomicorrizas (WALKER, 1992).

En este tipo de micorriza se encuentra asociado a hongos de la clase de los *Zygomycetes*, orden *Glomales* y *Endogonales* (TRAPPE, 1982 y HAWKSWORTH *et al.*, 1995).

2.2.2.2. Micorrizas ericáceas (ericoides)

Son del grupo de hongos Ascomycetos, afectan a las plantas del orden Ericales, que son plantas leñosas arbustivas que viven en suelos ácidos y pobres en nutrientes; también afectan a plantas del orden *Monotropaceae* (HAWKSWORTH *et al.*, 1995).

2.2.2.3. Micorrizas orchidaceas

Están formadas principalmente por el hongo *Rhizoctonia solani* y afectan a las plantas de la familia *Orchidiaceae* (HAWKSWORTH *et al.*, 1995). Son también denominados micorrizas de orquídeas, los cuales son imprescindibles para su desarrollo y vida juvenil. Una vez que la planta crece y fotosintetiza se independiza del hongo.

2.2.3. Ectoendomicorrizas

También llamados ectendomicorrizas, generalmente presentan las características de ectomicorrizas, con la diferencia que hay penetración intracelular. Algunos autores los clasifican como endomicorrizas, mientras que otros, basándose en la cercanía filogenética de los hongos asociados con los Ascomycota y Basidiomycota, las ubican como ectomicorrizas. Estas se encuentran en algunos subgrupos de Pinaceae y de Ericales, como los géneros *Arbutus* (SÁNCHEZ, 1981).

2.3. De las micorrizas vesículo-arbusculares (VA o MVA)

Varios autores coinciden en definir a las MVA como asociaciones mutualistas entre un hongo y las raíces de la planta, en la que ambos miembros de la asociación se benefician y participan activamente en el transporte y absorción de nutrientes, influyendo tanto en la estructura como en la estabilidad de las comunidades vegetales (BLANCO y SALAS, 1997). En la asociación mutualista que se establece con la micorriza, el hongo coloniza biotróficamente la corteza de la raíz, sin causar daño a la planta, llegando a ser, fisiológica y morfológicamente, parte integrante de dicho órgano. A su vez, la planta hospedera proporciona al hongo simbionte (heterótrofo), compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis, y un hábitat ecológico protegido (BONFANTE-FASOLO, 1984).

2.3.1. Distribución

Los VA son las micorrizas de mayor distribución mundial, tanto por el gran número de los posibles hospederos, como por su distribución geográfica, puesto que han sido reportados desde la Amazonía donde son predominantes, hasta el Ártico sobre un extenso rango de pisos ecológicos (HAWKSWORTH *et al.*, 1995; POWELL and BAGYARAJ, 1984). Generalmente hay menos infestación de MVA en los suelos anegados pero probablemente que estos tejidos de las raíces están más infestados por MVA que cualquier otro hongo (HARLEY and SMITH, 1983).

En los trópicos las endomicorrizas arbusculares son diez veces más abundantes que las ectomicorrizas y en la mayoría de las especies

vegetales donde se reportan, se establece que más del 90% de las especies existentes en el planeta están micorrizadas cuando crecen en condiciones naturales (SÁNCHEZ, 1981).

2.3.2. Rango de hospedantes

El 97% de las fanerógamas, incluidas casi todas las especies de interés agronómico, pastoril y selvático, presentan este tipo de asociaciones (CASTELLANO and BOUGHER, 1994).

Varios autores reportan que las endomicorrizas predominan en las plantas herbáceas, muchas de ellas de interés agrícola, como trigo, maíz, legumbres, verduras, entre otras, en algunas leñosas, como naranjos, manzanos, cerezos, ciruelos y árboles más comunes (CASTELLANO and BOUGHER, 1994; WALKER, 1992).

Sólo se ha reportado ausencia en familias como *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Fumariaceae*, *Pinaceae*, *Caryophyllaceae*, *Caparceae*, *Cruciferae*, *Chenopodiaceae*, *Commelinaceae*, *Cyperaceae*, *Juncaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolaccaceae*, *Portulacaceae*, *Proteaceae*, *Resitonaceae*, *Urticaceae*, *Zypophyllaceae* y *Betulaceae* (ZAMBOLIM y SIQUEIRA, 1985). Sin embargo, Williams, *et al.* en 1975 reportaron la infección en algunas Cruciferaceas y Chenopodiaceas (MOSSE and HAYMAN, 1980).

En Sri Lanka demostraron la presencia de micorrizas en 63 especies forestales pertenecientes a 26 familias, 59 de las especies

examinadas fueron infectadas por el hongo MVA y una sola familia fue infectada por ectomicorrizas (DE ALWIS and ABEYNAYAQUE, 1980).

En Brasil establecen una similar asociación micorrizal en plantas, 56 especies fueron establecidos por tener una asociación micorrizal endotrófica y en 2 especies con asociaciones micorrizal ectotróficas (ZAMBOLIM y SIQUEIRA, 1985).

En Cuba para determinar el micotrofismo de plantas se colectaron raíces de 75 especies pertenecientes a 37 familias, de esas una familia no presentó simbiosis (Polygonaceae) esas especies vegetales infestadas como el hongo MVA pertenecieron incluso a la familia *Cyperaceae* y hasta la especie *Eucaliptos* spp. (HERRERA, 1985).

La predominancia de un género del hongo MVA de una determinada región es diferente a otra. En Viscosa y Minas Gerais realizaron levantamientos de la presencia del hongo MVA, el género que predominó fue *Acaulospora* continuado por *Glomus* y escasamente se encontraron *Gigaspora* y *Sclerocystis* (ZAMBOLIM y SIQUEIRA, 1985).

En un estudio realizado sobre la presencia de hongos MVA en caña de azúcar en el valle de Cauca, Colombia se identificaron 24 especies, de ellas 17 pertenecieron al género *Glomus*, 2 a *Sclerocytis*, 2 a *Acaulospora*, y 2 a *Gigaspora* (PEÑA *et al.*, 2006).

2.3.3. Posición taxonómica

Según HAWKSWORTH *et al.* (1995) y MORTON and BENNY (1990), las micorrizas vesículo-arbusculares se clasifican en:

División	:	Zygomycota
Clase	:	Zygomycetes
Orden	:	Glomales
Suborden	:	Glomineae
Familia	:	Glomaceae
Géneros	:	<i>Glomus</i> spp. <i>Sclerocystis</i> spp. <i>Akermannia</i> spp. <i>Rhizophagus</i> spp. <i>Sphaerocreas</i> spp. <i>Stigeosporium</i> spp. <i>Xenomyces</i> spp.
Familia	:	Archaeosporaceae
Géneros	:	<i>Archaeospora</i>
Familia	:	Paraglomaceae
Géneros	:	<i>Paraglomus</i>
Familia	:	Acaulosporaceae
Géneros	:	<i>Acaulospora</i> spp. <i>Entrophospora</i> spp.
Suborden	:	Gigasporinae
Familia	:	<i>Gigasporaceae</i>
Géneros	:	<i>Gigaspora</i> spp. <i>Scutellospora</i> spp.

Recientes estudios filogenéticos basados en el análisis molecular de las secuencias SSU del ARNr, indican que los Glomales tienen un origen monofilético y comparten ancestros con Basidiomycota y Ascomycota pero no con Zygomycota, por lo que se está considerando agruparlos dentro de un nuevo phylum denominándose Glomeromycota (SCHÜBLER *et al.*, 2001)

2.3.4. Morfología

El hongo MVA causa pocos cambios a la planta (MOSSE and HAYMAN, 1980). Estos cambios anatómicos y citológicos a simple vista no son reconocibles y solo en algunas plantas como cebollas u otra Liliaceae, maíz, las raíces micorrizadas pueden ser reconocidas por un color amarillo en comparación con los no infectados con el hongo MVA (BONFANTE-FASOLO, 1984).

Las estructuras características del hongo MVA se les pueden dividir en externas e internas.

2.3.4.1 Estructuras externas

Aquellas que mayormente se encuentran fuera de la raíz del hospedero (BONFANTE-FASOLO, 1984).

Esporas: Este término se usa para referirse a las clamidosporas, esperocarpos y azigosporas, las que son producidas por un sistema micelial frecuentemente externo (BONFANTE-FASOLO, 1984) o dentro de la raíz hospedera (GIANINAZZI and DIEMS, 1982). Por tratarse de una estructura de diagnóstico para su identificación se describe en forma detallada de cada uno de ellos, más adelante. Estas esporas pueden supervivir en el suelo bajo condiciones de laboratorio por algunos años. El tamaño de las esporas se sitúa entre 35 μm y 400 μm (14), y entre 100 - 600 μm (HERRERA, 1985).

Hifas externas: En estas hifas extramatriciales nacen esporas en el suelo circundante. Estos micelios son dimorfos, una porción principal comprende de ásperas y gruesas paredes, con hifas generalmente aseptadas y numerosas hifas de pared delgada altamente ramificadas el cual se convierten septadas al madurar (BONFANTE-FASOLO, 1984).

Las hifas extramatriciales del hongo MVA oscilan entre 1 y 6% del peso fresco de las raíces micorrizadas. La función de estas hifas externas es invadir y explorar el suelo, absorbiendo nutrientes minerales y traslocarlo a la planta hospedera (GIANINAZZI and DIEMS, 1982).

Vesículas externas: Estas estructuras generalmente se encuentran dentro de las células corticales, pero también se encuentran fuera de ellos. Estos son de forma lobulada e irregular, varían de tamaño de 20 a 150 μm en diámetro, son de pared gruesa con un denso contenido citoplasmático rico en lípidos que con la edad se vuelven vacuolados (BONFANTE-FASOLO, 1984; ZAMBOLIM y SIQUEIRA, 1985).

2.3.4.2 Estructuras internas

Estas estructuras se encuentran invadiendo intra e intercelularmente células corticales de raíz del hospedero.

Hifas internas: Son septadas cuando están vacíos, son raras estas septas en hifas activas. Estas hifas se ramifican en forma paralela o perpendicular (en forma de H) a la disposición de las células corticales probablemente dividido en dos direcciones, también uniones en forma de "Y",

cuyos diámetros están de 2 a 6 μm con excepción de los endositos finos que son menor de 2 μm , las hifas dan origen a vesículas y arbusculos según Abbott y Robson citados por BONFANTE – FASOLO (1984).

Arbusculos: Es la estructura más importante del complejo MVA se desarrollan intracelularmente en las células corticales formando ramificaciones dicotómicas; las hifas se convierten en un tronco arbuscular como ramas terminales, también bifurcadas en un aglomerado de pequeños filamentos (ZAMBOLIM y SIQUEIRA, 1985). Este arbusculo, cuando llegan a desarrollarse totalmente poseen un diámetro menor a 1.0 μm .

El tiempo de vida de los arbusculos está entre 4 y 5 días después colapsan. Es el lugar en donde se realizan el intercambio metabólico del carbono y fósforo y otros nutrientes minerales entre la planta y el hongo (BONFANTE-FASOLO, 1984). Los arbusculos ocupaban el 1% del volumen de las raíces en cebolla según Cox y Tinker (BONFANTE- FASOLO, 1984).

Vesículas internas: Se desarrollan inter o intracelularmente en las células corticales, tienen forma oval o piriforme que se forman a lo largo de las extremidades de las hifas (ZAMBOLIM y SIQUEIRA, 1985). Las vesículas varían en sus dimensiones siendo estas en un rango de 30 a 100 μm . Al madurar las vesículas están ocupadas por glóbulos visibles de lípidos, funcionando como órgano de reserva del hongo micorriza vesiculo-arbuscular (BONFANTE-FASOLO, 1984).

2.3.5. Principales géneros

La identificación de los hongos MVA está basado en la observación de sus características morfológicas de su micelio que se producen tanto en el suelo como en el hospedero (GIANINAZZI and DIEMS, 1982; MOSSE and BOWEN, 1968; MOSSE and HAYMAN, 1980; SIEVERDING, 1985a; TRAPPE, 1982), y la formación de esporocarpos o clamidosporas y esporas que son producidos por *Glomus* y *Sclerocystis* y zygosporas que son producidos por los géneros *Acaulospora* y *Gigaspora* (TRAPPE, 1982).

2.3.5.1. *Acaulospora*

Espora: Globosa o subglobosa, de 100-400 μm de diámetro, de color blanco, café rojizo oscuro, al estereoscopio, y blanca o amarilla oliva al microscopio. Al estereoscopio es posible apreciar la ornamentación de la espora, pues la superficie se observa como irregular. La hifa adherida a la espora es de forma ahusada con el ápice inflado y globoso llamado vesícula, cuya espora está en la parte lateral (TRAPPE, 1982). Las esporas (zygosporas) empiezan a desarrollarse a partir de la vesícula, a medida que la espora va llegando a su madurez en la vesícula se produce un colapso celular, por tanto espora adopta una posición amorfa sin ningún signo de origen a excepción de un pequeño poro (TRAPPE, 1982).

Paredes de la espora: Formada por dos grupos de paredes fácilmente distinguibles: La primera unidad, la más externa, está formada por una pared hialina remanente del sáculo la cual no ha sido

observada. Seguidamente aparece una pared laminada, que le confiere el color a la espora, ornamentada con proyecciones *Tuberculares* de 1 μm de ancho y de 1.5 a 3.5 μm de alto, con terminación redondeada convexa, semejando la forma de dientes. Esta ornamentación forma un patrón rugoso sobre la superficie de la espora similar a la piel de naranja que al unirse muchas veces genera un segundo patrón que se aprecia como hexágonos unidos. Una segunda pared aparece debajo de la pared laminada, muy pegada a esta. Es de color más claro, delgada, flexible, no mayor a 2 μm de espesor. El segundo grupo de paredes está formado por dos paredes denominadas germinales, de las cuales la que fácilmente se evidencia es una transparente, de 2 μm de espesor, la cual posee una superficie rugosa o "beaded", seguida por una pared interna, membranosa, transparente, que tiende a arrugarse y es la que contiene el citoplasma de la espora. Las paredes de la espora son de color hialino, amarillo, marrón, verde grisáceo que se encuentran en todo hospedero de micorriza VA (GERDEMANN and TRAPPE, 1975; TRAPPE, 1982).

Cicatriz: Difícil de observar por la ornamentación de la espora. Pero cuando se observa aparece como una marca ovoide de 9-16 μm de diámetro, que aparece en una de las zonas donde no hay ornamentación.

Reacción Melzer: La pared más interna reacciona tornándose roja o rosada.

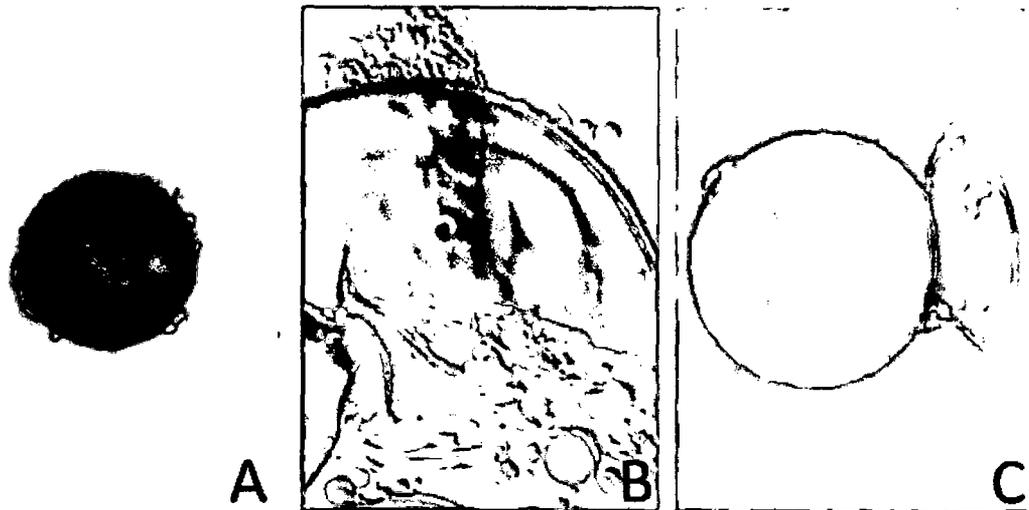


Figura 1. *Acaulospora* sp. A. Espora completa. B. Detalle de la composición de la pared, incluida la cicatriz. C. Espora completa unida al sáculo. Tomado y modificado de PEÑA *et al.* (2006).

2.3.5.2. *Gigaspora*

Espora: Globosa, grande, de 200 a 240 μm de diámetro, opaca, de color amarillo pálido a amarillo (HALL, 1984; TRAPPE and SCHENCK, 1982). La forma de las esporas son globosas y sub-globosas (GERDEMANN and TRAPPE, 1975).

Paredes de la espora: Se distinguen dos paredes que forman un único grupo: una externa, laminada, con colora de 5 micras de espesor, y una pared interna más clara, rígida de 2 μm de espesor (TRAPPE, 1982).

Célula suspensoria: Con forma de perilla, de 60 μm de largo por 40 en su parte más ancha. El punto de conexión con la espora es

de 8 μm . La pared de la célula suspensoria está formada por la continuación de la dos paredes de la espora. Hacia la parte más distal la pared interna se adelgaza, quedando solo la externa que se prolonga hacia la hifa. La pared de la hifa es de 2 μm de espesor. El ancho total de la hifa es de 14 μm de espesor (GERDEMANN and TRAPPE, 1975).

Células auxiliares: Desconocidas.

Reacción Melzer: La pared externa se torna rojo intenso a vino tinto (TRAPPE, 1982).

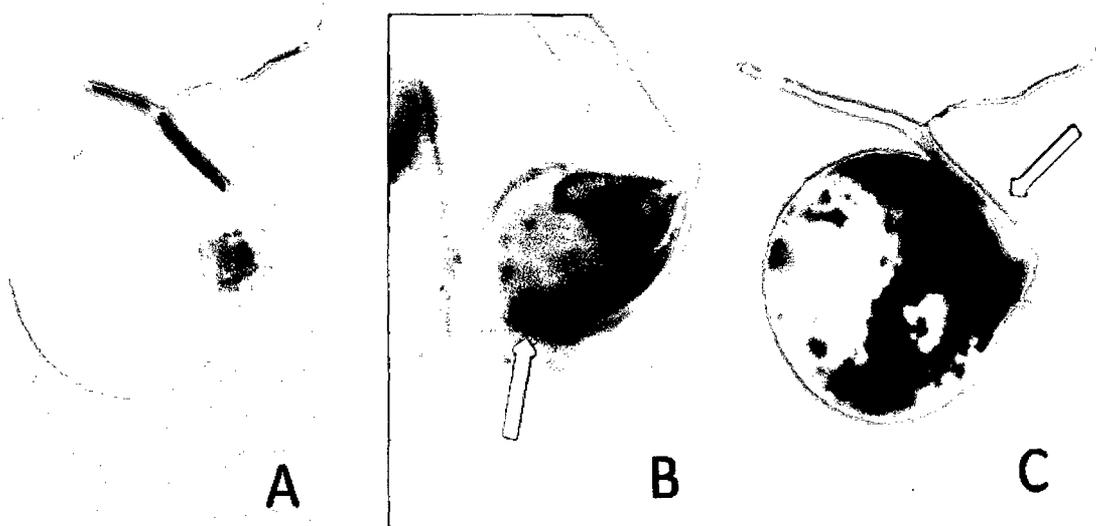


Figura 2. *Gigaspora* sp. A. Espora completa con célula suspensoria; B. Detalle de la célula bulbo; C. Reacción de Melzer positiva observada en forma parcial en la pared externa de la espora. Tomado y modificado de PEÑA *et al.* (2006).

2.3.5.3. *Glomus*

Esporas: Generalmente globosas, algunas irregulares, pequeñas, de 40-70 μm en diámetro, de color hialino, amarillo, negro, de marrón amarillento a rojizo o anaranjado al estereoscopio. Se organizan en esporocarpos laxos de uno más de 20 esporas. Aun cuando se reporta que forman grupos de más de 100 esporas (KOSKE, 1984), Las esporas se unen frágilmente entre sí, a través de conexiones hifales múltiples. Fácilmente se observan una o dos conexiones hifales similares en cada espora (SIEVERDING, 1985a). Las esporas cuando están maduras contienen un líquido aceitoso a manera de gotas de tamaño variable (GERDEMANN and TRAPPE, 1975). La germinación ocurre ya sea por hifa subtendiente y pocas veces por la pared de la espora (HALL, 1984).

Paredes de la espora: Forman un solo grupo grueso de paredes, la pared mas externa es laminada de 4 μm de espesor que le da el color a la espora. Generalmente con restos de hifas en la superficie o conexiones hifales. La forma es globosa, elipsoides o reniforme; de superficie lisa o áspera deslucido, escamoso o sin escama, verrugoso con espinas delgadas (TRAPPE, 1982).

Conexión hifal: Las esporas pueden presentar más de una conexión hifal, esta puede ser sencilla o doble. La conexión hifal es gruesa, de 5-6 μm de ancho, estrecha hacia la base de la espora, puede o no formar septa, la que es formada por engrosamiento de la pared interna. La pared de la

hifa es de color más claro que la espora y tiende a adelgazarse al alejarse de la base de la espora (GERDEMANN and TRAPPE, 1975).

Reacción Melzer: Ninguna en la mayoría de especies.

Sin embargo, en algunos puede reaccionar formando un color púrpura claro (SIEVERDING, 1985b)

Distribución: Se encuentran distribuidas por todo el mundo (GERDEMANN and TRAPPE, 1975).

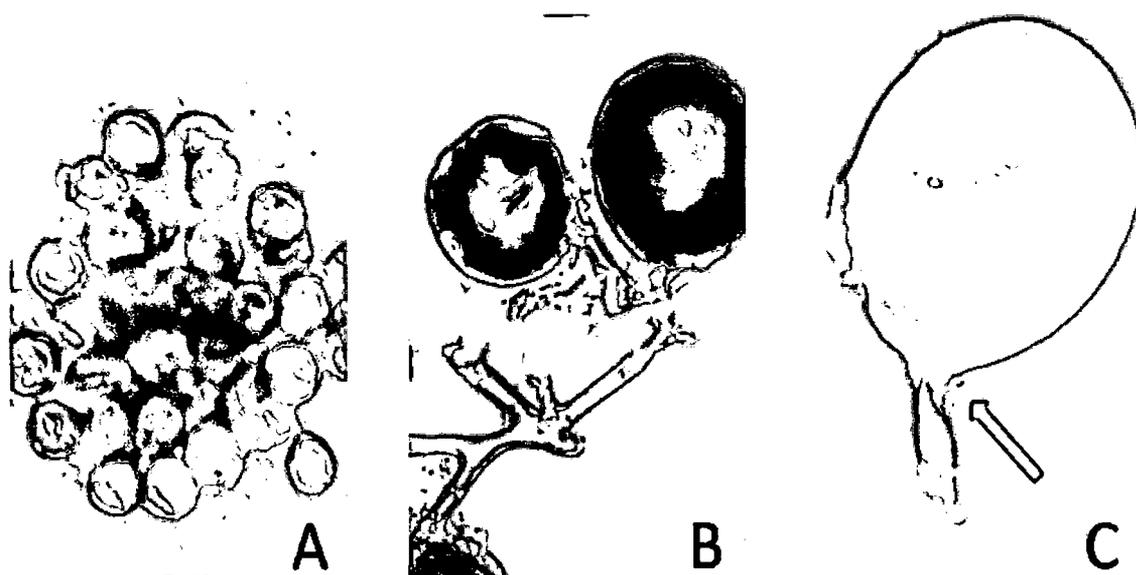


Figura 3. *Glomus* sp. A. Grupo laxo de esporas con una capa de mucilago externo. B. Esporas con hifas sin septas. C. Detalle de la conexión hifal y la composición de la pared esporal. Tomado y modificado de PEÑA *et al.* (2006).

2.3.5.4. *Sclerocystis*

Se forma clamidosporas en esporocarpos dando lugar a manera de una capa muy poblada de esporas erectas que rodean al plexo central de la hifa gleval (HALL, 1984; TRAPPE, 1982).

La forma de las esporas son elipsoidales o ovoides o subglobosas, ampliamente o estrechamente claviforme (SIEVERDING, 1985a).

El color de la superficie es blanco, gris, amarillo o marrón (TRAPPE, 1982). En algunas especies ocurre en presencia de un peridium en forma de hifa entrelazada (HALL, 1984; TRAPPE, 1982). La formación de esporocarpos puede estar en forma simple en el suelo o funcionando a manera de desechos orgánicos sobre la superficie del suelo (en el trópico), (GERDEMANN and TRAPPE, 1975; TRAPPE, 1982).

2.3.5.5. *Entrophospora*

Espora: Globosa, opaca, de superficie lisa, entre 90-120 μm de diámetro, de color oliva pálido al estereoscopio, y amarillo-oliva al microscopio (HALL, 1984; TRAPPE, 1982).

Paredes de la espora: Posee tres grupos de paredes: la más externa es membranosa, transparente, de menos de 1 μm de espesor. Se continúa con el sáculo, por lo que es más evidente verla cuando se aísla la espora con este. La segunda pared es laminada, de 2 a 4 μm de espesor, de color amarillo. La pared mas interna es transparente, delgada y se aprecia cuando se desprende de la laminada al escachar la espora. Esta pared se

observa como una pared flexible. El grupo de paredes mas internas de tipo germinal está compuesto por una pared de aproximadamente 2 μm de espesor, rugosa en la superficie o "beaded", y una más interna, membranosa que contendría el citoplasma. Cicatrices: Se distinguen claramente dos cicatrices. Una ovoide de 15-30 μm de diámetro y otra ubicada en el lado opuesto de la anterior, más pequeña, circular, de 5 a 10 μm de diámetro (SIEVERDING, 1985a; TRAPPE, 1982).

Reacción Melzer: La pared mas interna reacciona tornándose de color púrpura intenso.

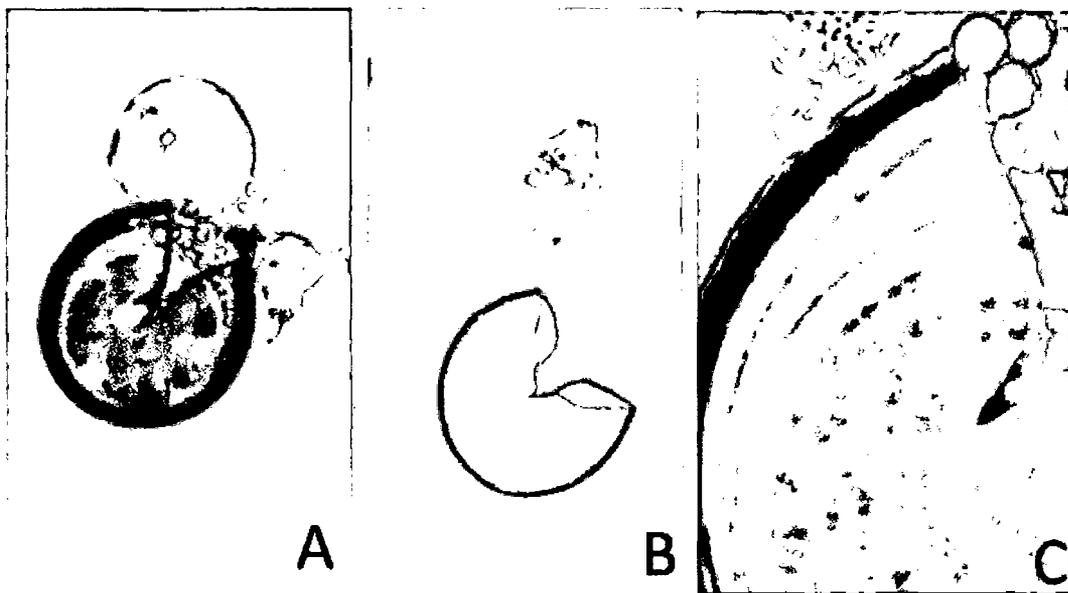


Figura 4. *Entrophospora* sp. A. Espora rota donde se aprecian las diferentes paredes; B. Espora unida al sáculo esporal y en posición distal a este se aprecia la segunda cicatriz; C. Detalle de la composición de la pared esporal. Tomado y modificado de PEÑA *et al.* (2006).

2.3.6. Función de las micorrizas VA

2.3.6.1. Nutrición vegetal

Es un hecho universalmente aceptado que las micorrizas estimulan el crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas, especialmente en suelos de baja y moderada fertilidad; la micorriza beneficia substancialmente la absorción de nutrientes, especialmente de P y de agua por la planta (HARLEY and SMITH, 1983). Los iones más móviles de la solución de suelo, como NO_3 , son más fácilmente accesibles para las raíces absorbentes que los poco móviles como los de P, Zn, Cu y Mo, y en menor grado K y S. La absorción de los iones menos móviles depende del volumen de suelo explorado por el sistema de raíces absorbentes. En este caso, la micorriza tiene ventaja sobre la raíz no micorrizada porque el micelio externo se extiende a mayor distancia que los pelos radiculares (SIEVERDING, 1991).

El papel clave de las micorrizas radica en que las hifas del hongo extienden el campo de absorción de la raíz mas allá de la zona normal de agotamiento radicular (en 1-5 mm.), permitiendo a la raíz incrementar su superficie de absorción y explorar un volumen de suelo mayor del que lo hacen las raíces no micorrizadas, concretamente hasta 7 cm de la superficie radicular. Además se ha logrado poner de manifiesto de que las raíces micorrizadas absorben mas eficazmente los fosfatos que las no micorrizadas y han calculado que en 1 cm de raíz micorrizada posee unos 80 cm de hifas externas (SIEVERDING, 1991).

Hasta aproximadamente la década anterior, la investigación de las micorrizas tuvo un marcado sesgo hacia sus potencialidades para mejorar la nutrición de las plantas; sin embargo, podría no ser la función más importante de las MVA, especialmente en el contexto de la agricultura (BLANCO y SALAS, 1997).

Considerando, que la mayor parte de los suelos tropicales existen limitaciones en la disponibilidad de P para las plantas, la utilidad de las micorrizas en estas condiciones resulta obvia. Cuando el P no es limitante, el beneficio puede ser nulo o reducido, según el grado de dependencia micorrícica de la planta. Además, enfatiza que altos niveles de P inhiben la simbiosis. Los hongos MVA reducen la distancia de nutrientes del suelo a la planta; sus hifas pueden químicamente modificar la disponibilidad de nutrientes para la absorción durante la simbiosis entre la planta y el hongo MVA fue comprobado isotópicamente con P32 (SIEVERDING, 1991).

El rol del hongo MVA con respecto a la absorción de nitrógeno puede ser directo o indirecto, al incrementa la actividad de la nitrogenasa, resultando un aumento en la fijación del N₂ por la bacteria *Rhizobium* (BOWEN, 1980).

Existen conexiones entre plantas por hifas del hongo MVA y a través de esta se realiza la transferencia P y N desde una planta a otra. Asimismo, reportan la absorción de S por las plantas micorrizadas. Las plantas infestadas contenían concentraciones superiores de Cu y Zn. Además,

de esos elementos incrementados como el Ca, Mg, Na, Fe, Mn, B, Al son también fijados por este tipo de hongos (ALLEN, 1993).

Las concentraciones de potasio se incrementan en plantas infectadas con el hongo MVA (SIQUEIRA *et al.*, 1984). Sin embargo, un incremento de metales pesados como el Cd, Zn, Cu, Ni, Pb, Fe y Co pueden ser perjudiciales para el crecimiento de las plantas (ALLEN, 1993).

2.3.6.2. Reciclaje de nutrientes

Las esporas de los MVA son solamente una fuente secundaria de nutrientes en los ecosistemas naturales. Los nutrientes contenidos en las esporas de los hongos pueden aportar de 10 a 60 g N ha⁻¹, de 4 a 50 g Ca ha⁻¹ y de 1 a 10 g Mg ha⁻¹. La tasa de retorno de las esporas MA puede ser relativamente baja porque son estructuras de reserva. Sin embargo, la biomasa de micelio fungoso puede ser alta en suelos tropicales. Los hongos MVA juegan un papel importante como medio de transporte de los nutrientes en el proceso de reciclaje de estos (SALAMANCA y SILVA, 1998).

2.3.6.3. En la agregación del suelo

Los suelos Fértiles tienen un alto porcentaje de agregados estables. Los MVA unen y agregan las partículas a través del crecimiento intensivo del micelio, lo cual puede ser importante para mejorar las condiciones físicas del suelo y a la vez, previene la erosión del suelo, cualidad que conservan los MVA y que hace que revistan considerable importancia en

ecosistemas con alta presencia de arenas, zonas montañosas de baja estabilidad y sometidas a fuertes procesos de erosión (SIQUEIRA *et al.*, 1984).

2.3.6.4. Efectos contra patógenos de plantas

Varios trabajos demuestran el rol de la micorriza en el control patógenos habitantes del suelo; entre los que destacan en tomate contra *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora* y *Corticium rolfsii*. En algodón contra *Verticillium dhaliae*; en fresa contra *Fusarium oxysporum* (BLANCO y SALAS, 1997).

Actualmente hay experiencias exitosas a nivel de campo empleando formulaciones comerciales de hongos benéficos (*Glomus intrarradices* y *Trichoderma harzianum*) antagonistas de *Fusarium oxysporum* que ataca tomate (DATNOFF *et al.*, 1995).

Las infecciones radiculares por nematodos son generalmente menores sobre plantas micorrizadas que sobre plantas no micorrizadas, pero la respuesta puede variar, y los mecanismos involucrados son controversiales (DATNOFF *et al.*, 1995).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

El presente trabajo de investigación se realizó, en la Universidad Nacional Agraria de la Selva en Tingo María, distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco. Geográficamente está ubicado a una latitud sur 09°45'00", Longitud Oeste 75°57'00" y altitud de 667 m.s.n.m.

Durante el periodo de ejecución el promedio de temperatura, humedad relativa, precipitación pluvial y heliofanía fueron 25°C, 82.4%, 213.9 mm, 175.3 horas luz, respectivamente.

Tingo María se encuentra en la Región Natural de Rupa Rupa o Selva Alta, Alto Huallaga. Las características climáticas corresponden a un clima de Bosque Muy Húmedo Subtropical (HOLDRIDGE, 1987), cuyas características principales son: baja producción de árboles deciduos, caída constante de hojarasca y descomposición durante todo el año, que permiten el desarrollo de bosques exuberantes (SÁNCHEZ, 1981).

3.2. Zonas de muestreo

Los estudios sobre la presencia de los hongos MVA se realizaron en seis zonas adyacentes a la ciudad de Tingo María; por el norte se muestreó hasta la ciudad de Aucayacu por el sur hasta Cayumba, por el oeste hasta el Parque Reservado "Cueva de las Lechuzas" y por el este hasta La Divisoria, las que se han dividido en seis zonas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Ubicación de las zonas de muestreo de raíces de especies forestales y agrícolas para el aislamiento de hongos micorrícicos MVA

Zona	Ubicación
I	Bosque reservado de la UNAS, en plantaciones de café, semilleros de pastos y el Fundo N° 1
II	Jardín Botánico de la UNAS
III	Ambos lados del tramo de la carretera desde Tingo María hasta el Parque Reservado "Cueva de las Lechuzas"
IV	Desde la UNAS hasta Cayumba
V	Sectores de Naranjillo, Pendencia, Santa Lucia, Anda hasta Aucayacu.
VI	Sectores de la Cooperativa "Té Café del Perú" y en Cooperativa Agraria "El porvenir" en la Divisoria.

3.3. Proceso de muestreo de suelos y raíces

Las muestras de suelo y raíces fueron tomadas de la rizósfera de un promedio de cinco plantas de cada especie vegetal y forestal, luego fueron mezcladas homogéneamente y separadas en bolsas de polietileno aproximadamente 250 g de suelo y una porción de raíces, la profundidad de muestreo fue de 0 – 20 cm; estas muestras cuando no se procesaron inmediatamente fueron conservadas en refrigeración a temperaturas menores a 10°C.

3.4. Método de identificación de hongos MVA

3.4.1. Separación de esporas del hongo MVA

Para la separación de esporas del suelo se usó el método cualitativo descrito por Tommrup y Kidbey citados por SIEVERDING (1983) y HALL (1984), el cual consiste en sedimentar el suelo con caolín y flotación de las esporas en solución de azúcar.

Las muestras de suelo obtenidos de cada punto de muestreo se homogenizaron individualmente quitando todo material grueso (raíces, piedras y terrones); de ella se tomó muestra de 100 g que fue colocado en un frasco Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, agregándose 350 ml de agua destilada, luego se agitó por 15 minutos empleando un agitador mecánico tipo Labor 2124 Le-208. Transcurrido este tiempo de agitación se dejó reposar por 30 segundos. El sobrenadante obtenido se filtró a través de un juego tamices de 1 mm, 800, 500 y 53 μm (ordenada y verticalmente en forma descendente); se repitió el procedimiento por tres veces en cada muestra; después de la última repetición se aplica un fuerte chorro de agua sobre el tamiz superior (1 mm). El contenido del tamiz de 53 fue lavado con agua destilada y colocado en un tubo de centrifugación (aproximadamente 50 ml); se agregó 2 g de caolín molido mezclándolo homogéneamente y se centrifugó a 1800 revoluciones por minutos durante 3 a 4 minutos, el caolín tiene la propiedad de atrapar las partículas de suelo y las esporas, facilitando la eliminación de la materia orgánica y otros materiales que pudieran estar un presentes en la suspensión. El sedimento fue resuspendido con una solución de azúcar (55% p/v) y se

volvió a centrifugar a 1800 revoluciones durante 2 minutos. Bajo estas condiciones las esporas quedan suspendidas en la solución azucarada. Las esporas en esta solución fueron lavadas inmediatamente (a fin de evitar los efectos de la presión osmótica del azúcar) empleando el tamiz de 53 μm con agua destilada por 5 minutos. Las esporas presentes en el tamiz fueron pasadas a una placa petri mediante lavado para su posterior observación.

3.4.2. Proceso de identificación

La identificación de las esporas aisladas fue realizada por observación de sus características morfológicas en un microscopio estereoscopio y microscopio compuesto. Los géneros de MVA fueron separados a partir del reconocimiento de parámetros morfológicos de las esporas, usados en taxonomía de *Glomales*, como el color, tamaño, forma de las esporas, las características de sus paredes (grosor, color, presencia de ornamentaciones) siguiendo la denominación y representación sugerida por WALKER (1992), presencia de célula suspensoria y conexión hifal.

3.5. Métodos de identificación de plantas hospederas del hongo MVA

3.5.1. Determinación de la infección del hongo MVA

3.5.1.1. Método de tinción de raíces

Existen varios métodos de coloración de raíces para la observación de la infección del hongo MVA sus aplicaciones están de acuerdo a la disposición de materiales y reactivos. En el presente trabajo se optó por

emplear el método de Kormanik, Bryan y Schultz citado por SIEVERDING (1983).

Las muestras fueron lavadas con agua corriente hasta eliminar totalmente la tierra adherida, la clarificación de las raíces se realizó mediante inmersión en KOH al 10% sometido a una temperatura de 90°C en baños maría durante 1 hora a 90°C, luego se procedió a lavar por tres veces con agua corriente.

Para el proceso de tinción las raíces fueron sumergidas en HCl al 1% por 3 minutos, seguidamente se sumergió a una solución lactofenol con fucsina ácida al 0.01% sometida a una temperatura de 90°C en baño maría durante 10 a 60 minutos. Las raíces así procesadas se cortaron en pequeños segmentos, los que fueron montados en portaobjetos empleando como medio de montaje glicerol. En el microscopio se observó la presencia de o ausencia de hongos MVA en cada una de las muestras.

3.5.1.2. Método mediante la autofluorescencia de arbusculos con ultravioleta inducida

AMES *et al.* (1982), reportaron un método para la estimación de la infección de raíces por el hongo MVA. Autofluoresciendo arbusculos con ultravioleta inducida bajo esas mismas condiciones raíces infectadas por el hongo MVA no autofluorescen vesículas, esporas e hifas, ni ectomicorrizas o infección por hongos patogénicos.

La preparación de la muestra a observar es en estado fresco previamente lavado con agua corriente y enjuagado con agua destilada,

esos segmentos de raíces fueron presionados entre una lámina porta objetos y el cubre objeto montados con agua o glass fueron observadas bajo un microscopio Carl Zeiss Jenna DDR a una longitud de onda 450 nm. También se han realizado cortes transversales a esos segmentos de raíces quedando en pequeños círculos de aproximadamente 1-2 mm de espesor.

3.6. Estudio taxonómico de los hongos MVA

Procesadas las muestras, la identificación de géneros fueron realizados mediante el empleo de claves propuestos por: HALL (1984); TRAPPE (1982) y TRAPPE y SCHENK (1982). Además, con el apoyo de la descripción a nivel de género de las micorrizas realizadas por GEDERMANN and TRAPPE (1975); HALL and FISH (1979); MOSSE and HAYMAN (1980) y SIEVERDING (1983, 1985a).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. De las especies muestreadas

En el Cuadro 3 se observa que en las seis zonas se han muestreado un total de 81 muestras (plantas). Estas muestras corresponden a 55 especies de plantas pertenecientes a 24 familias (Cuadro 5); en la que sobre salen las familias Meliaceae en especies forestales, Rutaceae y Fabaceae en especies agrícolas y Poaceae en especies de uso pecuario (pastos) y agrícola.

Cuadro 3. Número de especies agrícolas y forestales en las seis zonas.

Esp. Muestreadas	Zona I	Zona II	Zona III	Zona IV	Zona V	Zona VI	Total
Agrícolas	11	5	8	15	11	4	54
Forestales	03	02	03	02	02	0	12
Otros	01	01	02	01	10	0	15
Total	15	8	13	18	23	4	81

4.2. De la presencia de hongos MVA

Según características morfológicas observadas en los hongos MVA obtenidos y corridas en las claves de identificación de HALL (1984) y TRAPPE (1982) se identificó la presencia de 5 géneros, siendo estas *Glomus*, *Gigaspora*, *Entrophospora*, *Sclerocystis* y *Acaulospora* (Cuadro 4.). Todas las especies de plantas analizadas están relacionadas con algún tipo de hongos de tipo MVA (Cuadro 5). Del total de 81 muestras se ha logrado aislar el género *Glomus* en total de plantas, siendo el más predominante con un porcentaje de

ocurrencia de 100%, mientras que los géneros que *Gigaspora*, *Entrophospora*, *Sclerocystis* y *Acaulospora* tienen 23.45, 2.4, 1.2 y 4.9% de ocurrencia respectivamente.

Cuadro 4. Géneros de hongos MVA asociados a plantas agrícolas y forestales en las seis zonas de muestreo (octubre 1988 y enero 1989).

Zonas de muestreo	Plantas	Géneros de hongos MVA				
		<i>Glomus</i>	<i>Gigaspora</i>	<i>Entrophospora</i>	<i>Sclerocystis</i>	<i>Acaulospora</i>
I	Agrícolas	11				
	Forestales	3				
	Otros	1				
II	Agrícolas	5				
	Forestales	2				
	Otros	1				
III	Agrícolas	8				
	Forestales	3	1			1
	Otros	2				
IV	Agrícolas	15	9	2	1	3
	Forestales	2	1			
	Otros	1				
V	Agrícolas	11	2			
	Forestales	2	2			
	Otros	10	2			
VI	Agrícolas	4	1			
	Forestales	0	1			
	Otros	0				
Total		81	19	2	1	4
% de ocurrencia		100 %	23.45%	2.4%	1.2%	4.9%

Debe asumirse que los cinco géneros encontrados en este estudio sean sólo los únicos presentes en las zonas muestreadas puesto que como lo afirma

SCHENCK and PÉREZ (1988), no todas las especies de hongos formadores de micorriza vesicular arbuscular tienen la misma capacidad de formar esporas.

Muchos de los MVA no esporulan o la producción de esporas está condicionada a los cambios edáficos del suelo, la época y las condiciones del muestreo, investigaciones posteriores deberán ampliar el número de géneros que conforman la comunidad de estos hongos en nuestro ámbito.

Las seis zonas muestreadas (Cuadro 3, 4 y 5) presentan condiciones agroecológicas favorables para el crecimiento y desarrollo de este tipo de hongos. Sin embargo, entre una zona y otra una misma especie vegetal puede ser hospedero de uno o más géneros. Esto confirma lo manifestado por SÁNCHEZ (1981), que en los trópicos las endomicorrizas arbusculares son diez veces más abundantes que las ectomicorrizas y se reportan en la mayoría de las especies vegetales. Asimismo, CASTELLANO and BOUGHER (1994), reportan que el 97% de las fanerógamas, incluidas casi todas las especies de interés agronómico, pastoril y forestal presentan estas asociaciones con hongos MVA.

Cuadro 5. Géneros de micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) identificados en especies vegetales en Tingo María

N	Familia	Especie	Nombre común	Zonas	Género (s)
1	Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i> L.	Mango	I	<i>Glomus</i>
2	Anacardiaceae	<i>Spondia radlkoferi</i> Donn Smith	Taperiba	V	<i>Glomus</i>
3	Annonaceae	<i>Rollinia mucosa</i> (Jack) Baill	Anona	I, II, IV, V	<i>Glomus</i>
4	Bignoniaceae	<i>Taberia capitata</i> (Burch et al.) Sandw	Asta de venado	II	<i>Glomus</i>
5	Bixaceae	<i>Bixa orellana</i> L.	Achiote	IV	<i>Glomus</i>
6	Bombacaceae	<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gartn.	Huimba	IV	<i>Glomus</i>
7	Bombacaceae	<i>Quararibea cordata</i> (Hum & Bompf) Vischer	Zapote	a (I, III); b (IV)	<i>a (Glomus), b (Acaulospora, Gigaspora, Glomus, Entrophospora)</i>
8	Caricaceae	<i>Carica papaya</i> L.	Papaya	V	<i>Glomus</i>
9	Cecropiaceae	<i>Cecropia</i> spp.	Cético	III	<i>Acaulospora, Glomus</i>
10	Cecropiaceae	<i>Pourouma cecropiifolia</i> Mart.	Uvilla	III	<i>Glomus</i>
11	Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum coca</i> Lam.	Coca	IV	<i>Gigaspora, Glomus</i>
12	Euphorbiaceae	<i>Croton dracanooides</i> Muell. Arg.	Sangre de grado	IV, V	<i>Glomus</i>
13	Euphorbiaceae	<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd) Muell. Arg.	Caucho	II	<i>Glomus</i>
14	Euphorbiaceae	<i>Manihot esculenta</i> Grantz	Yuca	III, V	<i>Glomus</i>
15	Fabaceae	<i>Centrosema pubescens</i> Benth.	Centrosema	V	<i>Glomus</i>
16	Fabaceae	<i>Desmodium heterophyllum</i>	Desmodium	V	<i>Gigaspora, Glomus</i>
17	Fabaceae	<i>Desmodium ovalifolium</i>	Desmodium	V	<i>Gigaspora, Glomus</i>

18	Fabaceae	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Soya	V	<i>Glomus</i>
19	Fabaceae	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Frijol	IV	<i>Gigaspora, Glomus</i>
20	Fabaceae	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	Caupi	V	<i>Gigaspora, Glomus</i>
21	Lauraceae	<i>Ocotea</i> spp	Mohena	I	<i>Glomus</i>
22	Lauraceae	<i>Persea americana</i> Mill.	Palto	a (II); b (IV)	a (<i>Glomus</i>); b (<i>Gigaspora, Glomus</i>)
23	Meliaceae	<i>Cedrella fissilis</i> Vell.	Cedro	IV	<i>Gigaspora, Glomus</i>
24	Meliaceae	<i>Switenia macrophylla</i> G. King.	Caoba	II, V	<i>Gigaspora, Glomus</i>
25	Mimosaceae	<i>Acacia polyphylla</i> D.C.	Pashaco	IV	<i>Glomus</i>
26	Mimosaceae	<i>Cedrelinga catenaeformis</i> Ducke	Tomillo	I	<i>Glomus</i>
27	Mimosaceae	<i>Inga</i> spp.	Guaba	a (I, III, IV); b (VI)	a (<i>Glomus</i>); b (<i>Gigaspora, Glomus</i>)
28	Moraceae	<i>Artocarpus altilis</i> (Park) Fosberg	Pan de árbol	I	<i>Glomus</i>
29	Moraceae	<i>Ficus glabrata</i> H.G.K.	Ojé	III	<i>Glomus</i>
30	Musaceae	<i>Musa</i> spp.	Plátano	V	<i>Glomus</i>
31	Myrtaceae	<i>Eucaliptus</i> spp.	Eucalipto tropical	V	<i>Gigaspora, Glomus</i>
32	Myrtaceae	<i>Eugenia jambos</i> L.	Pomarosa	I, V	<i>Glomus</i>
33	Myrtaceae	<i>Eugenia stipitata</i> Mc Vaurh	Araza	I	<i>Glomus</i>
34	Palmae	<i>Bactris gasipaes</i> H.B.K.	Pijuayo	I, II	<i>Glomus</i>
35	Palmae	<i>Cocos nucifera</i> L.	Cocotero	V	<i>Glomus</i>
36	Palmae	<i>Elaeis guineensis</i> Jack	Palma aceitera	III, V	<i>Glomus</i>
37	Piperaceae	<i>Piper angustifolium</i> Roxb	Matico	II	<i>Glomus</i>
38	Poaceae	<i>Bambusa</i> spp.	Bambú	a (I), b (V)	a (<i>Glomus</i>); b (<i>Gigaspora, Glomus</i>)

39	Poaceae	<i>Braquiaria decumbens</i> Stapt.	Braquiaria	V	<i>Gigaspora, Glomus</i>
40	Poaceae	<i>Lasiacis ligulata</i> Hitch & Chase	Maicillo	V	<i>Glomus</i>
41	Poaceae	<i>Panicum maximun</i> Jack	Pasto guinea	V	<i>Glomus</i>
42	Poaceae	<i>Paspalum conjugatum</i> Berg.	Torurco	V	<i>Glomus</i>
43	Poaceae	<i>Pennisetum purpureum</i> Schum	Pasto elefante	III	<i>Glomus</i>
44	Poaceae	<i>Saccharum officinarum</i> L.	Caña de azúcar	III	<i>Glomus</i>
45	Poaceae	<i>Sorghum vulgare</i> Pers	Sorgo	V	<i>Glomus</i>
46	Poaceae	<i>Zea mays</i> L.	Maíz	IV	<i>Entrophospora, Gigaspora, Glomus, Sclerocystis</i>
47	Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i> L.	Café	a (I, III); b (IV, VI)	a (<i>Glomus</i>); b (<i>Gigaspora, Glomus</i>)
48	Rubiaceae	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christin) Swingle	Limón	III	<i>Glomus</i>
49	Rutaceae	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm F.	Limón dulce	IV	<i>Gigaspora, Glomus</i>
50	Rutaceae	<i>Citrus nobilis</i> Laur.	Mandarina	a (III); b (IV)	a (<i>Glomus</i>); b (<i>Acaulospora, Gigaspora, Glomus</i>)
51	Rutaceae	<i>Citrus paradisi</i> Maciaden	Toronja	I	<i>Glomus</i>
52	Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	Naranja	I, IV, V	<i>Gigaspora, Glomus</i>
53	Solanaceae	<i>Solanum topiro</i> H.B.K.	Cocona	IV	<i>Glomus</i>
54	Sterculiaceae	<i>Theobroma cacao</i> L.	Cacao	a (II, III, VI); b (IV);	a (<i>Glomus</i>); b (<i>Acaulospora, Gigaspora, Glomus</i>),
55	Theaceae	<i>Camelia sinensis</i> (L.) Kuntze	Te	VI	<i>Gigaspora, Glomus</i>

* (I) = Zona I (Bosque reservado de la UNAS y el Fundo № 1), (II) = Zona II (Jardín Botánico de la UNAS), (III) = Zona III (Comprende desde Tingo María hasta las Cuevas de las Lechuzas), (IV) = Zona IV (Desde la UNAS hasta Cayumba), (V) = Zona V (Corresponde desde Naranjillo hasta Aucayacu), (VI) = Zona VI (Cooperativa "Té Café del Perú" y la Cooperativa Agraria "El Porvenir" en La Divisoria).

La zona I que representa la zona de muestreo del Bosque reservado de la UNAS, la plantación de café, semilleros de pastos ambos ubicados a cercanías del bosque reservado y el Fundo Agrícola N° 1 donde se cultivan diferentes especies agrícolas, se ha logrado identificar la asociación del género *Glomus* sp. en 11 especies agrícolas y 3 especies forestales. El género *Gigaspora* sp. sólo está asociado a una especie agrícola.

La zona II corresponde solo al ámbito del Jardín Botánico de la UNAS, que alberga plantas traídas de otros lugares sólo se ha podido encontrar asociadas con estas plantas al género *Glomus* sp.

La zona III que a ambos lados del tramo de la carretera de Tingo María hasta la zona de la “Cueva de la Lechuzas” se ha hallado el género *Glomus* sp. en 8 especies agrícolas y 2 especies forestales. El género *Gigaspora* sp. sólo está asociado a una especie forestal

La zona IV corresponde a la zona de muestreo desde la UNAS hasta la localidad de Cayumba expresa la mayor diversidad de géneros de MVA asociados a las plantas lográndose encontrar 18 asociaciones del género *Glomus* sp., 10 asociaciones con el género *Gigaspora* sp. 02 asociaciones con el *Entrophospora* sp., 02 asociaciones con el género *Acaulospora* sp. y 01 asociación con el género *Sclerocystis* sp.

La zona V que corresponde a los sectores desde Naranjillo hasta Aucayacu, se ha logrado encontrar la segunda mayor diversidad de géneros de MVA; de los cinco encontrados tres se encuentran presentes en esta zona. Siendo *Glomus* sp, con mayor porcentaje de ocurrencia.

La zona VI que corresponde a La Divisoria representa la zona de menor diversidad de presencia de los hongos MVA, dado que solo se ha encontrado al género *Glomus* sp. en 04 especies vegetales y al género *Gigaspora* sp. en dos especies vegetales. Aunque no existe un reporte específico la temperatura registrada (menos a 19°C) podría estar afectando su amplia distribución.

De acuerdo a MORTON and REDECKER, (2001) se han reportado 8 géneros de hongos MVA (*Glomus*, *Gigaspora*, *Entrophospora*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Paraglomus* y *Archeospora*). En el presente trabajo de los 08 MVA reportados se ha logrado identificar 05, de los cuales el género *Glomus* es el más ampliamente distribuido y asociado a especies de plantas agrícolas y no agrícolas en las seis zonas de muestreo (Cuadro 4 y 5).

De las 55 especies de plantas analizadas 33 se encuentran asociados a un solo género (60%), 18 especies a dos géneros (32.7%), 02 especies a tres géneros (3.6%) y 02 especies a cuatro géneros (3.6%). En ninguna las 55 especie se ha logrado aislar los cinco géneros (Figura 5 y 6). El género *Glomus* se encuentra asociado a todas las especies vegetales, siendo este el de mayor distribución. El género *Gigaspora* ocupa el segundo lugar en distribución por encontrarse asociado a 20 especies de plantas, mientras que los géneros *Entrophospora*, *Sclerocystis* y *Acaulospora* están asociado a 2, 1 y 3 especies vegetales; siendo el género *Sclerocystis* el de menor presencia en el ámbito de estudio (Cuadro 4, 5 y Figura 6); este género fue aislado del cultivo de Maíz en la zona IV (Cuadro 4 y 5). La amplia distribución de los géneros *Glomus* y *Gigaspora* encontrados en este estudio coincide con los reportes de la mayoría

de investigadores de este grupo de hongos (SIEVERDING, 1985a; HALL, 1984; HARLEY and SMITH 1983).

Las seis zonas muestreadas presentan condiciones agroecológicas favorables para el crecimiento y desarrollo de este tipo de hongos. Sin embargo, entre una zona y otra una misma especie vegetal puede ser hospedero de uno o más géneros. Por ejemplo, en la especie *Theobroma cacao* L. en un población de plantas de las zonas II y III solo fueron infectadas por *Glomus* y en la zona IV además de estar infectados por *Glomus* estuvieron infectados por el género *Gigaspora* y *Acaulospora*. En estas diferencias puede deberse al factor edafoclimático y a la no distribución del género de hongo en ese momento y en ese sitio específico.

En todas las plantas muestreadas sea logrado identificar asociaciones con los hongos Micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) por lo que estarían propiciando un mayor aprovechamiento de los fertilizantes y nutrientes del suelo, favoreciendo una mayor captación de agua, estimulando el crecimiento aéreo y radicular, protegiéndolos de ciertos agentes patógenos y mejorando la estructura del suelo. Todos estos efectos positivos han sido asociados a los hongos MVA por muchos autores entre los que podemos destacar (BLANCO y SALAS 1997; SIEVERDING, 1985b; ZAMBOLIM y SIQUEIRA, 1985; HARLEY and SMITH, 1983).

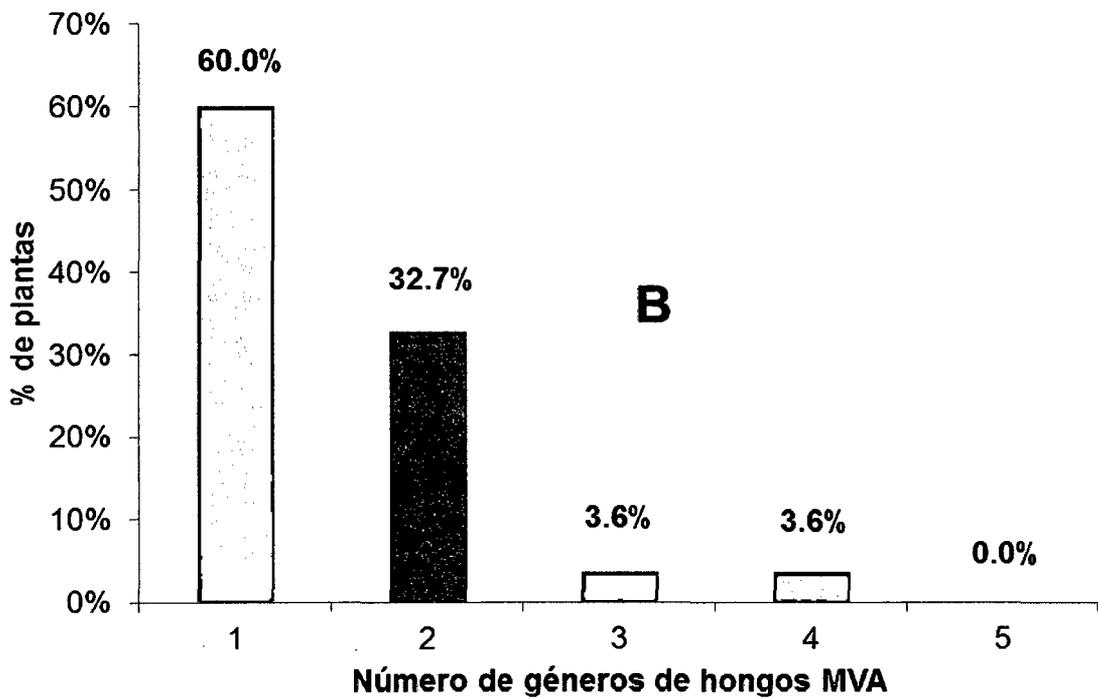
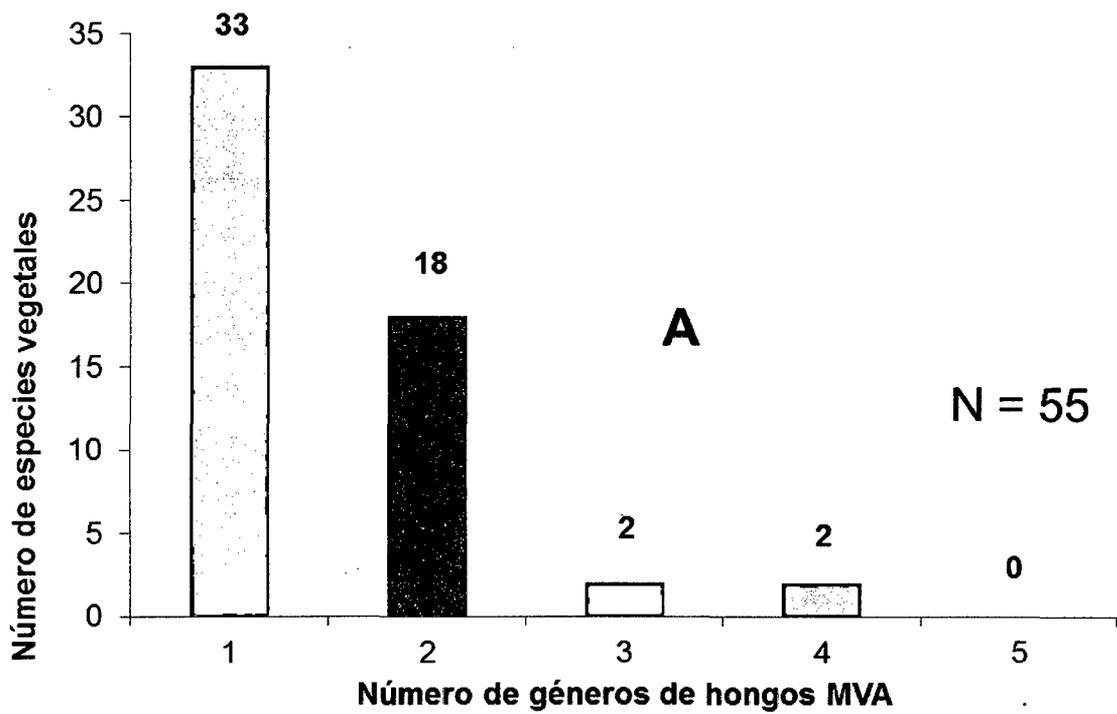


Figura 5. Número (A) y porcentaje (B) de especies vegetales asociados a cantidad de géneros de hongos MVA.

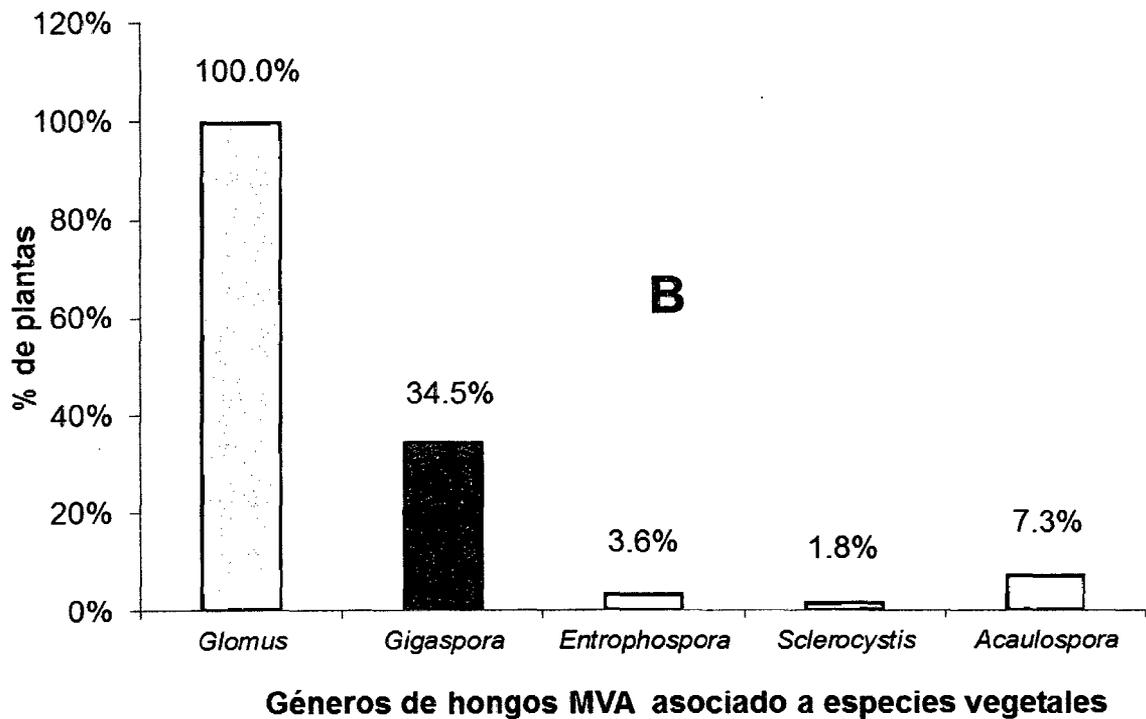
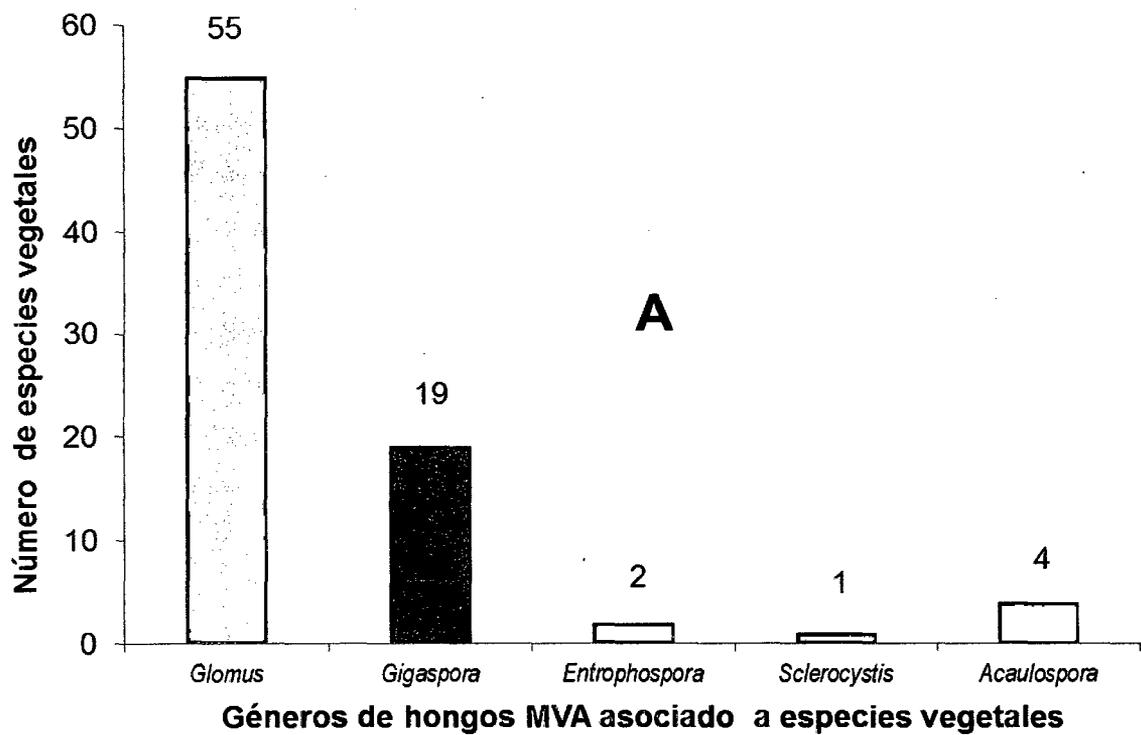


Figura 6. Número (A) y porcentaje (B) de géneros de hongos MVA asociados a especies vegetales.

V. CONCLUSIONES

1. En las seis zonas adyacentes a la ciudad de Tingo María, se han podido identificar los géneros *Glomus*, *Gigaspora*, *Entrophospora*, *Sclerocystis* y *Acaulospora*, pertenecientes al grupo de micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) de los 08 géneros reportados a la actualidad.
2. El género *Glomus* se encontró infectando al ciento por ciento de las 55 especies de plantas analizadas, seguido por el género *Gigaspora* con 34.5%, en tercer lugar el género *Acaulospora* con 7.3%, en cuarto lugar el género *Entrophospora* con 3.6% y finalmente en una sola especie vegetal fue posible identificar el género *Sclerocystis* (1.8%).
3. Algunas especies vegetales mostraron ser hospederos hasta de 4 géneros de hongo MVA.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar identificaciones taxonómicas del hongo MVA a nivel de especie en un amplio rango de especies vegetales y zonas ecológicas.
2. Realizar trabajos similares en otras épocas del año.
3. Continuar con trabajos en la identificación de hongos MVA nativos teniendo en cuenta factores como compatibilidad, especificidad, efectividad, grado de infección, factores que afectan y habilidad para producir inóculo.

VII. RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló en la Universidad Nacional Agraria de la Selva, cuyo objetivo fue identificar géneros de micorrizas vesículo-arbusculares existentes en seis zonas adyacentes a la ciudad de Tingo María, en especies vegetales de importancia agrícola y forestal.

La metodología empleada para la separación de esporas del suelo fue por el método de sedimentación con Caolín y flotación en solución de azúcar propuesto por Tommerup y Kidby (1979) y para la determinación de la infección del hongo MVA en raíces de las plantas por el método de la Tinción de raíces propuesto por Kormanik *et al.* (1980) y el método de autofluorescencia de arbúsculos con ultravioleta inducida por AMES *et al.* (1982).

Se han podido identificar los géneros *Glomus*, *Gigaspora*, *Entrophospora*, *Sclerocystis* y *Acaulospora*, pertenecientes al grupo de hongos micorrísicos vesículo-arbusculares (MVA). El género *Glomus* se encontró infectando al ciento por ciento de las 55 especies de plantas analizadas, seguido por el género *Gigaspora* con 34.5%, en tercer lugar el género *Acaulospora* con 7.3%, en cuarto lugar el género *Entrophospora* con 3.6% y finalmente en una sola especie vegetal fue posible identificar el género *Sclerocystis* (1.8%). Algunas especies vegetales mostraron ser hospederos hasta de 4 géneros de hongo MVA.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. AMES, R.N.; INGHAN, E.R. and REID, C.P.P. 1982. Ultraviolet induced autofluorescence of arbuscular mycorrhizal root infection. An alternative to clearing and staining methods for assessing infections. *Canadian Journal Microbiol.* 28:351-355.
2. ALLEN, M. 1993. *The ecology of mycorrhizae.* Cambridge University Press. Cambridge, RU. 196 p.
3. BLANCO, F.A. y SALAS, E.A., 1997. Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 21(1): 55-67.
4. BONAFANTE-FASOLO, P. 1984. Anatomy and morphology of VA micorrizae fungi. In: Powell C. Li. and Bagyaraj, D. J. (Eds). *VA Mycorrhiza.* CRC Press, Boca Raton, Florida. Pág. 5-34.
5. BOWEN, G.D. 1980. Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems. In: Mikola, P. (Ed.) *Tropical Mycorrhiza Research.* Clarendon Press. Oxford. Pág. 165-190.
6. BRUNETT, M.C.; PICHÉ, Y. and PETERSON, R.L. 1985. A developmental study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Canadian Journal of Botanic* 63: 184-194.
7. CASTELLANO, M. and BOUGHER, N. 1994. Consideration of the taxonomy and biodiversity of Australian ectomicorrhizal fungi. *Kluwer Academic Publishers.* Printed in the Netherland. *Plant and Soil*; 159: 37-46.

8. DATNOFF, L.E.; NEMEC, S. and PERNEZNY, K. 1995. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. Florida, USA. *Biological Control* 5:427- 431.
9. DE ALWIS, D.F. and ABEYNAYAQUE, K. 1980. A survey of mycorrhizae in some forest trees of Sri Lanka. In: Mikola, P. (Ed). *Tropical Mycorrhiza Research*. Clamerendon Press. Oxford. Pág. 146-153
10. GERDAMANN, J.W. and TRAPPE, J.M. 1975. Taxonomy of the Endogonaceae. In: Sanders, F.E., Mosse, B. y Tinker, P.B. (Eds). *Endomycorrhizas*. Academic Press. London. Pág. 35-50.
11. GIANINAZZI – PEARSON, V. and DIEMS, H.G. 1982. Endomicorrhizae in the tropics. In: Dommergues Y.R. y Diems, H.G. (Eds). *Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ. The Hague*. Pág. 209-251.
12. HALL, I.R. 1984. Taxonomy of VA Micorrhizal Fungy in: Powell C.LI. and Bagyaraj, D.J. (Eds). *VA Mycorrhiza CRC. Press. Boca Raton, Florida*. Pág. 57-94.
13. HALL and FISH, B.J. 1979. A key to the Endogonaceae. *Trams. Br. Mycol. Soc.* 73: 261-270.
14. HARLEY, J.L. and SMITH, S.E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, Londres. 483 p.
15. HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C. and PEGLER, D.N. 1995. *Dictionary of the fungi*. Eighth edition. Wallingford (UK). International Mycological Institute. CAB International. 301p.

16. HERRERA, R.A. 1985. Las micorrizas vesiculo-arbusculares como ayuda para la repoblación forestal en Cuba. En: Ciclo lectivo sobre "Técnicas de Investigación en Micorriza" set. 18 al 28. Turrialba. Costa Rica. Pág. 337.
17. HOLDRIDGE, L.R. 1987. Ecología, basado en zonas de vida. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Tercera reimpresión. 216 p.
18. JEFFRIES, P. and BAREA, J.M. 2001. Arbuscular Mycorrhiza- a key component of sustainable plant-soil ecosystems. En Hock B (Ed.). The Mycota IX Fungal Associations. Springer. Berlin, Alemania. Pág. 95-113.
19. KOSKE, R.E. 1984. Spores of VAM fungi inside spores of VAM fungi. *Mycologia* 76 (5): 853-862.
20. MOSSE, B. and BOWEN, G.O. 1968. A key to the recognition of some endogone spora types. *Trans. Br. Mycol Soc.* 51 : 469 – 483
21. MOSSE, B. and HAYMAN, D.S. 1980. Mycorrhiza in tropical agriculture. *Mycorrhiza in tropical plants.* In Mikola, P. (Ed.) Tropical Mycorrhiza Research. Clarendon. Press. Oxford. Pág. 213-230
22. 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 and emendation of *Glomaceae*. USA. *Mycotaxon*, 37: 471-491.

23. MORTON, J.B., and REDECKER, D. 2001. Two new families of *Glomales*, *Archaeosporaceae* and *Paraglomaceae*, with two genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. USA. *Mycologia* 93:181-195.
24. PEÑA-VENEGAS, C.P.; CARDONA, G.I.; MAZORRA, A.; ARGUELLEZ, J. y ARCOS, A.L. 2006. Micorrizas arbusculares de la amazonia colombiana. Catalogo Ilustrado. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Colombia. 90 p.
25. POWELL, C.LI. and BAGYARAJ, D.J. 1984. VA mycorrhizae Why all the interest. In: Powell, C.LI. and Bagyaraj, D.J. (Eds). *VA Mycorrhiza*, CRC, Press, Boca Raton, Florida. Pág. 1-3.
26. SALAMANCA, S.C.R. y SILVA, M. 1998. Las micorrizas como alternativa para el manejo sostenible de los agroecosistemas tropicales. CORPOICA. Boletín N° 12. Villavicencio, Meta, Colombia. 27p.
27. SÁNCHEZ, P.M. 1981. Endomicorrizas en agroecosistemas colombianos. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira, 227 p.
28. SHENCK, N.C. 1982. *Methods and principles of mycorrhizal Research*. The American Phytopathology Society. St. Paul Minnesota. USA.
29. SHENCK, N.C. and PÉREZ, Y. 1988. *Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi*. Second Ed. University of Florida. Gainesville, USA. 241 p.

30. SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D. and WALKER, C. 2001. A new fungal phylum: the Glomeromycota. USA. Mycol Res. 105 (12): 1413-1421.
31. SIEVERDING, E. 1983. Manual de métodos para la identificación de la micorriza vesiculos arbuscular en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 121 p.
32. SIEVERDING, E. 1985a. Aspectos de la taxonomía y la identificación de hongos formadores de micorriza vesiculo-arbuscular. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 128 p
33. SIEVERDING, E. 1985b. Interacción de los hongos MVA con microorganismos patógenos y efecto de los pesticidas. En: Ciclo lectivo sobre "Técnicas de Investigación en Micorriza" set. 18 al 28. Turrialba. Costa Rica. Pág. 137.
34. SIEVERDING, E. 1991. Vesiculo - arbuscular mycorrhizal management in tropical agrosystem. Technical Corporation. Federal Republic Germany. 371 p.
35. SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H. and VALLE, R.R. 1984. Effects of phosphorus on formation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. 19 (12): 1465-1474.
36. TRAPPE, J.M. 1982. Synoptic keys to the genera and especies of Zygomycetous mycorrhizal. USA. Fungi. Phytopathology. 72: 1102-1108.

37. TRAPPE, J.M. and SCHENCK, N.C. 1982. Taxonomy of the fungi forming endomycorrhizal. A. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Endogonales*). In: Shenck, N.C. (Ed) Methods and Principles of Mycorrhizal Research. The American Phytopathology Society. St Paul Minnesota. Pág 1 – 10
38. VILAR, A.; SIQUIERA, J.; LAYOLA, J., y ROCHA, A. 2000. Micorrizas arbusculares. Boletín Pesquisa, EMBRAPA, Brasil, N° 17, 17 p.
39. ZAMBOLIM, L. y SIQUEIRA, J.O. 1985. Importância e potencial das Associações micorrizicas para a agricultura. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). Serie/Documentos 26. Brasil.
40. WALKER, C. 1992. Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (*Glomales*) – a possible way forward. Agronomie: 12, Pág. 887 – 897.

IX. ANEXO

**Método de sedimentación con caolín y flotación en solución de azúcar
según Tommerup y Kidbey citado por (31).**

Se agitan en un beaker 50g de suelo con 150 ml de agua. Se decanta enseguida a una serie de tamices: 2 mm., 250 μm y 100 μm . Se repite la agitación y la decantación 15-20 veces. Se lava la fracción del tamiz superior (2 mm) con un chorro fuerte de agua. La fracción del tamiz 100 μm se pasa con agua a un tubo de centrifugación (50 ml, 3 mm. grosor de la pared, Pirex-tubo): se agita y mezcla la suspensión en el tubo con 2 g de caolín molido (polvo, partículas 130 μm) y se centrifuga (72 m seg^{-1} durante 5 minutos). El caolín compacta las partículas del suelo y las esporas, y se puede decantar el agua. El sedimento se resuelve con una solución de azúcar (50% P/V en agua). Se centrifuga (72 m seg^{-1} durante 45 segundos). El decante se filtra, por vacío, en un papel filtro Whatman GF/A filtro de fibra de vidrio. De aquí se aíslan las esporas con agujas.

Fórmulas para la preparación de lactofenol (31)

- a) 500 ml fenol, 500 ml ácido láctico, 1000 ml glicerol, 500 ml agua destilada.
- b) 1 parte fenol, 1 parte ácido láctico, 1 parte glicerol, 1 parte de agua destilada.
- c) 82 ml (80 g) fenol, 65 ml (80 g) glicerol, 83 ml (40 g) ácido láctico, 40 ml de agua.
- d) 300 g fenol, 250 ml ácido láctico, 250 ml glicerol, 300 ml de agua.

Preparación de solución de Ringer (31)

- a) Se disuelve en un litro de agua destilada 6 g de NaCl, 0.1 g KCl y 0.1 CaCl₂.
- b) El pH se regula a 7.4 ± 0.2 con NaOH.
- c) La solución se filtra y esteriliza en autoclave.