UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
UNIDAD DE ESTUDIOS A DISTANCIA
ESCUELA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

TESIS DE GRADO

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERO AGROPECUARIO

TEMA:

Efecto de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. (fréjol).

AUTOR:

Arturo Rooseveelt Cano Intriago

DIRECTOR DE TESIS:

Ing. Oscar Prieto Benavides M.Sc.

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2013

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Arturo Rooseveelt Cano Intriago, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

_____

Arturo Rooseveelt Cano Intriago

CERTIFICACIÓN

El suscrito Ing. Oscar Prieto Benavides, Docente de la **Universidad Técnica Estatal de Quevedo,** certifica que el egresado Arturo Rooseveelt Cano Intriago realizó la tesis de grado previo a la obtención del título **INGENIERO AGROPECUARO** titulada **"Efecto de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. (fréjol)."**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Oscar Prieto Benavides M.Sc.

DIRECTOR DE TESIS

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

UNIDAD DE ESTUDIOS A DISTANCIA

MODALIDAD SEMIPRESENCIAL

INGENIERÍA AGROPECUARIA

TEMA:

"Efecto de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. (fréjol).",

TESIS DE GRADO

Presentada al Honorable Comité Técnico Académico Administrativo de la Unidad de Estudios a Distancia como requisito previo para la obtención del título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Ing. Freddy Javier Guevara Santana M.Sc.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL _____

Ing. María del Carmen Samaniego M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL _____

Ing. Freddy Agustín Sabando Ávila

MIEMBRO DEL TRIBUNAL _____

Ing. Oscar Prieto Benavides M.Sc.

DIRECTOR DE TESIS _____

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2013

AGRADECIMIENTOS

El autor de la presente investigación deja constancia de su agradecimiento a:

A mi alma mater **Universidad Técnica Estatal de Quevedo**, que me abrió las puertas para pertenecer a esta gran familia de ingeniería agropecuaria, que en cuyas aulas sus catedráticos me brindaron todo su conocimiento, para crecer en mi vida profesional por medio de los conocimientos.

Ing. Roque Luis Vivas Moreira, MSc. Rector de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por su apoyo a la educación.

A la Ing. Guadalupe Del Pilar Murillo Campuzano de Luna, MSc. Vicerrectora Administrativa de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, por su aporte diario de trabajo constante que ha tenido sus frutos, en beneficio de los estudiantes.

Al Eco. Roger Yela Burgos, MSc. Director de la Unidad de Estudios a Distancia, por la eficiencia y responsabilidad al frente de esta unidad Académica.

Al Ing. Lauden Geobakg Rizzo Zamora MSc., Coordinador del Programa Carrera Agropecuaria.

DEDICATORIA

A DIOS por haberme llenado de espiritualidad y energía para ayudarme a vencer todos los obstáculos de la vida e iluminarme para llevar a cabo mis objetivos y metas propuestas

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por permitirme realizar mis estudios profesionales de Cuarto Nivel.

De manera especial, mi sincero agradecimiento al Director de la Unidad de de Estudios a Distancia el Econ. Royer Yela Burgos, por haber guiado y orientado acertadamente la práctica profesional.

A mi Director de tesis Ing. Oscar Prieto Benavides, por su contribución en el desarrollo de esta investigación.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, por su gentil colaboración al permitirme y proporcionarme información necesaria para desarrollar el presente trabajo de investigación.

A mis Padres y Hermanos por brindarme el apoyo moral, estoy muy agradecido.

El principal apoyo recibido por parte de mi esposa Rina Muñoz y mis hermosos hijos, Estefanía, Pamela, Iván y Kristel por significar lo más especial de mi vida, por su comprensión y paciencia, a ustedes, muchas gracias.

RESUMEN EJECUTIVO

Se instauró un ensayo para determinar que consorcio de hongo formador de micorriza arbuscular (MA) tiene una mayor capacidad de infección y que beneficios otorga a las plantas a través de la evaluación de las variables agronómicas, al ser utilizados como inoculantes en plantas de fréjol (Phaseolus vulgaris L.). El experimento se realizó utilizando como sustrato un suelo pobre en nutrientes y estuvo constituido por cuatro (4) tratamientos tres tipos de consorcios micorrízicos diferentes (Esporas y raíces micorrizadas) y un tratamiento testigo (Agua Destilada estéril), estos fueron los siguientes: T1: (Glomus spp.), T2: (Acaulospora spp.), T3: (Scutellospora spp.), T4: (Agua destilada estéril) como testigo. Todas las plantas se regaron con agua destilada estéril. Las variables estudiadas fueron: Altura, peso húmedo y seco del sistema foliar, peso húmedo y seco del sistema radicular, largo total de raíz por planta (RL), longitud de raíz por volumen de suelo (RLv), número de esporas por cada 100 gramos suelo húmedo (gsh), categoría pelos radicales y porcentaje de colonización micorrízica. Se efectuó una evaluación en las plantas de fréjol a los 90 días después de la siembra. La evaluación realizada dio como resultado que el mejor tratamiento para todas las variables estudiadas fue el consorcio micorrízico Glomus spp. Sin embargo, los demás tratamientos que contenían inóculos de hongos micorrízicos arbusculares fueron superiores morfológicamente a las plantas inoculadas con agua destilada estéril (testigo).

EXECUTIVE SUMMARY

Was established that an assay for forming consortium arbuscular mycorrhizal fungi (MA) has a greater capacity for infection and provides benefits to plants through the evaluation of the agronomic traits to be used as inoculants in bean plants (Phaseolus vulgaris L.). The experiment was performed using as substrate nutrient- poor soil and consisted of four (4) treatments consortia three different mycorrhizal (spores and mycorrhizal roots) and a control treatment (sterile Distilled Water), these were: T1: (*Glomus* spp.), T2: (*Acaulospora* spp.), T3: (*Scutellospora* spp.), T4: (sterile distilled water) as a witness. All plants were irrigated with sterile distilled water. The variables studied were: height, wet and dry weight of leaf system, wet and dry weight of the root system, total root length per plant (RL), root length per soil volume (RLv), number of spores per 100 moist grams (gsh), category root hairs and mycorrhizal colonization percentage. An assessment on bean plants at 90 days after planting. The evaluation resulted in the best treatment for all variables studied was the consortium mycorrhizal *Glomus* spp. However, other treatments containing inocula arbuscular mycorrhizal fungi were morphologically higher plants inoculated with sterile distilled water (control).

ÍNDICE

PORTADA I
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHO II
CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS III
TRIBUNAL DE TESIS IV
AGRADECIMIENTO V
DEDICATORIA VI
RESUMEN EJECUTIVO VII
ABSTRAC XII
ÍNDICE XI
ÍNDICE DE CUADROS XV
CAPITULO 1 2
MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN 2
1.1. INTRODUCCIÓN 3
1.2. Objetivos 4
1.2.1. General 4
1.2.2. Específicos 4
1.3. Hipótesis 4
CAPITULO II 5
MARCO TEÓRICO 5
2.1. Fundamentación Teórica 6
2.1.1. Aspectos generales de las micorrizas 6
2.1.2 Importancia de las micorrizas en la agricultura 7
2.1.3 Simbiosis micorrizica 7
2.1.4 Como se produce la simbiosis para formar micorrizas 8

2.1.5. Clases de micorrizas 9
2.1.2.1. Ectomicorrizas…… 9
2.1.5.2. Endomicorrizas..... 10
2.1.5.3. Ectoendomicorrizas..... 11
2.1.5.4. Micorrizas besico-arbusculares..... 11
2.1.6. Morfología del hongo dentro de la raíz..... 12
2.1.6.1. Hifas..... 12
2.1.6.2. Arbúsculos..... 12
2.1.6.3. Vesícula. ……..13
2.1.7. Taxonomía 13
2.1.8. Beneficios de las micorrizas..... 14
2.1.8.1. Formación y agregados estables 14
2.1.8.2. Papel de la micorriza en la absorción de nutrimento..... 15
2.1.9. El frejol (*Phaseolus vulgaris L*.) 16
2.1.9.1. Características del genero *Phaseolus.* 17
2.1.9.2. Distribución 18
2.1.9.3. Origen del frijol..... 18
2.1.9.4. Situación mundial 19
CAPITULO III 20
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN 20
3.1. Materiales y métodos 21
3.1.1. Ubicación del área del estudio 21
3.1.2. Materiales de oficina..... 21
3.1.3. Materiales de campo..... 21
3.1.4. Reactivos 22

3.1.5. Equipos 22

3.2. Metodología..... 22

3.2.1. Campo 22

3.2.2. Laboratorio 23

3.2.3. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL 25

3.2.3.1. Tratamientos 25

3.2.3.2. Diseño Experimental (comparación entre medias) 26

3.2.3.3. Modelo matemático 26

3.2.3.4. Análisis estadístico 27

3.2.4. VARIABLES EVALUADAS..... 27

CAPITULO IV..... 29

RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 29

4.1. Resultado 30

4.1.1. Población de esporas de hongos micorrizicos arbusculares (MA) 30

4.1.2. Porcentaje de colonización micorrizica en raíces de frejol (*Phaseolus vulgaris L*.) 30

4.2. Resultados de la variable agronómica evaluadas en plantas de frejol..... 31

4.2.1. Altura de plantas 31

4.2.2. Peso húmedo del sistema foliar 32

4.2.3. Peso seco del sistema foliar 33

4.2.4. Peso húmedo del sistema radicular 34

4.2.5. Peso seco del sistema radicular 35

4.2.6. Longitud total de raíz por planta……36

4.2.7. Longitud de raíz por volumen de suelo (RLv), a los 90 dias después de las inoculaciones……37

4.2.8. Análisis de pelos radicales en raíces de frejol a los 90 días después de las inoculaciones……38

4.3. Discusión……39

CAPITULO V 43

CONCLUSIONES..... 43

5.1. Conclusiones..... 44

5.2. Recomendaciones..... 44

CAPITULO VI 46

CITAS BIBLIOGRAFÍCAS 46

6.1. Bibliografía 47

CAPITULO VII 53

ANEXOS……53

ÍNDICE DE CUADRO

CUADRO 1. Esquema del análisis de la varianza para el diseño experimental. UTEQ, 2013 26

CUADRO 2. Población total de esporas de hongos MA aisladas por cada 100 gramos de suelo húmedo (gsh-1), en tres tipos de tamices con diferente apertura de malla 425, 90 y 25 µm, utilizando plantas de fréjol, UTEQ 2013.… 30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de densidad de colonización micorrízica en raíces de fréjol. Los valores representan la media de 150 raicillas evaluadas, con barras de desviación estándar, UTEQ 2013..... 31

Figura 2. Altura de plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones con hongos MA. Los valores representan la media de cinco repeticiones con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (P ≤ 0,05), UTEQ 2013.
... . 32

Figura 3. Peso húmedo del sistema foliar en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (P ≤ 0,05), UTEQ 2013.
... . 33

Figura 4. Peso seco del sistema foliar en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (P ≤ 0,05), UTEQ 2013.... 34

Figura 5. Peso húmedo del sistema radicular en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (P ≤ 0,05), UTEQ 2013.
... . 35

Figura 6. Peso seco del sistema radicular en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (P ≤ 0,05), UTEQ 2013.
... . 36

Figura 7. Longitud total de raíces en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (P ≤ 0,05), UTEQ 2013.
... . 37

Figura 8. Longitud total de raíces en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (P ≤ 0,05), UTEQ 2013.
... . 38

Figura 9. . Categoría de pelos radícales en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (P ≤ 0,05), UTEQ 2013.
... . 39

CAPÍTULO I

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

La agricultura, es un sector de la economía nacional, la mayor parte de la población del área rural del país, se dedica a esta actividad. Hay diversidad de productos agrícolas, como granos básicos, legumbres, hortalizas, frutas etc., dicha actividad proporciona a las personas beneficios, debido a que los productos obtenidos de la tierra son para consumo propio, así como para ser comercializados en distintos puntos de venta de acuerdo con las necesidades imperantes en el mercado (Salgado, 2001).

Según el ICTA (2003), el fréjol es una planta que alcanza diferentes alturas según la variedad que se trate, por lo que puede ser de tipo arbustivo (de suelo) y trepador o de enredo (guía). La planta posee raíces fibrosas con tallos herbáceos desarrollados, compuestos por una raíz principal y varias que se ramifican cerca de la superficie del suelo lo cual favorece a la introducción de la micorriza arbuscular.

En varios países de Centro América y América del Sur, el fréjol es una de las principales leguminosas que se producen en las fincas agrícolas y es considerada una importante fuente de proteína para todos sus habitantes. Ya que contiene entre 16% y 30% de proteína, 8% de calorías, es rico en vitamina B y su principal vitamina es la legumelina, de fácil digestión y alto poder energético, proporciona hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio, magnesio y calcio, tiene un alto contenido en fibra (Moreno, 2003).

Por otro lado es un hecho universalmente aceptado que los hongos micorrícicos arbusculares estimulan el crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas, especialmente en suelos de baja y moderada fertilidad. El papel que juegan los microorganismos en la rizósfera de las plantas favorece la nutrición mineral

principalmente en cuatro aspectos: fisiología y desarrollo de la planta, crecimiento y morfología de raíces, procesos de absorción y disponibilidad de nutrimentos; características favorables que le permitirían a las plantas ser más competitivas en lo que a estabilidad se refiere (Paul y Clark, 1996).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares en plantas de *phaseolus vulgaris* L. (fréjol).

1.2.2. Objetivos específicos

- Cuantificar el número de esporas existentes en las plantas de fréjol después de inocularlas con hongos micorrízicos arbusculares.

- Cuantificar el porcentaje de colonización micorrízica en raíces de fréjol a nivel de vivero.

- Evaluar las variables agronómicas de las plantas de fréjol inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares.

1.3. HIPÓTESIS

La inoculación con hongos micorrízicos arbusculares estimulan a las plantas de fréjol a desarrollar mayor respuestas a variables agronómicas

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1.2. Aspectos generales de las micorrizas

El origen de las Micorrizas se remonta al periodo Devónico a partir del cual hongos y plantas evolucionaron hasta lo que son actualmente. El botánico alemán Albert Bernard Frank, en 1885 creó el término Micorriza (Mycos-hongo, Rhiza-raíz) para designar la asociación que se presenta entre hifas de algunos hongos del suelo y las raíces de la gran mayoría de las plantas superiores. Algunos autores identifican a las Micorrizas como “la asociación simbiótica entre determinadas especies de hongos del suelo y las raicillas (pequeñas raíces) de diferentes especies de plantas “. Es decir, dependencia entre hongo y raíz, unión armónica e íntima de ayuda mutua entre hongo y raicillas de la planta (De la Vega, 2006).

Se denomina micorrizas a las asociaciones simbióticas mutualistas existente entre los hongos del suelo y raíces de plantas superiores. Se trata de una asociación simbiótica puesto que los hongos se benefician con el suministro de fuentes carbonadas provenientes de la planta, mientras que esta última se beneficia por la mayor cobertura de suelo a nivel de raíces facilitada por los hongos, aumentando la capacidad de absorción de nutrientes minerales (Hermard *et al*., 2002). Estos dependen de la planta para el suministro de carbono, energía y de un nicho ecológico, a la vez que entregan nutrimentos minerales (especialmente los poco móviles como el fósforo); además le imparten otros beneficios como: estimulación de sustancias reguladoras de crecimiento, incremento de la tasa fotosintética, ajustes osmóticos cuando hay sequía, aumento de la fijación de nitrógeno por bacterias simbióticas o asociativas, incremento de resistencia a plagas, tolerancia a estrés ambiental, mejoran la agregación del suelo y son mediadores de muchas acciones e interacciones de la microflora y microfauna, que ocurren en el suelo, alrededor de las raíces (Bethlenfalvay y Liderman, 1992, citado por Blanco y Salas, 1996).

2.1.3. Importancia de las micorrizas en la agricultura

La micorriza cumple una función clave en la agricultura sostenible. En el prefacio del libro Mycorrhizae in sustainable agricultura (Bethlenfalvay y Liderman, 1992, citado por Blanco y Salas, 1996), concluye que “si el objetivo es reducir los insumos químicos por razones ambientales y de salud, entonces se necesita restablecer los hongos micorrizógenos y otros microbios benéficos a un alto nivel de efectividad para compensar la reducción de insumos”. Esta estrategia coincide con el punto de vista de que el grado de empobrecimiento o desaparición de la microflora MA (Micorrizas Arbusculares) es un indicador del descenso en estabilidad del sistema planta-suelo, de la misma forma que el nivel de estrés causado por las prácticas culturales es una medida de sostenibilidad de la agricultura (Bethlenfalvay, 1992, citado por Blanco y Salas, 1996).

Los efectos beneficiosos de la introducción artificial de inóculo micorrízico resultan más evidentes en suelos donde las poblaciones de hongos MA nativos no existen, o han sido eliminadas por empleo de prácticas agrícolas desfavorables para su desarrollo como la fumigación del suelo y el cultivo intensivo. La micorrización temprana de las plantas puede ser también interesante en situaciones en que la cantidad de inóculo MA en el suelo agrícola sea muy baja o por la existencia de un cultivo anterior no hospedador, y/o donde las poblaciones autóctonas no sean lo suficientemente agresivas y eficaces (Rhodes, 1984; Sieverding, 1991, citados por Hernández, 1999). Los beneficios económicos se derivan de una mayor y más uniforme producción, una mayor rapidez de crecimiento y entrada en producción de las plantas, una mejor calidad de la cosecha y un ahorro en fertilizantes, riego y productos fitosanitarios (Hernández, 1999).

2.1.4. Simbiosis micorrízica

La simbiosis micorrízica se refiere a la asociación mutualista que se establece entre plantas y específicos grupos de hongos que habitan en el suelo y en la rizósfera. De este modo se tienen identificados siete diferentes tipos de simbiosis micorrízicas, las cuales tienen repercusión en lo que respecta a la evolución, fisiología y adaptación ecológica de las plantas que habitan los ecosistemas terrestres (Smith y Read, 1997, citados por Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2003).

La importancia de la asociación micorrízica se basa exclusivamente al papel del hongo en el mayor suplemento de nutrimentos desde el suelo a la planta, sirviendo como intermediario el micelio externo. La asociación micorrízica es una estructura en la cual una unión simbiótica entre un hongo y los órganos absorbentes (las raíces) de una planta, confiere incremento de la adaptabilidad de uno o los dos participantes (Read, 1999, citado por Duchicela y González, 2003).

2.1.5. Como se produce la simbiosis para formar micorrizas

Primer paso.- Se produce identificación mutua planta-hongo/hongo-planta en la rizósfera, o en regiones próximas a las raíces o pelos radicales. La identificación es al parecer por sustancias exudadas desde la raíz que provocan el crecimiento del micelio y un biotropismo positivo del mismo hacia la raíz.

Segundo paso.- Consiste en el acercamiento y acoplamiento progresivo y gradual del micelio y la raicilla produciéndose el contacto intercelular al formarse una estructura que ata ambas biomasas.

Tercer paso.- Se realiza la colonización y se producen 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 simbiontes (hongo-raíz) y, por último se produce una alteración de las

actividades enzimáticas que se coordinan entre los simbiontes para integrar sus procesos metabólicos (De la Vega, 2006)

Este proceso de asociación para formar Micorrizas provoca alteraciones morfológicas y anatómicas en las plantas colonizadas tales como cambios en: la relación tallo raíz; la estructura de los tejidos radicales; el número de cloroplastos; aumento de la lignificación; alteración de los balances hormonales, etc. Efectos que no sólo son explicables como simple mejora nutritiva de la planta debido al aumento de eficacia en la absorción de nutrientes por la raíz gracias a la formación de la Micorriza, sino que responde a cambios metabólicos más profundos y complejos, debidos a la integración fisiológica de los simbiontes (De la Vega, 2006).

2.1.6. CLASES DE MICORRIZAS

Existen dos clases de micorrizas de importancia para los suelos agrícolas: las ectomicorrizas y las endomicorrizas. Algunas plantas poseen las dos clases, pero muchas otras no. Las endomicorrizas se dividen en varios tipos: Eriáceo (con características tanto de endomicorrizas como de ectomicorrizas), orquideáceo (infectadas por basidiomicetos) y las micorrizas vesículas arbusculares. (Coyne, 2000).

2.1.6.1. **Ectomicorrizas**

Las simbiosis que establecen las ectomicorrizas son uniones de beneficio mutuo entre los hongos y las raíces de plantas vasculares y no vasculares. El huésped de un hongo ectomicorriza suele ser una gimnosperma (pino o árbol de hoja perenne) (Coyne, 2000). El hongo crece entre las células de la raíz rodeándolas sin penetrarlas, formando una estructura característica la "red de Hartig". Además las raíces están rodeadas por una vaina formada por el hongo llamada manto fúngico; las hormonas que secreta el hongo provocan la ramificación de la raíz, que adopta un aspecto característico esponjoso y ramificado. El micelio se extiende mucho

hacia el suelo. Los pelos absorbentes a menudo están ausentes, siendo reemplazados por las hifas fúngicas (Arbo y González, 2006).

Formadas por hongos Basidiomicetes y Ascomicetes, que desarrollan una espesa capa de micelio sobre la zona cortical de las raíces nutricias de la planta. Se producen principalmente sobre especies forestales y leñosas. Los principales géneros son: *Suillus. Cortinarius. Rhizopogon. Cenococcuyrn. Thelefora. Pisolithus.* (Duchicela, 2001). Las ectomicorrizas presentan una escasa habilidad saprofítica competitiva. De esta manera, lejos de sus huéspedes, las ctomicorrizas experimentan dificultades a la hora de competir con otros microorganismos del suelo (Coyne, 2000).

2.1.6.2. **Endomicorrizas**

Son más frecuentes las endomicorrizas, ocurren aproximadamente en el 80% de las plantas vasculares. Las hifas de las endomicorrizas penetran las células del córtex de la raíz sin romper el plasmalema o el tonoplasto. Forman unas estructuras dendroides llamadas arbúsculos o protuberancias llamadas vesículas, que quedan revestidas por la membrana plasmática. Las endomicorrizas se suelen llamar micorrizas V/A por la formación de estas estructuras. El hongo nunca penetra la endodermis, ni la estela, ni el meristema apical, ni la caliptra.

Las hifas se extienden varios centímetros por fuera de la raíz incrementando la cantidad de nutrientes absorbidos. El intercambio entre hongo y hospedante tiene lugar en los arbúsculos que se llenan de gránulos de fosfatos (Arbo y González, 2006).

Los hongos que las producen se caracterizan por colonizar intracelularmente el córtex radical, dentro de este grupo existen tres tipos característicos: Orquideomicorrizas: (asociadas a Orquideaceas), sus principales géneros son: *Armillariella, Gymnopilus, Marasmius, Fomes, Xerotus, Corticium, Ceratobasidium, Sebacina, Tulasnella. Ericomicorrizas*: Ligadas a la Familia Ericáceas y con muchas

similitudes estructurales con las ectoendomicorrizas. Su principal género es: *Pezizella*. Micorrizas Arbusculares: Caracterizadas por formar arbúsculos intracelulares y sin duda las de mayor difusión e importancia económica y ecológica (Duchicela, 2001).

2.1.6.3. **Ectoendomicorrizas**

Los hongos que las producen colonizan de forma dual las raíces: externamente formando un manto cortical e internamente penetrando intracelularmente en el córtex. El género principal es *Endogone* (Duchicela, 2001).

2.1.6.4. **Micorrizas besico-arbusculares**

Las micorrizas vesiculares arbusculares disponen de una gran variedad de huéspedes. Así, pueden infectar la mayor parte de los cultivos agrícolas y el 90% de todas las plantas vasculares (Sylvia 1994, citado por Coyne, 2000). Su nombre se debe a que el hongo forma un consorcio fisiológico caracterizado por la presencia de estructuras típicas en la epidermis de la misma, hifas, arbúsculos y vesículas. Las estructuras del hongo dentro de la raíz de la planta están en contacto con el micelio externo que rodea en una red difusa la raíz lugar en donde son formadas, libremente o en esporocarpos, las azigosporas o clamidosporas del hongo; órganos con base en cuya morfología únicamente es posible realizar la identificación del género y la especie en razón de que no se puede desarrollar y multiplicar estos hongos en medios de cultivo (Barea, 1999, citado por Duchicela, 2001).

Las micorrizas vesiculares arbusculares no suelen ser específicas. A diferencia de las ectomicorrizas, no pueden cultivarse fuera de una planta huésped. La germinación de esporas de micorrizas vesiculares arbusculares en el suelo infectan las zonas periféricas de las raíces para empezar su colonización. Los hongos de las micorrizas vesiculares arbusculares son cigomicetos y ficomicetos. Los géneros

más importantes que conviene recordar son *Glomus* (por lo general, la micorriza vesicular arbuscular más aislada del suelo), *Gigaspora, Aclaulospora, Entrophospora y Scutellospora* (Coyne, 2000).

2.1.7. Morfología del hongo dentro de la raíz

Las tres estructuras características son: hifas, arbúsculos y vesículas.

2.1.7.1. **Hifas**

Provienen de esporas germinadas, penetran en la raíz y forman un apresorio en las capas más internas del parénquima cortical. Nunca penetran la endodermis, tejidos vasculares, meristemas, tejidos estacales, clorofílicos, partes viejas de la raíz, o en sistemas especializados de órganos vivos.

Cuando la infección se va desarrollando en el interior de la corteza ocurre un crecimiento exterior de las hifas (micelio externo) estableciéndose nuevos puntos de entrada y originándose una densa red de hifas externas que avanzan por el suelo varios centímetros (Sieverding, 1983, citado por Duchicela, 2001). La hifa ramificada se encuentra rodeada por la membrana plasmática de las células del parénquima cortical siendo el espacio apoplástico producido entre la membrana plasmática y el hongo la zona de intercambio de nutrientes (Hernández, 1999).

2.1.7.2. **Arbúsculos**

Son estructuras del tipo de los haustorios que se originan a partir de la ramificación dicotómica repetida de una hifa al interior de una célula vegetal. Las finas ramificaciones de los arbúsculos realmente no entran en contacto con el protoplasma de las células, sino que penetran como dedos en un guante, denominándose “invaginaciones de la membrana celular” (Newman *et al*., 1994; citado por Román, 2003). De esta forma se produce una extensa superficie de

contacto a través de la cual se lleva a cabo el intercambio de nutrientes minerales y carbohidratos entre el hongo y la planta. Los arbúsculos son estructuras de corta vida, cuya presencia es indicativa de la actividad metabólica asociada al transporte de sustancias a través de membranas (Román, 2003).

2.1.7.3. **Vesículas**

Las vesículas son estructuras ovoides, se forman generalmente en los extremos de las hifas del hongo y pueden producirse a lo largo de todo el parénquima cortical colonizado; suelen aparecer más tarde que los arbúsculos y son consideradas órganos de reserva, principalmente de lípidos (Beilby y Kidby, 1980; Cooper y Lösel, 1978, citado por Hernández, 1999).

2.1.8. Taxonomía

Los estudios de taxonomía de micorrizas iniciaron en 1809 con Link quien los reconoce como hongos hipógeos o epigeos del orden endogonales, género zigomicotina por ser productores de zigosporas, clamidosporas no sexuales o esporangios. La taxonomía de micorrizas ha ido variando acorde los últimos descubrimientos de la tecnología moderna, es así que, basados en estudios moleculares, morfológicos y ecológicos, remueven a la micorrizas de Zigomicotina a un nuevo phylum: Glomeromycota, con tres nuevos órdenes: Archaeosporales, Paraglomerales y Diversisporales. Las familias que pertenecen a cada orden están en estudio (Schubler; Schwarzott; Walker, 2001, citado por Duchicela, 2001).

La identificación taxonómica está basada en características morfológicas de la espora (INVAM 2001):

- Tamaño.- Diámetro.
- Color.- Puede ser hialino, amarillo, rojo, negro, miel, rosa u otras tonalidades.

- Forma.- Puede ser redonda, esférica, ovalada, irregular, elipsoide, subglobosa, u otras.
- Estructura citoplasmática.- Puede ser vacuolada o reticulada.
- Estructura superficial.- Lisa, áspera, ornamentada, ondulada, etc.
- Número de paredes y grosor de las mismas.
- Formación de la hifa terminal.
- Tipo de hifa de soporte.

Únicamente los géneros *Glomus, Scutellospora, Acaulospora, Entrophospora* y *Gigaspora* forma micorriza vesiculo arbuscular. (Sieverding, 1983, citado por Duchicela, 2001 y Coyne, 2000).

2.1.9. Beneficios de la micorrización

2.1.9.1. **Formación de Agregados Estables**

Se ha evidenciado que las hifas del hongo de las micorrizas, en cooperación con otros microorganismos, interactúan en tal proceso. El micelio desarrolla un esqueleto que mantiene las partículas adheridas, después, tanto las raíces como las hifas aportan productos orgánicos que se incorporan a la estructura en formación. Los microorganismos excretan o exudan agentes compactantes (mucilagos, polisacáridos) que provocan una cementación del microagregado en formación. Finalmente estos se unen en macroagregados, merced a la cooperación de las hifas de la micorriza y a la acción cementante de los productos de origen microbiano y vegetal (Barea, 1999, citado por Duchicela, 2001).

El flujo del carbono al suelo mediado por las micorrizas es crítico para el desarrollo de la agregación del suelo. La glomalina producida por las micorrizas hace el papel de una verdadera goma o pega. Este material orgánico (glicoproteína) rico en carbono y nitrógeno, conjuntamente con las hifas cementan las diferentes partículas del suelo, contribuyendo con la formación de agregados, otorgando al suelo

mejores características físicas. Además, las hifas al extenderse en la matriz del suelo crean condiciones para la formación de micro agregados (< 0.25 mm) y creación de macro agregados (> 0.25 mm). Al permitir las micorrizas la atracción y multiplicación de bacterias que degradan material orgánico, aportan con la mineralización y reservas de nutrientes en el suelo (Bernal y Morales, 2006).

2.1.9.2. **Papel de la Micorriza en la Absorción de Nutrimento**

La utilización de nutrimentos por las plantas es determinada por la capacidad de absorción de la raíz y por la difusión de nutrimentos, por ende, por la liberación de elementos de la solución de suelo. El micelio externo de los hongos arbusculares incrementa el volumen de suelo explorado y determinan la utilización de iones de baja velocidad de difusión como P, Zn y Mo (González, 1998, citado por Duchicela, 2001). Las micorrizas además son productoras de enzimas hidrolíticas como proteasas y fosfatasas, estas últimas necesarias en la solubilización del fosforo y mineralización del fosforo orgánico, incrementando los nutrientes disponibles para el mantenimiento de un sistema saludable suelo-planta (Bernal y Morales, 2006).

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 radicales. Desde el punto de vista nutricional, el mayor beneficio que las plantas derivan de la micorriza es un mayor crecimiento debido a un incremento en la absorción de P cuando este elemento es limitante. Cuando este elemento no es limitante el beneficio puede ser nulo o reducido, según el grado de dependencia micorrízica de la planta. Es conocido además que altos niveles de P inhiben la simbiosis. Por otro lado, está demostrado que la micorriza influye en forma directa o indirecta en la absorción de otros iones minerales (N, K, Ca, Mg, Fe, Mn (Johansen et al. 1994, citado por Blanco y Salas, 1996).

Es necesario tomar en cuenta que sustratos altamente ricos en materia orgánica y particularmente fosforo, pueden disminuir o inhibir el efecto de la simbiosis micorrizica Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2002, citados por Enríquez 2008. Lo que afirma Agustí, 2000 citado por Vázquez y Morales 2000, una concentración de entre 40-70 ppm de P asimilable para un suelo franco es considerada alta. De igual manera, el autor señala que concentraciones de entre 351-500 ppm de K asimilables son consideradas altas y porcentajes mayores a 2,5% de materia orgánica son muy altos.

2.1.10. El Fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los cultivos más viejos del nuevo mundo, y el de mayor consumo a nivel mundial (Veltcheva y Svetleva, 2005). Pertenece a la familia de las legumbres (Fabaceae), la cual comprende 643 géneros y 18000 especies, agrupadas en 40 tribus. La tribu Phaseoleae es por mucho el grupo más importante económicamente, ya que contiene el 75% de las legumbres comercializadas en el mundo (Broughton *et al.,* 2003).

El género *Phaseolus* es monofilético, de origen Neotropical. Se conocen entre 50-60 especies originarias de América, donde 5 especies: el frijol común (P. *vulgaris*), frijol yearlong (P. *polyanthus*), frijol scarlet runner (P. *coccineus*), frijol terapia (P. *acutifolius*) y el frijol Lima (P. *lunatus*) han sido domesticados (Broughton *et al*., 2003). El frijol común se encuentra entre las especies más cultivadas de la familia Fabaceae, siendo la legumbre más importante (Veltcheva y Svetleva, 2005).

El frijol común se consume como grano maduro, grano inmaduro o como vegetal. La alta calidad nutricional de los frijoles en términos de porcentaje de proteína es un importante complemento de los alimentos almidonados. El alto contenido mineral, especialmente hierro y zinc, así como fuente de fibra, ácido fólico, tiamina, magnesio y potasio, son de gran importancia en regiones donde hay una alta

prevalencia de deficiencias de micronutrientes (Broughton *et al.,* 2003; Rodríguez y Fernández, 2003).

La semilla del frijol contiene entre 20-25% de proteína, y la phaseolina es la principal. También es fuente de vitaminas y minerales. Contiene biotina la cual es un factor esencial para una variedad de carboxilasas y descarboxilasas establecidas en diversas vías metabólicas de todos los organismos. Se cree que el estado de la biotina varía entre las plantas durante el desarrollo y condiciones de crecimiento. El aislamiento, identificación y caracterización de la biogénesis de P. vulgaris podría ampliar el conocimiento de las condiciones óptimas y del tejido más apropiado de la planta para obtener grandes cantidades de biotina libre, lo cual traería mayores beneficios para la salud (Broughton *et al.,* 2003).

2.1.10.1. **Características del género *Phaseolus*.**

El frijol es una planta anual, de crecimiento rápido. El sistema radicular es poco profundo, está constituido por una raíz principal y gran número de raíces secundarias con elevado grado de ramificación. El tallo principal es herbáceo, es el eje central de la planta, el cual está formado por una sucesión de nudos y entrenudos; se origina del meristemo apical del embrión de la semilla. Las primeras hojas son simples, las demás hojas son compuestas, trifoliadas y su tamaño cambia según la variedad. La flor presenta una coloración que varía de blanco al color lila, según la variedad. Las inflorescencias presentan de 4 a 8 flores por racimo, cuyos pedúnculos nacen en las axilas de las hojas o en las terminales de algunos tallos. El fruto es una legumbre de color, forma y dimensiones variables, en cuyo interior se disponen 4-6 semillas. La semilla es pequeña, de forma, tamaño y color dependientes de la variedad (Barboza, 2002).

2.1.10.2. **Distribución**

El frijol se cultiva en gran diversidad de climas entre los 0 a 3000 m.s.n.m. y sus mayores rendimientos se obtienen en zonas donde la temperatura promedio oscila entre los 15 y 27 °C. Temperaturas promedio superiores a 27 °C favorecen el desarrollo vegetativo, pero ocasionan el aborto y desprendimiento de las flores, reduciendo el número de vainas y de semillas por planta Este grano se produce en regiones con 1500 a 2600 mm de precipitación anual, aunque teóricamente de 300 a 400 mm de lluvia bien distribuidos son suficientes para obtener una buena cosecha. El exceso o déficit de lluvia son igualmente perjudiciales para la producción, pues inciden directamente en el desarrollo de la planta y la susceptibilidad a enfermedades (Barboza, 2002; Broughton *et al.,* 2003).

2.1.10.3. **Origen del frijol**

Existe duda sobre cuál nombre debe darse a la especie silvestre cercana a *P. vulgaris*. En poblaciones Sudamericanas, puede ser distinguido empleando el término "*aborigineus*". El tipo silvestre crece aislado en un amplio rango desde el este central de México a través de América Central, a lo largo de las laderas orientales de los Andes al noroeste de Argentina, se sugiere que al menos un grupo de *P. vulgaris* domesticado evolucionó en la región Mesoamericana (México-Guatemala), pero no se tiene evidencia al respecto (Broughton *et al.,* 2003).

Además los fósiles de frijoles, están mal representados en los registros arqueológicos, como resultado de los métodos de recolección, pues los agricultores de regiones como México, arrancan las plantas con crecimiento erecto o arbustivo del suelo cuando maduran y las desgranan en estelas (juncos que sirven para cubrir el suelo de las habitaciones). Por lo tanto, el principal recurso de evidencia disponible para el análisis de la distribución y orígenes del frijol, comprende semillas y fragmentos de semillas, las cuales pueden ser carbonizadas por la ausencia del contacto con la humedad. Existen varias hipótesis sobre el inicio de la domesticación del frijol común: la más aceptada es la que propone que el frijol fue domesticado en Mesoamérica y luego transportado a Sudamérica.

2.1.10.4. **Situación mundial**

La producción mundial de frijoles secos ronda los 19-23 millones de toneladas métricas (TM) anuales, que se siembran en 26 millones de hectáreas (ha) de las cuales 7 millones son producidas en América Latina y África (Broughton *et al*., 2003; SEPSA y FAO, 2006). En estos sitios son una importante fuente de proteínas y calorías, pues, la proteína animal es limitada y el consumo de frijol satisface el requerimiento proteico. Además, el frijol común cuenta con el 22% de la proteína total consumida por los humanos en el mundo (Aragão *et al.,* 1996, Sánchez *et al*., 2005)

De acuerdo con los informes presentados por SEPSA y la FAO (2006), el 55% de la producción total, se concentra en sólo 5 países: Brasil, India, China, Myanmar y México. Estos grandes productores son, a su vez, grandes consumidores del producto, por lo que la producción mundial se dedica en mayor medida a atender las demandas locales de cada país. Brasil es el principal productor universal de frijol, y logra una producción de 2.8 millones de TM. India es el otro gran productor mundial de frijol, con un 31% del área y una participación del 14% en la producción mundial. Similar al caso de Brasil, India presenta un alto volumen de producción pero con bajos rendimientos, de casi un 50% inferior a la media mundial.

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. Ubicación y duración de la investigación

Los análisis de muestras de suelo y raíces, así como el estudio de las plantas a nivel de invernadero, fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal de la UTEQ, la duración del experimento fue de 120 días.

3.1.2. Materiales de oficina

- Ordenador
- Impresora
- Tinta
- Hojas blancas A4
- Cartas topográficas, IGM, INAMHI

3.1.3. Materiales de campo

- Algodón
- Asas de inoculación
- Cajas petri
- Cartuchos de tinta a color y blanco y negro
- Cubre objetos
- Erlenmeyer
- Esporas de hongos micorrízicos arbusculares
- Fundas de papel
- Gasa
- Hojas de bisturí
- jeringuillas
- Lápiz demográfico
- Mangos de bisturí
- Mascarillas
- Pipetas
- Piscetas
- Porta objetos
- Probetas graduadas
- Resmas de papel bond A4
- Soporte universal
- Semillas de Fréjol
- Tamices
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación

3.1.4. Reactivos

- Ácido clorhídrico
- Ácido láctico
- Azul de bromatimol
- Azul de tripano
- Glicerol
- Hidróxido de potasio
- Peróxido de hidrogeno

3.1.5. Equipos

- Agitador magnético
- Balanza de precisión
- Computadora
- Estéreo microscopio
- Flash memory
- Data logger
- Impresora
- Microscopio
- pH metro
- Centrifuga
- Autoclave
- Refrigeradora

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Campo

Se inocularon plantas de *Phaseolus vulgaris* L. (fréjol) con 30 esporas de HMA previamente identificados a nivel de género, las plantas crecieron en un sustrato de suelo más arena estéril y fueron regadas con agua destilada estéril se realizó una evaluación a los 90 días después de las inoculaciones, las variables que se evaluaron son las siguientes: Altura de plantas, peso húmedo y seco del sistema foliar y radicular, largo total de raíz (RL), densidad radicular (RL_v), número de esporas de hongos micorrícicos en 100 g de suelo húmedo (gsh^{-1}) por maceta, porcentaje de densidad visual (micorrización) y categoría de pelos radicales.

3.2.2. Laboratorio

El método que se utilizó para el aislamiento y conteo de esporas del suelo fue el descrito por Gerderman y Nicholson (1963) que consiste en el tamizado y decantación en húmedo, con modificaciones. A continuación se describe el proceso.

- Se pesó 100 g de suelo y se colocó en un vaso de precipitación, al que se le añadió 1000 mL^{-1} de agua y agitó durante 3 a 5 minutos, dependiendo del tipo de suelo. Con la agitación se produjo la disgregación de los terrones.

- La suspensión se dejó reposar durante 2 minutos y se pasó a través de tamices con apertura de mallas de 425, 90 y 25 µm para separar las esporas de acuerdo a su tamaño.

- La agitación y decantación se repitió tres veces.

- El material que quedó atrapado en los diferentes tamices se recogió con cuidado y se vertió en vasos de precipitación de 100 mL^{-1} con 40 a 50 mL^{-1} de agua destilada.

- En tubos de centrifuga de 15 mL^{-1} se colocaron 5 mL^{-1} de solución de sacarosa al 20%. Luego se agregó 5 mL^{-1} de solución de sacarosa al 60%, pero está última solución se vertió en el fondo de la anterior para formar una gradiente de sacarosa. Por último, se agregó 5 mL^{-1} de la solución del suelo recogido de los tamices, de manera que la solución quedara por debajo del suelo suspendido en agua.

- Se equilibraron y sellaron los tubos con parafilm y colocaron en la centrífuga durante 3 minutos a 3000 r.p.m.

- Una vez cumplido el tiempo de centrifugación, los tubos se sacaron cuidadosamente de la centrifuga, teniendo la precaución de no romper la interfase agua-sacarosa.

- El contenido de los tubos se vertió en un tamiz de 25 µm y se lavó con agua destilada para eliminar la sacarosa.

- El contenido del tamiz se recogió en envases de vidrio y posteriormente se agregó de a poco en cajas de Petri cuadriculadas de aproximadamente 1,25 cm entre líneas, para hacer el conteo de esporas.

Tinción de raíces

Para determinar el porcentaje de colonización micorrízica en las raíces de fréjol se usó el método de Philips y Hayman (1970) que consiste en:

- Lavar las raíces con abundante agua corriente.

- Cubrir las raíces con solución de Hidróxido de potasio (KOH) al 10% y colocarlas al baño de María (90°C) durante 15 minutos.

- Eliminar el hidróxido de potasio, lavando con agua corriente las raíces, utilizando preferiblemente un tamiz adecuado para evitar pérdidas durante el enjuague.

- Si las raíces son muy oscuras y pigmentadas, un tratamiento adicional de blanqueo con peróxido de hidrogeno (3 %) por 20 minutos será necesario. Las raíces clareadas y blanqueadas se lavaron con abundante agua.

- Lavar las raíces por inmersión en solución fresca de KOH al 10% y H_2O_2 al 10 % mezclado en proporción 1:1 (V/V). Deberá dejarse 10 minutos.

- Lavar en agua corriente las raíces.

- Acidificar con una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 1N durante 10 minutos.

- Decantar el HCl y sin lavar adicionar Azul de Tripano al 0.05% en lactoglicerol o cualquier otro colorante y colocar las raíces al baño de María por 15 minutos.

- Retirar el colorante y guardarlo en un recipiente.

- Lavar las raíces en agua destilada y dejarlas en reposo por 12 horas para eliminar el exceso de colorante, o desteñirlas durante la noche con lactoglicerol o glicerol (50 %).

- Montar en lámina y laminilla, 50 raíces de más o menos 1 cm de largo cada una y observar al microscopio.

Por cada muestra se realizaron montajes al microscopio. En una lámina porta objetos se colocaron 50 segmentos de raíces adicionando gotas de glicerol (50 %). Se efectuaron 3 repeticiones. Las observaciones se realizaron en un microscopio a 40x.

La frecuencia (%) de colonización radicular se determinó considerando los segmentos colonizados y los no colonizados. Se obtuvo la relación del total de segmentos colonizados con respecto a los segmentos totales evaluados. Se contabilizó con base a colonización total por arbúsculos o/y por vesículas.

3.2.3. Tratamientos y diseño experimental

3.2.3.1. Tratamientos

En la presente investigación se utilizaron cuatro tratamientos (inoculantes) con cinco repeticiones para cada tratamiento. Los tratamientos se describen a continuación:

T1: Consorcios micorrícicos del género ***Glomus***

T2: Consorcios micorrícicos del género ***Acaulospora***

T3: Consorcios micorrícicos del género ***Scutellospora***

T4: Testigo

3.2.3.2. Diseño Experimental (comparación entre medias)

Los tratamientos se dispusieron en un Diseño Completamente al Azar (DCA).

Cuadro 1. Esquema del análisis de la varianza para el diseño experimental. UTEQ, 2013

Fuente de Variación	FORMULA	G.L.
Tratamientos	t-1	3
Error	t(r-1)	16
Total	(t*r) -1	19

3.2.3.3. Modelo Matemático

El modelo matemático utilizado en cada experimento y que describe el comportamiento de las variables de respuesta es el siguiente:

$$Y_{ik} = \mu + T_i + \varepsilon_{ik}$$

μ = Media poblacional

T_i = Efecto del i-ésimo localidad

ε_{ik} = Error experimental para cada observación.

3.2.3.4. Análisis estadístico

Las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba de Tukey al 5 % de probabilidades de error. Los resultados se tabularon con el paquete estadístico ***Statistica 7.0***

3.2.4. Variables Evaluadas

- **Colonización micorrízica y categoría de pelos radicales en fréjol:** Para esta evaluación se utilizó la metodología propuesta por Giovannetti y Mosse (1980) con modificaciones.

- **Número de esporas por cada tratamiento:** Para la cuantificación de las esporas se utilizó el método descrito por Gerderman y Nicholson (1963), descrito anteriormente.

- **Altura de las plantas:** Se midió desde la base de la planta (cuello), hasta el extremo superior de la hoja, usando cinta métrica. La altura se expresó en centímetros a los 90 días después de las inoculaciones.

- **Peso húmedo y seco de la parte aérea y radicular:** A las plantas de fréjol de cada tratamiento se les separó la parte aérea y radical para registrar su peso

fresco (g). Luego fueron ingresadas a la estufa por 72 horas a 65°C. Posteriormente, se procedió a registrar su peso seco (g) en una balanza de precisión. Las mediciones se efectuaron a los 90 días después de la siembra.

- **Longitud total de raíces por planta (RL):** Es la longitud total del sistema radicular de las plantas, sumado todas las longitudes de cada raíz individual. Está expresado en cm y la fórmula con la que se calculó, es la que a continuación se detalla (Jungk y Claassen 1997). Las mediciones se efectuaron a los 90 días después de la siembra.

$$\mathrm{RL} = \frac{\text{Peso fresco raices por maceta}}{\text{Número de plantas por maceta}} \times \mathrm{RLs}$$

Donde RLs = Largo especifico de la raíz

- **Longitud de raíz por volumen de suelo (RLv):** Es el parámetro que estima la competición interradicular por nutrientes. Se expresa en cm cm^{-3} (Jungk y Claassen, 1997; Claassen y Steingrobe 1999; Jungk 2002). A continuación se detalla la ecuación que se empleó para su cálculo.

$$RL_V = \frac{\mathrm{RL\ x\ (número\ de\ plantas\ por\ maceta)}}{(\mathrm{Volumen\ de\ suelo} \div \mathrm{densidad\ de\ suelo})}$$

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Población de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (MA)

De los tratamientos que fueron inoculados con hongos micorrízicos arbusculares el que presentó mayor concentración de esporas de hongos MA por cada 100 gramos de suelo húmedo (gsh^{-1}), fue el tratamiento que contenía el consorcio micorrízico

del género *Glomus* spp. con un total de 781 esporas, seguido del tratamiento que contenía el consorcio micorrízico del género *Scutellospora* spp. con un total de 390 esporas, mientras que una menor población se encontró en el tratamiento *Acaulospora* spp. con 224 esporas. Cabe mencionar que el tratamiento testigo que fue inoculado con agua destilada estéril no presentó número de esporas de hongos MA (Cuadro 2).

Cuadro 2. Población total de esporas de hongos MA aisladas por cada 100 gramos de suelo húmedo (gsh^{-1}), en tres tipos de tamices con diferente apertura de malla 425, 90 y 25 µm, utilizando plantas de fréjol, UTEQ 2013.

Apertura de Tamiz	***Glomus* spp.**	***Acaulospora* spp.**	***Scutellospora* spp.**
425 µm	46	33	48
90 µm	325	67	53
25 µm	410	124	289
TOTAL	**781**	**224**	**390**

4.1.2. Porcentaje de colonización micorrízica en raíces de Fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.)

En la Figura 1, se muestran los valores de densidad de colonización visual obtenidos en raíces de fréjol, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, donde el tratamiento que contenía el consorcio micorrízico del género *Glomus* spp. fue superior a los demás tratamientos con una densidad visual de micorrización de 18,76 %, mientras que los tratamientos *Acaulospora* spp. y *Scutellospora* spp. no difirieron estadísticamente entre sí, obteniéndose porcentajes de colonización micorrízica de 11,32 y 10,06 respectivamente.

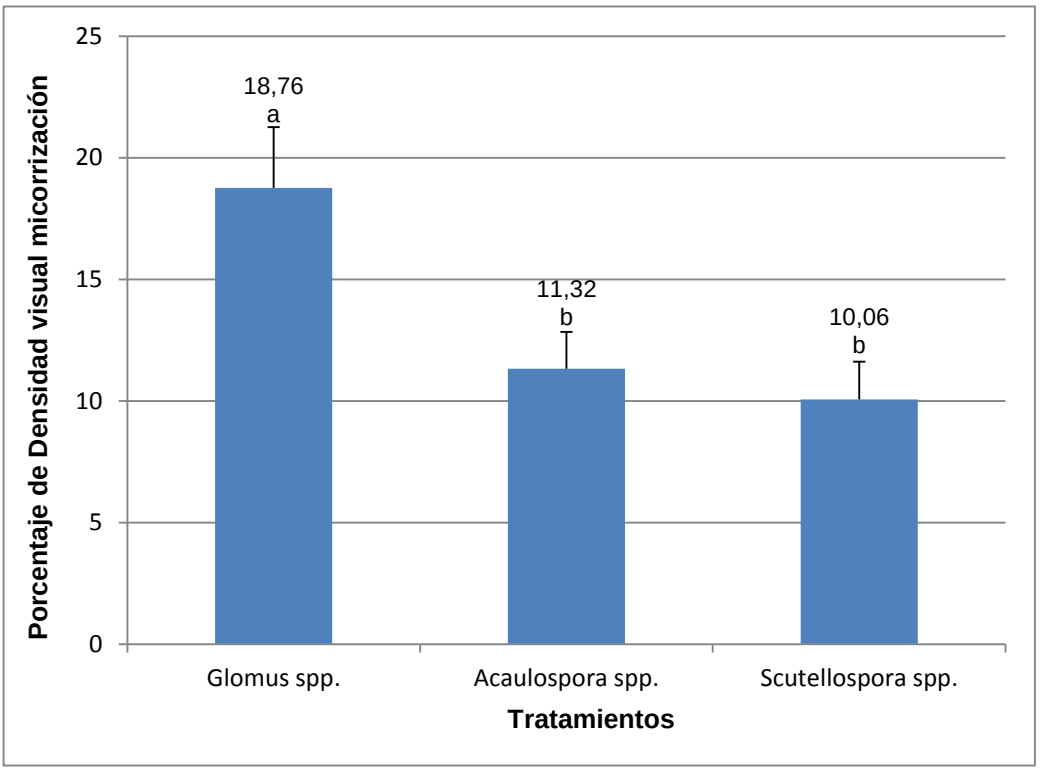


Figura 1. Porcentaje de colonización micorrízica en raíces de fréjol. Los valores representan la media de 150 raicillas evaluadas, con barras de desviación estándar, UTEQ 2013.

4.2. Resultados de las variables agronómicas evaluadas en plantas de Fréjol

4.2.1. Altura de Plantas

Para esta variable se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones, donde todos los tratamientos que contenían inóculo de hongos MA fueron superiores al testigo que solo fue inoculado con agua destilada estéril. El tratamiento *Glomus* se comportó como el mejor tratamiento para esta variable dando una altura de plantas de 34,14 cm, mientras que el tratamiento testigo obtuvo solo 20,92 cm de altura de plantas (figura 2).

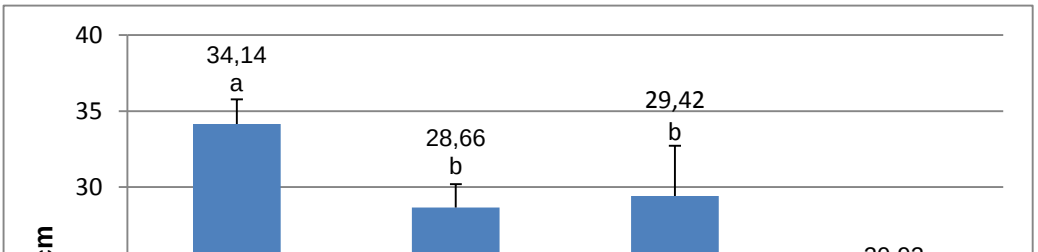


Figura 2. Altura de plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones con hongos MA. Los valores representan la media de cinco repeticiones con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (*P* ≤ 0,05), UTEQ 2013.

4.2.2. Peso Húmedo del sistema foliar

En lo que respecta al peso húmedo de la parte aérea de la planta, existieron diferencias significativas entre los tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. El tratamiento *Glomus* spp. fue superior a los demás con 21,68 g/planta, sin embargo, los tratamientos *Acaulospora* spp. y *Scutellospora* spp. se comportaron similares estadísticamente con 16,88 y 18,24 g/planta respectivamente. Mientras que el tratamiento Testigo (agua destilada estéril) con 13.30 g/planta fue el que menor valor obtuvo en lo que respecta a esta variable (figura 3).

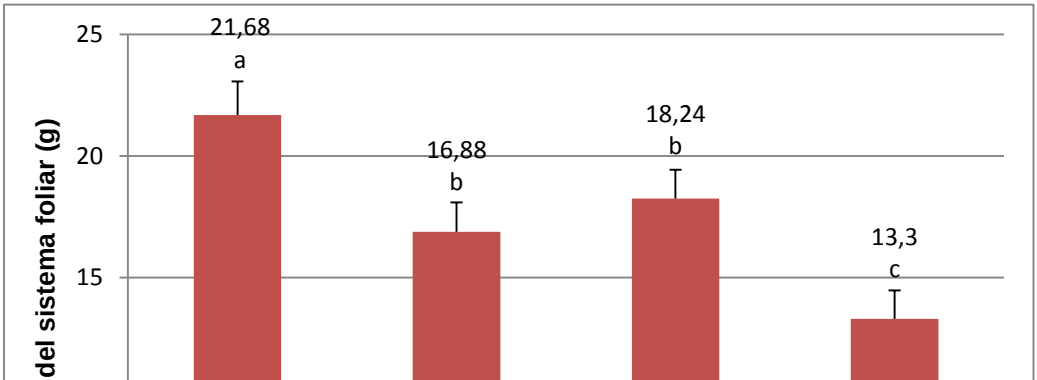


Figura 3. Peso húmedo del sistema foliar en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$), UTEQ 2013.

4.2.3. Peso Seco del sistema foliar

En lo que concierne a esta variable, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. El tratamiento *Glomus* spp. Mostró ser superior a los demás con un peso de 8,6 g/planta, seguido de los tratamientos *Scutellospora* spp. con 7,08 g/planta y *Acaulospora* spp. con 6,9 g/planta. El tratamiento Testigo (agua destilada estéril) obtuvo 5,46 g/planta constituyéndose en el promedio más bajo de todos (figura 4). Cabe mencionar que todos los tratamientos que contuvieron hongos micorrízicos arbusculares fueron superiores al testigo que solo fue inoculado con agua destilada estéril.

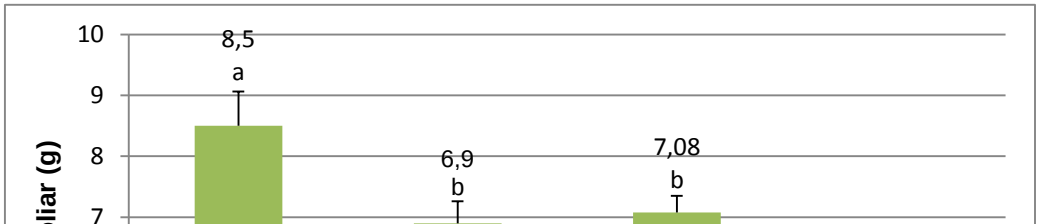


Figura 4. Peso seco del sistema foliar en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$), UTEQ 2013.

4.2.4. Peso Húmedo del sistema radicular

En la figura 5, se muestran los resultados obtenidos después de la evaluación para la variable peso húmedo de raíces de plantas de fréjol, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los tratamientos *Glomus* spp. y *Acaulospora* spp. fueron los que mayores pesos ganaron con 15,66 y 14,32 g/planta respectivamente siendo estadísticamente similares entre sí, seguido del tratamiento *Scutellospora* spp. con 12 g/planta y por último el tratamiento Testigo (agua destilada estéril) que solo obtuvo 7,94 g/planta constituyéndose en el promedio más bajo de todos

.

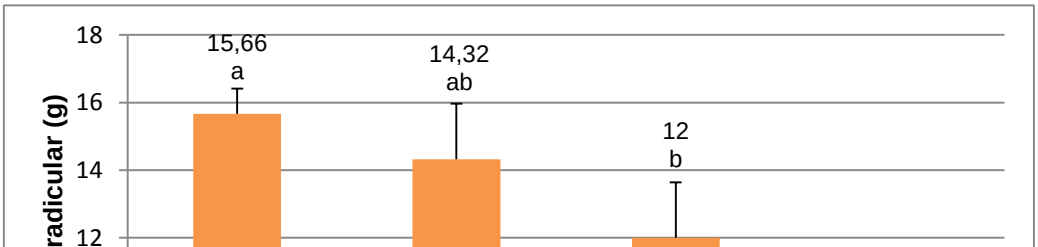


Figura 5. Peso húmedo del sistema radicular en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (*P* ≤ 0,05), UTEQ 2013.

4.2.5. Peso Seco del sistema radicular

Respecto a esta variable en la figura 6, se observan los resultados obtenidos a los 90 días después de las inoculaciones, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. El tratamiento *Glomus* spp. nuevamente se comportó superior a los demás tratamientos con un peso de 4,92 g/planta, seguido de los tratamientos *Acaulospora* spp. y *Scutellospora* spp con valores de 3,82 y 3,78 g/planta siendo similares estadísticamente entre sí. En este mismo contexto el tratamiento Testigo (agua destilada estéril) obtuvo el promedio más bajo de todos 1,80 g/planta siendo el más bajo de todos.

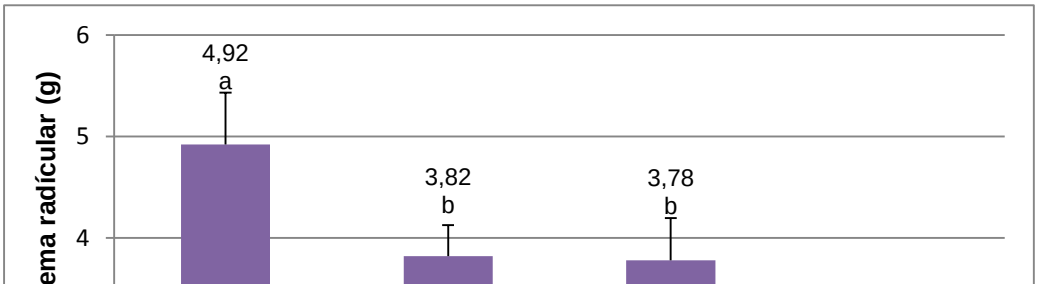


Figura 6. Peso seco del sistema radicular en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (*P* ≤ 0,05), UTEQ 2013.

4.2.6. Longitud total de raíz por planta

El análisis ANOVA determinó que existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones con respecto a esta variable. El mejor tratamiento nuevamente fue el compuesto por consorcios micorrízicos del género *Glomus* spp. con 84,60 cm, seguido por *Acaulospora* spp. con 75,42 cm, después se ubica el tratamiento *Scutellospora* spp. con 67,18 cm de longitud radicular por planta. Por último el tratamiento Testigo (agua destilada estéril) con 52 cm (figura 7).

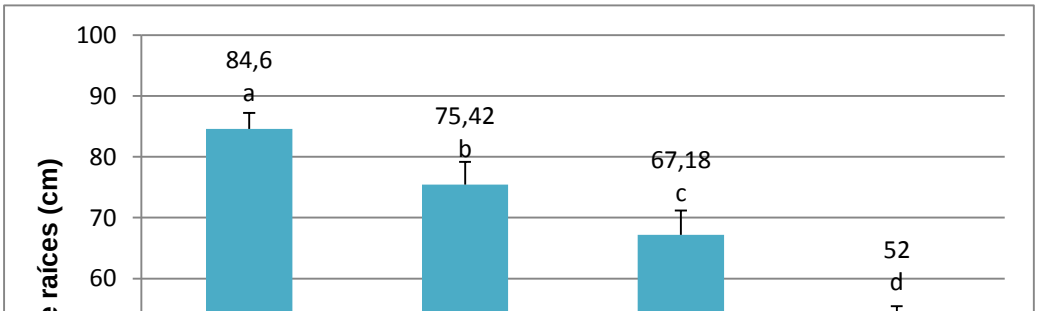


Figura 7. Longitud total de raíces en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (*P* ≤ 0,05), UTEQ 2013.

4.2.7. Longitud de raíz por volumen de suelo (RLv), a los 90 días después de las inoculaciones

En lo que se refiere a la longitud de raíz por volumen de suelo, se determinó existencia de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Como ha sido la tendencia en las demás variables evaluadas el tratamiento *Glomus* spp. fue el que más sobresalió entre los demás con 0,32 cm cm^{-3} de RLv, mientras que los tratamientos *Scutellospora* spp. y *Acaulospora* spp. con 0,25 cm cm^{-3} de RLv se comportaron similares estadísticamente entre sí pero superiores al Testigo (agua destilada estéril) que obtuvo 0,18 cm cm^{-3} de RLv según el análisis ANOVA realizado, siendo el tratamiento con el valor más bajo para esta variable (figura 7).

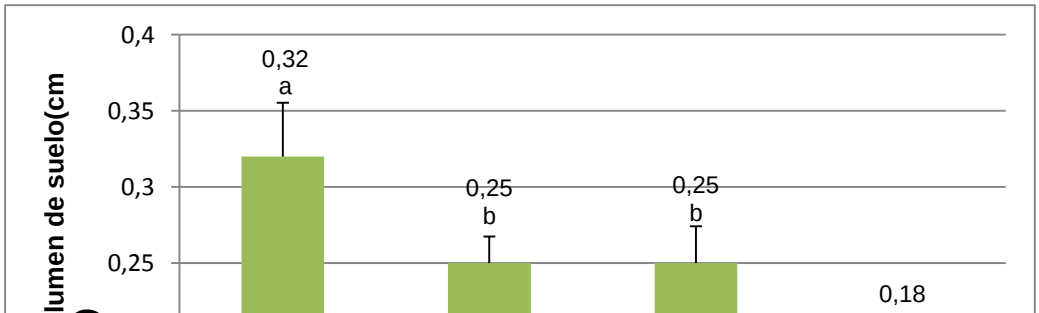


Figura 8. Longitud total de raíces en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (*P* ≤ 0,05), UTEQ 2013.

4.2.8. Análisis de pelos radicales en raíces de fréjol a los 90 días después de las inoculaciones

En la Figura 9, se muestran los resultados conseguidos al analizar la densidad de pelos radicales en raíces de fréjol, a los 90 días después de las inoculaciones. Se detectaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamiento, las plantas pertenecientes a los tratamientos que contenían inóculo de hongos micorrízicos arbusculares fueron superiores a las plantas que no fueron inoculadas con estos hongos. Los tratamientos *Glomus* spp., *Scutellospora* spp. y *Acaulospora* spp. mostraron la mayor cantidad de pelos radicales con respecto al tratamiento testigo, con una densidad del 2,7; 2,36 y 2,24 respectivamente. Sin embargo, el tratamiento Testigo (agua destilada estéril) solo obtuvo un valor 1,78 siendo este el promedio más bajo para esta variable.

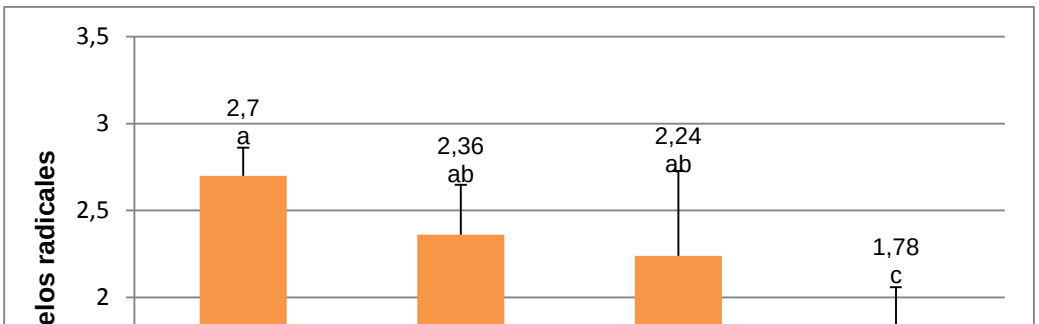


Figura 9. Categoría de pelos radícales en plantas de fréjol bajo cuatro tratamientos a los 90 días después de las inoculaciones. Los valores representan la media de cinco repeticiones, con barras de desviación estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$), UTEQ 2013.

4.3. DISCUSIÓN

En relación al grado de micorrización y colonización del sistema radical en este punto algunos autores han señalado que el se ve influenciado por factores como el grado de fertilidad del suelo y el pH (Barea y Ascón-Aguilar., 1982). Esto se corroboraría con un análisis fisicoquímico realizado al sustrato de cada uno de los tratamientos. En el género *Glomus* las vesículas (estructura del hongo) se caracterizan por que pueden llegar a engrosar sus paredes y convertirse en esporas. Debido a que la producción de vesículas depende de las actividades de los arbúsculos, se puede afirmar que la cantidad de vesículas es directamente proporcional a la cantidad de arbúsculos. La disminución de esporas en los tratamientos *Acaulospora* spp. (224 esporas) y *Scutellospora* spp. (390 esporas) puede deberse a este factor determinante y por tal razón es que existe una mayor producción de esporas en el consorcio micorrízico *Glomus* spp. (781 esporas) este antecedente ya se ha descrito en la literatura y ha sido corroborada por estudios previos (Sieveverding, 1990) observaron, que en ocasiones la fertilización con

niveles altos de fosforo reduce los porcentaje de infección y deprime el desarrollo de arbúsculos, vesículas, hifas externas e internas y disminuye también el número de puntos de penetración y de esporas.

En las macetas cultivadas con fréjol, el género mejor representado fue *Glomus*, esto concuerda con los resultados de Serralde y Ramírez (2004) y Prieto *et al.*, (2011) quienes evaluaron el número de esporas en suelos cultivados con dos especies diferentes de plantas los primeros con maíz y el segundo con *Brachiaria decumbens* encontrando que este género fue el que presentó mayor abundancia. Mientras que Schalamuk *et al*., (2007) evaluaron la variación de la comunidad de hongos MA en un cultivo de trigo bajo diferentes sistemas de labranza, hallando también una dominancia del género *Glomus*. Asimismo, se ha reportado que este mismo género fue dominante en suelos agrícolas subtropicales cultivados con hortalizas y frutales (Wang *et al*., 2008), en la región del Himalaya se realizó un estudio para recopilar información sobre la distribución y riqueza de los hongos MA asociados a plantas medicinales (*Catharanthus roseus* Linn., *Ocimum* spp. y *Asparagus racemosus* Willd) observando también que *Glomus* fue el mejor representado (Gaur y Kaushik, 2012).

En cuanto a las variables agronómicas evaluadas en plantas de fréjol en la presente investigación, analizando las variaciones en el tamaño de las plantas, no es extraño que las características morfométricas de la variable en cuestión sean mayor en las plantas que contenían como tratamientos hongos MA, ya que según otros autores la presencia de MA hace aumentar la tasa de crecimiento y un incremento en la producción de biomasa, y que este efecto es mayor en suelos de baja fertilidad o desequilibrados nutrimentalmente, especialmente cuando el contenido de fosforo asimilable es bajo (Smith y Read, 1997).

El aumento de la materia seca es debido a que las hifas de las MA exploran un mayor volumen de suelo aumentando así la capacidad de absorción de nutrientes en la planta. Se pudo observar que lo mencionado anteriormente se puede

comprobar si se hace una comparación entre las plantas que mejor se comportaron, es decir, las del tratamiento 1 (*Glomus* spp.) que lograron una altura de 34,4 cm referente a las plantas del tratamiento testigo (agua destilada estéril) 20,92 cm de altura.

La cantidad de biomasa radicular alcanzada principalmente con el tratamiento 1 (inóculo de hongos MA del género *Glomus*), puede ser un indicador de la actividad benéfica de estos organismos, ya que una de las funciones importantes de los hongos MA es la de aumentar el área de absorción radicular de las plantas a través de sus redes miceliales y con ello captar mayor número de nutrimentos, como en el caso del fósforo. El P es un elemento que participa de manera directa e indirecta en varias de las funciones vitales de las plantas, ya forma parte de compuestos orgánicos que participan en las reacciones bioquímicas que permiten aprovechar la energía luminosa a través de la fotosíntesis, esta energía es utilizada por las células de las plantas para producir tejidos y órganos vegetales, incluyendo las raíces. Esta ganancia radical puede ser atribuida a la actividad de las hifas de los hongos MA, dando como resultado un mayor transporte de nutrimentos y agua hacia la parte aérea (Yao *et al*., 2002)

En relación a la variable Longitud de raíz por planta (RL), las plantas inoculadas con *Glomus* obtuvieron una longitud promedio de raíz de 84,60 cm, mientras que el testigo mostró el valor más bajo (52 cm). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Moreta (2002) quien evaluando hongos micorrízicos en una gramínea como *B. decumbens* la longitud radicular a los 90 días después de las inoculaciones encontró longitudes de 150 cm de raíz para las plantas que tenían inoculo de hongos micorrizicos, frente a las plantas sin inocular (97 cm). Por otro lado, Castillo (2005) utilizando como plantas hospederas dos especies distintas *Triticum aestivum* L. y *Avena sativa* L. obtuvo resultados superiores en las plantas inoculadas respecto a las sin inocular, su mejor resultado lo obtuvo con el inóculo de *Glomus claroideum* una especie con una alta tasa de efectividad.

En cuanto que para la variable longitud raíz por volumen de suelo (cm cm^3) RLv a los 90 días después de las inoculaciones, en la presente investigación el tratamiento que más densidad radicular mostró fue el conformado por *Glomus* spp. con 0,32 cm cm^{-3}, seguido por los tratamientos *Acaulospora* spp. y Scutellospora spp. con 0,25 cm cm^{-3} cada uno, mientras que el más bajo fue el testigo con 0,18 cm cm^{-3}. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Saénz (2002) quien en su investigación en *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) y dos tipos de pastos el *Panicum maximum* Jack. (Tanzania) y *Digitaria decumbens* Stent. (Transvala) encontró una mayor densidad radicular en las plantas que tenían micorrizas en relación a las que no tenían el inóculo. Por otro lado, Moreno (1988) en su investigación realizada en *Solanum tuberosum* (papa) y inoculando con consorcios micorrizicos de *Glomus fasciculatum*, también obtuvo una mayor densidad radicular de las plantas micorrizadas frente a las no micorrizadas.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Se acepta la hipótesis planteada en la presente investigación, dónde la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares estimulan a las plantas de fréjol a desarrollar mayor respuestas a variables agronómicas.

Las plantas de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculadas respondieron significativamente a la infección y esporulación por los hongos MA nativos, mostrando altos niveles de infección micorrizal y producción de esporas MA.

El mayor porcentaje de infección micorrizal fue alcanzado por las plantas inoculadas con el tratamiento que contenía consorcios micorrízicos del género *Glomus* spp.

El mayor rendimiento en la tasa de crecimiento, porcentaje de materia húmeda y seca, así como, pelos radicales y longitud de raíz por planta y por volumen de suelo fue alcanzado por el tratamiento que contenía consorcios micorrízicos del género *Glomus* spp.

El género micorrizico predominante con mayor abundancia relativa dentro de la población de esporas aisladas en los tratamientos fue *Glomus*.

5.2. RECOMENDACIONES

El consorcio micorrízico de *Glomus* spp. tiene un gran potencial para ser utilizado como biofertilizante para plantas de fréjol en virtud de todos los beneficios que en esta investigación se han evidenciado.

Utilizar varias tipos de plantas trampas en la multiplicación de estos hongos ya que los hongos MA no son altamente específicos en el momento de infectar a una planta determinada pero si existe afinidad o compatibilidad con ciertas especies vegetales, tal es el caso de los consorcios micorrízicos compuestos por *Acaulospora* spp. y *Scutellospora* spp. que si bien no tuvieron el rendimiento que se obtuvo al inocular *Glomus* spp. no significa que no puedan ser utilizados como posibles biofertilizantes.

Realizar nuevos aislamientos de hongos MA nativos en cultivos o plantaciones con poca perturbación humana con el fin de caracterizarlas, identificarlas y evaluar el comportamiento de las mismas, con el objeto de producir un banco germoplásmico de estos individuos como inoculo potencial.

Continuar con este tipo de investigaciones con el fin de evaluar las micorrizas nativas en los diferentes cultivos agroforestales.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

6.1. Bibliografia.

Alarcón, A; Ferrera-Cerrato, R. 2003. Biotecnología de los hongos Micorrízicos arbusculares. Microbiología de suelos. Carretera México-Texcoco. 7p.

Aragão F. J. L., L. M. G. Barros, A. C. M. Brasileiro, S. G. Ribeiro, F. D. Smith, J. C. Sanford, J. C. Faria & E. L. Rech. 1996. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. Theoretical and Applied Genetics 93: 142-150.

Arbo, M; González, A. 2006. Botánica Morfológica. Morfología de las plantas vasculares. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste,

Corrientes, Argentina. Disponible en: http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema20/20-9micorrizas.htm

Barboza, L. 2002. Estudio de la polinización natural del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Alajuela. Informe de práctica de especialidad. Instituto Tecnológico de Costa

Barea, J; Azcon–Aguilar, C. 1982. Production of plant growth – regulating substances by the vesicular - arbuscular mycorrhizal gungi *Glomus mosseae*. Rev. Applied and enviromental Microbiology. 43: 810 – 813.

Bernal, G; Morales, R. 2006. Micorrizas: Importancia, Producción e investigación en el Ecuador. ANCUPA. Quito-Ecuador. 56p.

Blanco, F; Salas, E. 1996. Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. X Congreso nacional agronómico/II Congreso de suelos. Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional. Costa Rica. p. 69

Broughton, W. J., G. Hernández, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts & J. Vanderleyden 2003.

Castillo, C. 2005. Biodiversidad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares en ecosistemas agro-forestales del centro sur de Chile. Tesis Ph: D. Universidad de la Frontera. 124 p.

Claassen, N; Steingrobe, B. 1999. Mechanistic simulation models for a better understanding of nutrient uptake from soil. In Rengel, Z. Minerals nutrition of crops. Fundamental mechanisms and implications. New York, US. Haworth Press. p 327 – 367.

Coyne, M. 2000. Microbiologia del suelo un enfoque exploratório. Editorial Paraninfo ITP An Internacional Thomson Publishing Company. Madrid-España. 416 p.

De La Vega, J. 2006. Suelos y Ecosistemas. Las Micorrízas de mayor importancia son: Endomicorrizas, Ectomicorrizas lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Disponible en: http://j.delavegal.googlepages.com

Duchicela, J. 2001. Proyecto de Tesis. Evaluación del uso de endomicorrizas vesiculo arbusculares (MVA) en la obtención de plántulas de tomate de árbol Solanum betaceum Cav. ESPE-Facultad de Ciencias Agropecuarias. Sangolqui-Ecuador.

Duchicela, J; González Ma. Del C. 2003. La Micorriza Arbuscular en el Contexto de la Agricultura Sustentable. Monografía CEINCI – 02 – 03. 19p.

Fogar, M; Iglesias, M; Cracogna, M. 2002. Potencial eficacia de la inoculación con endomicorrizas del genero *Glomus* en maíz *(Zea mays)* y su impacto sobre la actividad biológica. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE. *Corrientes Agronómicas*. Vol. 17: 63-67.

Gaur, S, Kaushik, P. 2012. Effect of Seasonal Variation on Mycorrhizal Fungi Associated with Medicinal Plants in Central Himalayan Region of India. American Journal of Plant Sciences 3: 618-626.

Gerderman, J; Nicholson, T. 1963. “Spores of mycorrihizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting”. *Transactions of the British Mycological Society*. 46: 235 - 244.

Giovanetti, M; Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. New phytologist 84: 489-500.

Hermard, C; Ilabaca, C; Jeres, G; Sandoval, P; Ulloa, A. 2002. Aspectos generales de las Micorrizas: Efecto de las micorrizas sobre la nutrición mineral de las plantas. 10 p. Disponible en:

Hernández, A. 1999. Las Micorrizas. (En línea). Centro de estudios ecológicos. Argentina. Disponible en: http://www.cdeea.com/micorrizas1.htm

http//:www.forestaluchile.cl/curso/fivegf/mico

Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA). Guías y Manuales para la producción de frijol. S/e. Guatemala, 2003. 137 p.

Jungk, A. 2002. Dynamics of nutrient movement at the soil-root interface. In Waisel, Y.; Eshel, A. & Kafkafi, U. (eds) Plant Roots the hidden half. 3 ed. New York, US. p. 587 – 616

Jungk, A; Claassen, N. 1997. Ion diffusion in the soil-root system. *Advances in Agronomy* 61:53-110.

Moreno, M. 2003. Secuencia de cultivos y control de arvenses en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Efecto sobre la dinámica de las arvenses y el rendimiento del cultivo en el periodo de 1994-1996. Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional Agraria (UNA). Managua, Nicaragua. 28 p.

Moreno, P. 1988. Inoculación de micorrizas mva en papa *(solanum tuberosum)* respuesta en el crecimiento y nutrición de plantas inoculadas en invernadero y en campo. *Revista Latinoamericana de la Papa* 1**,** 84-103.

Moreta, D. 2002. Evaluación de sustratos inorgánicos para la exportación de inoculante de micorriza vesico-arbuscular. Tesis de Ing. Agro. Zamorano. 60 p.

Paul, E; Clark, F. 1996. Soil Microbiology and Biochemistry. 2 ed. USA. Academic Press. 340 p.

Phillips, J; Hayman, D. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vasicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection". *Transactions of the British Mycological Society*. 55:158-161.

Prieto, O; Belezaca, C; Mora, W; Vallejo, E; Gutiérrez V; Pinargote E. 2011. Inoculación de *Brachiaria decumbens* con hongos formadores de micorriza arbuscular nativos del trópico húmedo ecuatoriano. Ciencia y Tecnología, 4(2): 9-18.

Rodríguez, C. L. & R. X. Fernández. 2003. Los frijoles (*Phaseolus vulgaris*): su aporte a la dieta del costarricense. Acta Médica Costarricense 45(3).

Román, F. 2003. Concentración de reguladores de desarrollo vegetal inducida por hongos ENDOMICORRIZICOS en dos cultivares de Chile (*Capsicum annuum* L.) Tesis Dr. Biotecnología. Colima-México. Universidad de Colima. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. 121 p.

Saénz, V. 2002. Evaluación y caracterización de cuatro inoculantes comerciales de micorrizas en Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), pasto Tanzania (*Panicum máximum* Jacq) y pasto Transvala (*Digitalia decumbens* Stent). Tesis Ing. Agro. Tegucigalpa, HON. Universidad Zamorano. 36 p.

Salgado, T. 2001. Efecto de la secuencia de cultivos y controles de maleza, rendimiento y beneficio económico del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Barcelona. Managua, Nicaragua. 50 p.

Sánchez, P. D.; M. S. Ruíz, S. H. Maldonado, E. V. Pineda, M. G. Chavira, S. F. Velásquez, J. A. Gallegos & A. M. Avilés. 2005. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science. PSL 7420: 1-6.

Schalamuk, S; Chidichimo, H; Cabello, M. 2007. Variaciones en la composición de especies de Glomeromycota (Fungi) en un cultivo de trigo bajo distintos sistemas de labranza. Bol Soc Argent Bot 42 : 45-53.

SEPSA y FAO. 2006. Estudio de competitividad del frijol en Costa Rica con la metodología de la matriz de análisis de política (MAP). Proyecto TCP/COS/3001 (A). Costa Rica. (Consultado 9 junio 2008, www.infoagro.go.cr/TCPCOS_3001(A)/Documentos/frijol.pdf).

Serralde, M: Ramírez, M. 2004. Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. Rev Corpoica 5: 31-40.

Sieverding V. 1990 Efecto de la micorrizas arbustivas en Café (*Cafelea arabiga*). Acta Agronómica 40(2): 89 – 99.

Smith, E; Read, J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3rd Ed. Academic Press.

Vázquez, S; Morales, L. 2000. Adsorción de fosforo en suelos ácidos de misiones. Cátedra de Edafología. Facultad de Ciencias Agrarias-UNNE. Argentina. 4 p.

Veltcheva, M. & D. Svetleva. 2005. *In vitro* regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via organogenesis from petiole explants. Journal Central European Agriculture. 2005(1):

Wang YY, Vestberg M, Walker Ch, Hurme T, Zhang X, Lindström K. 2008. Diversity and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils of the Sichuan Province of mainland China. Mycorrhiza 18: 59-68.

Yao, M; Tweddell, R; Désilets, H. 2002. Effect of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of micropropagated potato plantlets and on the extent of disease caused by Rhizoctonia solani. Mycorrhiza 12: 235-242.

CAPITULO VII

ANEXOS

Anexo 1. Escala para evaluación de densidad de colonización micorrízica (Visual) y categorías de pelos radicales en raíces de fréjol.

CATEGORIAS MICORRIZACIÓN	0	1	2	3	4	5
DENSIDAD VISUAL (%)	0	1¸0	2,5	15,5	35,5	47,5

CATEGORIAS PELOS RADICALES	0	1	2	3	4	5
CANTIDAD	**AUSENTES**	**MUY POCOS**	**POCOS**	**POCOS**	**MUCHOS**	**MUCHOS**
LONGITUD		**CORTOS O LARGOS**	**CORTOS O LARGOS**	**CORTOS Y LARGOS**	**CORTOS Y LARGOS**	**LARGOS**

Anexo 2. Análisis de varianza de las variables evaluadas en la presente investigación.

Altura de plantas

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Media	F Calculada	Probabilidad
Tratamientos	3	449,76	149.92	80.157	< 0.05
Error	16	88,04	5.50		
Total	19	537,80			

Peso húmedo del sistema foliar

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Media	F Calculada	Probabilidad
Tratamientos	3	180,20	60,06	31,23	< 0.05
Error	16	30,78	1,92		
Total	19	210,97			

Peso seco del sistema foliar

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Media	F Calculada	Probabilidad
Tratamientos	3	23,18	7,72	38,64	< 0.05
Error	16	3,20	0,20		
Total	19	26,38			

Peso húmedo del sistema radicular

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Media	F Calculada	Probabilidad
Tratamientos	3	171,70	57,23	30,07	< 0.05
Error	16	30,45	1,90		
Total	19	202,15			

Peso seco del sistema radicular

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Media	F Calculada	Probabilidad
Tratamientos	3	25,30	8,43	41,60	< 0.05
Error	16	3,24	0,20		
Total	19	28,55			

Longitud total raíz por panta RL (m)

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Media	F Calculada	Probabilidad
Tratamientos	3	2871,64	957,21	62,80	< 0.05
Error	16	243,87	15,24		
Total	19	3115,52			

Longitud total raíz por volumen de suelo RLv (m m^3)

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Media	F Calculada	Probabilidad
Tratamientos	3	0,04	0,016	22,48	< 0.05
Error	16	0,01	0,00073		
Total	19	0,05			

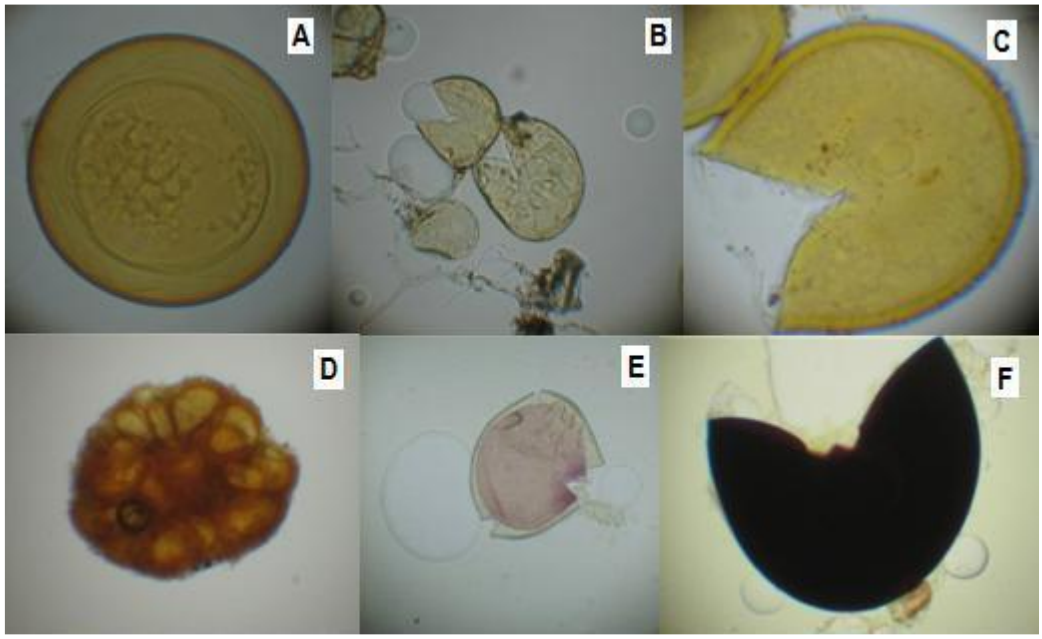
Porcentaje de densidad visual micorrización

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Media	F Calculada	Probabilidad
Tratamientos	3	892,39	297,46	86,83	< 0.05
Error	16	54,81	3,42		
Total	19	947,20			

Porcentaje de pelos radicales

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Media	F Calculada	Probabilidad
Tratamientos	3	2,20	0,735	5,54	< 0.05
Error	16	2,12	0,132		
Total	19	4,32			

Anexo 3. Fotografías de esporas de hongos micorrízicos arbusculares



Esporas de los géneros aislados de plantas de fréjol previamente inoculadas con consorcios micorrízicos arbusculares: A) *Acaulospora*, B) *Glomus*, C) *Glomus*, D) *Acaulospora*, E) *Scutellospora*, F) *Glomus*.

Anexo 4. Fotografías de la fase de laboratorio

Identificación de hongos micorrízicos arbusculares en plantas de *phaseolus vulgaris* L. (fréjol).

Identificación de hongos micorrízicos arbusculares en plantas de *phaseolus vulgaris* L. (fréjol).