UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
UNIDAD DE POSGRADO

MAESTRÍA EN MANEJO Y APROVECHAMIENTO FORESTAL

Proyecto de investigación y desarrollo previa la obtención del Grado Académico de Magíster en Manejo y Aprovechamiento Forestal.

TEMA

HONGOS MICORRÍZICOS DE PLANTACIONES DE (MELINA) Y SU POTENCIAL COMO BIOFERTILIZANTES EN PLÁNTULAS A NIVEL DE VIVERO. AÑO 2015.

AUTOR

ING. FOR. FABRICIO FABIÁN MEZA BONE

DIRECTOR

ING. CARLOS BELEZACA PINARGOTE, PhD

QUEVEDO – ECUADOR

2016

HOJA EN BLANCO

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
UNIDAD DE POSGRADO

MAESTRÍA EN MANEJO Y APROVECHAMIENTO FORESTAL

Proyecto de investigación y desarrollo previa la obtención del Grado Académico de Magíster en Manejo y Aprovechamiento Forestal.

TEMA

HONGOS MICORRÍZICOS DE PLANTACIONES DE (MELINA) Y SU POTENCIAL COMO BIOFERTILIZANTES EN PLÁNTULAS A NIVEL DE VIVERO. AÑO 2015.

AUTOR

ING. FOR. FABRICIO FABIÁN MEZA BONE

DIRECTOR

ING CARLOS BELEZACA PINARGOTE, PhD

QUEVEDO – ECUADOR

2016

CERTIFICACIÓN

El Ing. Carlos Belezaca Pinargote PhD, en calidad Director del Proyecto de investigación, previa la obtención del Grado Académico de Magister en Manejo y Aprovechamiento Forestal.

CERTIFICA:

Que el Ing. **Fabricio Fabián Meza Bone** autor de la investigación titulada: Hongos micorrízicos de plantaciones de (melina) y su potencial como biofertilizantes en plántulas a nivel de vivero, ha sido revisada en todos sus componentes, por lo que autoriza su presentación para ser sometido a evaluación por parte del tribunal examinador que se designe.

Ing. Carlos Belezaca Pinargote Ph.D

AUTORÍA

La investigación, Análisis e interpretación de resultados, Conclusiones y Recomendaciones, presentadas en esta Tesis de Magister en Manejo y Aprovechamiento Forestal, son de exclusiva responsabilidad del Autor.

Ing. Fabricio Fabián Meza Bone

DEDICATORIA

A Dios, quien me ha dado lo necesario para poder ser una persona equilibrada.

A mis padres, Mateo Alejandro Meza Chica y Amalia Bone Carrea, por ser un ejemplo y modelo a seguir y por poseer el don de la bondad.

A mí esposa, Jesica Mariana Cachipuendo Castillo, por ser la persona que le ha dado sentido y estabilidad a mi vida, y sin lugar a duda por darme la alegría de tener hijos preciosos: Mishell D. Romero, Dyland M. Meza y Fabricio A. Meza.

A, Carlos Javier Meza Bone, Jesica Sayonara Meza Bone y Gary Alex Meza Bone, por brindarme su confianza, no solo de hermanos si no también la de amigos incondicionales.

Ing. Fabricio Fabián Meza Bone

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, por dar la oportunidad de formar profesionales y brindar apoyo para que se efectuasen investigaciones que contribuyan a soluciones de problemas que se presentan en la sociedad.

A los docentes de la UTEQ, Ph. D, Carlos Belezaca Pinargote y M.Sc. Oscar Prieto Benavides Director y codirector de mi tesis de grado, por haber compartido no solamente sus principios como docentes y profesionales, sino también la de compañero y amigo que de una otra manera fue el nexo positivo para que se realice esta investigación.

A los compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal e Invernadero de la UTEQ.

A la M.Sc. Diana Veliz, encargada del laboratorio de suelo de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo; por su apoyo constante en el desarrollo de la investigación.

A mis familiares y amigos, personas que motivaron el desarrollo de esta investigación.

Ing. Fabricio Fabián Meza Bone

PRÓLOGO

El contenido de esta investigación, con el tema, “hongos micorrízicos de plantaciones de melina y su potencial como biofertilizantes en plántulas a nivel de vivero”, expone de general el desarrollo del trabajo investigativo, donde el primer capítulo, describe el marco contextual de la investigación, localizada en el cantón Valencia y en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal de la Universidad Técnica Estatal Quevedo (UTEQ), centrando el problema en el desconocimiento del comportamiento de la especie forestal melina frente a la inoculación con hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA), presentándose como un insumo microbiológico a nivel de vivero.

El autor desarrolla el marco teórico de la investigación, seguido de la fundamentación conceptual enmarcada en los aspectos generales de los HMA; y la fundamentación teórica basada en la recopilación de las citas bibliográficas de los HMA asociados a los sistemas de producción, los mismos que se encuentran relacionados con las interacciones biológicas de la *Gemelina arbórea* Roxb, especie forestal de rápido crecimiento y de interés comercial

Basado en este contexto, el trabajo se traduce en los resultados esperados de la investigación, habiendo identificado y cuantificado a los HMA en plantaciones de *Gemelina arbórea* Roxb de 1 y 3 años de edad, logrando obtener a nivel de campo y de laboratorio la relación de HMA asociados con las especie forestal, y que pudieran ser incluidos como insumos microbiológicos en plántulas de *Gemelina arbórea* Roxb a nivel de vivero.

Atentamente,

Ing. Alejandro Meza

RESUMEN

La presente investigación, se realizó a nivel de campo en 2 plantaciones de *G. arbórea* Roxb de 1 y 3 años de edad, localizadas en la zona de influencia de la UTEQ. Los estudios a nivel de laboratorio y vivero se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal de la UTEQ, localizado en el Campus Ing. Manuel Haz Alvares, ubicado en el Km 1,5 de la vía Quevedo – Quito; con el propósito de evaluar a los HMA de plantaciones de *G. arbórea* Roxb al ser identificados, cuantificados y conocer los costos de producción al ser utilizados como potencial biofertilizante en plántulas a nivel de vivero. Para el trabajo de campo y de laboratorio se utilizó como instrumento de investigación la estadística descriptiva, utilizando plantaciones de *G. arbórea* Roxb de 1 y 3 años de edad. A nivel de campo se consideró a la población el área total y para la muestra 1 kg de sustrato en cada una de las plantaciones establecidas para ser identificadas y cuantificadas a nivel de laboratorio. Los resultados mostraron un porcentaje de colonización micorrízica en raíces de la plantación de melina de 1 año de edad *(*1,9%) seguido de la de 3 años de edad (1,7%) respectivamente. Para las plantaciones de 1 y 3 años de edad se obtuvo, pH en Agua (H_2O) y en Cloruro de potasio (KCl), con un rango de ligeramente ácido y modernamente ácido (6,23 y 6,45); (5,22 y 5,25), respectivamente. Se identificaron y cuantificaron por cada 100 gramos de suelo húmedo (gsh $^{-1}$) procedente de plantaciones *G.arbórea* Roxb, los géneros de HMA *Glomus y Gigaspora*, pero el mayor número de esporas se presentó en 1año, con 45 esporas, seguido de la de 3 años de edad, con 33 y 29 esporas respectivamente. Los costos de producción estimados al incluir HMA en plántulas de melina a nivel de vivero, tuvieron una Relación Beneficio/Costo de 1,19 dólares y una rentabilidad de 18,54%.

ABSTRACT

This research was conducted at the field level 2 Roxb tree plantations *G. arbórea*. 1 and 3 years old, located in the hinterland of the UTEQ. Studies in the laboratory and nursery were conducted at the Laboratory of Environmental Microbiology and Plant UTEQ, located in the Campus Make Ing Manuel Alvares, located at Km 1.5 of the Quevedo route - Quito; in order to evaluate HMA tree plantations *G. arbórea* to be identified, quantified and meet production costs to be used as biofertilizer potential level nursery seedlings. For the fieldwork and laboratory research instrument used descriptive statistics, using tree plantations *G. arbórea* 1 and 3 years old. At the field level to the total population considered for the sample and 1 kg of substrate in each of the plantations established to be identified and quantified in the laboratory area. The results showed a percentage of mycorrhizal colonization of roots planted melina 1 year of age (1.9%) followed by 3 years of age (1.7%) respectively. For plantations of 1 and 3 years of age was obtained, pH in water (H2O) and potassium chloride (KCl), with a range of modern and slightly acidic acid (6.23 and 6.45); (5.22 and 5.25), respectively. They were identified and quantified per 100 grams of moist (gsh -1) *G. arbórea* from plantations, genera *Glomus* HMA and *Gigaspora*, but more spores occurred in 1 year, with 45 espors, followed by 3 years of age, with respectively 33 and 29 spores. Production costs include estimated at HMA in melina seedlings nursery level, they had a benefit / cost ratio of 1.19 and a yield of 18.54%.

INDICE

PORTADA i
HOJA EN BLANCO ii
COPIA DE PORTADA iii
CERTIFICACIÓN iv
AUTORÍA v
DEDICATORIA vi
AGRADECIMIENTO vii
PRÓLOGO viii
RESUMEN ix
ABSTRACT x
INDICE... xi
INDICE DE CUADROS xiv
INDICE DE FIGURAS xv
INTRODUCCIÓN xvi

CAPÍTULO I. MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN 1

1.1 Ubicación y contextualización de la problemática 2
1.2 Situación actual de la problemática 2
1.3 Problema de investigación 4
1.3.1 Problema general 4
1.3.2 Problemas derivados 4
1.4 Delimitación del problema 4
1.5 Objetivos 5
1.5.1 Objetivo general 5
1.5.2 Objetivos específicos 5
1.6 Justificación 6

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN 7

2.1 Fundamentación conceptual 8

2.1.1 Aspectos generales de las micorrizas 8
2.1.2 Antecedentes históricos 9
2.1.3 Clases de micorrizas 10
2.1.4 Características generales de la *G. arbórea* Roxb 16
2.1.5 Manejo de vivero 17
2.1.6 Índices morfológicos de plántulas 17
2.2 Fundamentación teórica 18
2.2.1 Micorrizas en árboles y en sistemas agroforestales 18
2.2.2 Efecto de la aplicación de micorrizas y de inóculos en el desarrollo de plántulas de *Eryhrina edulis* (Chachafruto). 18
2.2.3 Efectos de HMA y bacterias estimuladoras del crecimiento vegetal en el desarrollo y absorción de fosforo (P) por *Leucaena leucocephala* 19
2.2.4 Manejo de la micorrización controlada y factores que la afectan 20

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN 21

3.1 Tipo de investigación 22
3.2 Método de investigación 22
3.3 Población y muestra 24
3.3.1 Población 24
3.3.2 Muestra 24
3.4 Fuentes de recopilación de la información 24
3.5 Instrumento de la investigación 26
3.5.1 Tinción de raíces de *G. arbórea* Roxb 26
3.5.2 Aislamiento e identificación de HMA 27
3.5.3 Medición de pH del suelo 28
3.6 Procesamiento y análisis 28
3.6.1 Propuesta para incluir HMA como insumo microbiológico en plántulas de *G. arbórea* a nivel de vivero 29
3.6.2 Ubicación del proyecto 29
3.6.3 Recursos del proyecto 29
3.6.4 Reproducción de inóculos seleccionados 30

CAPITULO IV. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS 32

4.1 Porcentaje de colonización micorrízica en raíces de *G. arbórea* Roxb. 33

4.1.1 PH en el suelo de las diferentes edades de las plantaciones de *G. arbórea* Roxb. 34

4.1.2 Población de HMA en plantaciones de *G. arbórea* Roxb de 1 y 3 años de edad 36

4.2 Costos de producción para incluir HMA como insumo microbiológico en plántula de *G. arbórea* Roxb a nivel de vivero 38

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 40

5.1 Conclusiones 41

5.2 Recomendaciones 41

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 43

ANEXOS 50

Anexo 1. Valores de densidad de colonización micorrízica en 150 raicillas de 1 año de edad en plantaciones de *G. arbórea Roxb.* 51

Anexo 2. Valores de densidad de colonización micorrízica en 150 raicillas de 3 años de edad en plantaciones de *G. arbórea Roxb.* 52

Anexo 3. Fotografías de la preparación y observación para el conteo de raicillas de melina (*G. arbórea* Roxb) micorrizadas; y, resultados de la determinación del pH en muestras de suelo. 53

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Variables edafoclimáticas en dos plantaciones de *G. arbórea* Roxb de 1 y 3 años de edad, ubicados en la zona de influencia de la UTEQ, Trópico Húmedo Ecuatoriano. 25

Cuadro 2. Tabla para evaluar la densidad de colonización micorrízicas en 150 raicillas en plantaciones de *G. arbórea* Roxb de 1 y 3 años de edad. 25

Cuadro 3. Tabla para evaluar la población de esporas de HMA aisladas por 100 gramos de suelo (gsh^{-1}) en plantaciones de *G. arbórea* Roxb, de 1 y 3 años de edad utilizando tamices con diferentes dimensiones. 26

Cuadro 4. PH en el suelo de dos edades de plantaciones de *G. arbórea* Roxb. ... 35

Cuadro 5. Géneros y número de esporas de HMA obtenidos por cada 100 gramos de suelo húmedo (gsh-1), en tamices con apertura de mallas de 425, 90 y 25 µm, en dos plantaciones forestales de *G. arbórea* Roxb..... 36

Cuadro 6. Muestra los costos de producción estimados y suministros al incluir HMA en 6500 plántulas de *G. arbórea* Roxb a los 25 días de mantenimiento en el vivero. 39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de densidad de colonización micorrízica en raíces de *G. arbórea* Rox, de las plantaciones forestales. Los valores representan la media de 150 raicillas evaluadas, con barras de desviación estándar y error estándar. 33

Figura 2. Géneros y números de esporas de HMA obtenidos por cada 100 gramos de suelo húmedo (gsh^{-1}), en plantaciones de *G. arbórea* Roxb. 36

Figura 3. Costos de producción y recursos económicos estimados al incluir HMA en 6500 plántulas de *G.arbórea* Roxb a los 25 días de mantenimiento en el vivero 39

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha reconsiderado muchos de los sistemas de producción actuales, debido al uso desmedido de insumos químicos, incluyendo fertilizantes y pesticidas; dando lugar a una gran contaminación, a la disminución de la biodiversidad microbiológica del suelo y a la degradación de ecosistemas frágiles (Hernández & Salas, 2009).

Por tal razón, una nueva corriente de producción agrícola, enfocada en la sostenibilidad de los sistemas de producción, mediante el uso de componentes orgánicos, tratan de sustituir las prácticas de producción convencional. Para esto se requiere de una visión más amplia de las interacciones biológicas dentro de los agroecosistemas; en este sentido, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) parecen ser un componente fundamental dentro de las nuevas alternativas de producción. Además de las funciones conocidas en la nutrición de las plantas de los HMA, pueden influir en el proceso estructural y de agregación del suelo, razones positivas a ser consideradas como efecto de estos microorganismos, tanto a nivel de la fisiología y nutrición vegetal, como componentes importantes de la visión holística en la restauración y mantenimiento de ecosistemas (Hernández & Salas, 2009).

Por otra parte, *Gmelina arbórea* Roxb es una especie forestal exótica de rápido crecimiento, que se ha adaptado satisfactoriamente a las condiciones del Trópico húmedo Ecuatoriano (ThE), a tal punto que existen 2366 ha^{-1} plantadas con esta especie (Reybanpac, 2012). No obstante, y considerando la buena adaptabilidad que esta especie forestal ha tenido en el ThE, es de sospechar que a más de las condiciones ambientales favorables para su desarrollo, factores biológicos como los HMA tributarían al buen desempeño dasométrico de la especie en la región. En este contexto, la producción de *G. arbórea* Roxb en la zona de influencia de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), sería significativamente favorecida, mediante la selección de inoculantes biológicos basados en HMA procedentes de plantaciones establecidas, y aplicados desde la etapa de vivero.

Se conoce que especies forestales a nivel de vivero responden satisfactoriamente a inoculaciones de HMA, mostrando respuestas superiores a las variables dasométricas, frente a plántulas no inoculadas, y por tanto garantizando su sobrevivencia en el campo (Donoso *et al.*, 2008).

El primer capítulo, describe el marco contextual de la investigación, localizada en el cantón Valencia y en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal de la Universidad Técnica Estatal Quevedo (UTEQ), centrando el problema en el desconocimiento del comportamiento de la especie forestal melina frente a la inoculación con hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA), presentándose como un insumo microbiológico a nivel de vivero.

En el segundo capítulo, se desarrolla el marco teórico de la investigación, seguido de la fundamentación conceptual enmarcada en los aspectos generales de los HMA; la fundamentación teórica basa en la recopilación de las citas bibliográficas de los HMA asociados a los sistemas de producción.

El tercer capítulo, se plantea la metodología de la investigación a través de la estadística descriptiva; además se describen los materiales y métodos permitiendo a través de estos instrumentos el desarrollo de la construcción metodológica que se encuentran comprendida por la población y muestra al ser direccionada en la fase de campo y laboratorio.

El cuarto capítulo, se muestran los análisis e interpretación de los resultados, enmarcado en cada uno de los objetivos específicos propuestos en la investigación; y el capítulo cinco se detallan las conclusiones y recomendaciones llegando hacer una extensión de los resultados y de los objetivos específicos de la investigación

CAPÍTULO I

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Ubicación y contextualización de la problemática

La tendencia mundial de *G. arbórea* Roxb en el manejo de los bosques naturales como áreas para satisfacer las necesidades de productos forestales, en los países de origen, ha decaído considerablemente en los últimos años, debido a la baja productividad y a los impactos ambientales negativos que genera el aprovechamiento forestal (Hernández & Salas, 2009).

En la ciudad de Quevedo los problemas de producción y abastecimiento de materia prima como es el caso de la *G. arbórea* Roxb se encuentra determinada por sus condiciones de productividad y escala de aprovechamiento; este tipo de plantaciones puede constituir una importante opción para garantizar el abastecimiento de materia para la industria forestal, reduciendo así los valores negativos de la balanza comercial de productos forestales, principalmente los celulósicos. Sin embargo, los problemas de producción y abastecimiento de materia prima no se solucionarían únicamente con el establecimiento de plantaciones; para ello es necesario desarrollar alternativas que contribuyan a la recuperación y sostenibilidad de la fertilidad del suelo, a través de agentes biológicos como los HMA.

La investigación a nivel de campo se realizó en 2 plantaciones de *G. arbórea* Roxb de 1 y 3 años de edad, localizadas en la zona de influencia de la UTEQ. Los estudios a nivel de laboratorio y vivero se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal de la Universidad Técnica Estatal Quevedo (UTEQ), localizado en el Campus Ing. Manuel Haz Alvares, ubicado en el Km 1,5 de la vía Quevedo – Quito.

1.2 Situación actual de la problemática

El mejoramiento genético forestal del país, y de la provincia de Los Ríos se lo puede calificar como incipiente. A pesar del potencial vegetal que tiene el Ecuador, las plantaciones forestales y muchos sistemas agroforestales existentes, se establecieron con material genético importado, desconociéndose en parte su

procedencia u origen, esto significa que provinieron de áreas eco-geográficas diferentes a las zonas plantadas en Ecuador.

Sin embargo, *G. arbórea* Roxb especie forestal introducida, se ha adaptado satisfactoriamente a las condiciones edafoclimáticas del ThE, convirtiéndose en una especie ampliamente demandada en planes y programas de reforestación de país (Reybampac, 2012). No obstante, se conoce que esta especie forestal posee una etapa crítica en su ciclo biológico, que es la fase de vivero, y posterior establecimiento a nivel de campo, con significativas pérdidas por plántulas muertas (Hernández & Salas, 2009). Adicionalmente, se ha observado en viveros forestales ubicados en el área de influencia de la UTEQ, la presencia de plántulas de *G. arbórea* Roxb con amplia heterogeneidad en cuanto a variables dasométricas evaluadas: altura y diámetro del tallo, longitud y desarrollo de la raíz principal, así como en el número y tamaño de las hojas primarias, pese a ser un vivero coetáneo. Esta falta de uniformidad morfológica afecta los esquemas de producción ya que un significativo porcentaje de plántulas mueren en los primeros estadios por su escaso vigor, mientras que otras mejor favorecidas crecen lentamente necesitando permanecer mayor tiempo en el vivero, hasta alcanzar el tamaño apropiado antes de ser movilizadas a los sitios de plantación, elevando inevitablemente los costos de producción.

Diversos factores pueden afectar el desarrollo, actividad y supervivencia de microorganismos benéficos, como es el caso de los HMA, debido a los sistemas de producción convencionales demandan el uso excesivo de fertilizantes químicos y pesticidas. Además las malas prácticas culturales como la rotación de cultivos y labranza, afectan los niveles de colonización de raíces y el potencial de las micorrízicas arbusculares en campo (Guerra, 2008).

Es notoria la necesidad de investigar nuevas alternativas para asegurar la calidad de plántulas a nivel de vivero, existiendo un desconocimiento en el Ecuador de los HMA asociados a melina, al no existir reportes de investigaciones de esta índole, por lo que se presenta como una alternativa viable para disminuir la aplicación los fertilizantes químicos que ejercen impactos negativos sobre los HMA.

1.3 Problema de investigación

1.3.1 Problema general

- ¿Cuál es el estado de los HMA, como inoculantes en plantaciones de *G. arbórea* Roxb para el mejoramiento de la calidad de plántulas a nivel de vivero?

1.3.2 Problemas derivados

- ¿Cuál es el porcentaje de colonización micorrízica en raíces de *G. arbórea* Roxb?

- ¿Cuál es el procedimiento de aislamiento para la identificación de hongos formadores de micorriza arbuscular en plantaciones de *G. arbórea* Rox?

- ¿Cuál es el diseño de propuesta para incluir HMA como insumo microbiológico en plántulas de G. arbórea Roxb a nivel de vivero?

1.4 Delimitación del problema

La presente investigación se realizó en la zona de influencia de la UTEQ, provincia de Los Ríos.

CAMPO: Ciencias forestales
ÁREA: Ecología
ASPECTO: Biotecnológico
SECTOR: Vivero forestal
TIEMPO: Julio a diciembre del 2015

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar el estado de colonización micorrízica arbuscular en plantaciones de *G arbórea* Roxb, y su potencial como biofertilizante en plántulas a nivel de vivero.

1.5.2 Objetivos específicos

- Cuantificar el porcentaje de colonización micorrízica en raíces de *G. arbórea* Roxb.

- Identificar hongos formadores de micorriza arbuscular en plantaciones de *G. arbórea* Roxb.

- Diseñar una propuesta para incluir HMA como insumo microbiológico en plántulas de *G. arbórea* Roxb a nivel de vivero.

1.6 Justificación

G. arbórea Roxb, es una especie forestal de rápido crecimiento, siendo utilizada con fines de plantación y reforestación. En la actualidad esta especie forestal presenta serios problemas de sobrevivencia a la hora de establecer la plantación, llegando a estimarse hasta un 50% de mortalidad en el primer año. La sobrevivencia de las plántulas suele verse afectada por malas prácticas culturales, y por el aprovisionamiento de material inapropiado de semillas a nivel de vivero, teniendo como resultado plántulas de mala calidad. El uso de fertilizantes químicos inorgánicos es de vital importancia ya que ayuda a mejorar el desarrollo de las plántulas, pero el uso excesivo de la misma puede causar problemas de contaminación ambiental, alteraciones en la biota del suelo, y hasta eutroficación en cuerpos de agua donde van a parar muchos de los fertilizantes por lixiviación, arrastre, etc.

Ante esta problemática, se pretende reducir el uso de fertilizantes químicos inorgánicos y contribuir con la restauración de ecosistemas. Para lo cual se presenta a los HMA como una alternativa de producción limpia, que permite a través de este estudio conocer los tipos de hongos micorrízicos asociados a melina, procurando obtener a través su inoculación, y del manejo cultural, plántulas homogéneas, y por lo consiguiente aumentar la sobrevivencia y mejorar los parámetros dasométricos en el vivero.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Fundamentación conceptual

2.1.1 Aspectos generales de las micorrizas

Gran parte de la productividad de los cultivos está determinada por la fertilidad de los suelos (Barea & Jeffries, 1995). Los aspectos generales de la micorriza según (Guerra, 2008), menciona que la fertilidad del suelo puede considerarse desde tres puntos de vista: características físicas, características químicas y biológicas. La combinación e interacción de las tres características mencionadas, producen cambios significativos en los ciclos biogeoquímicos y en la disponibilidad de los nutrientes para las plantas. En cuanto al componente biológico, es reconocido que la gran mayoría de plantas capta los nutrientes por medio de interacciones que establece con los microorganismos que viven en la rizosfera, especialmente con aquellos que se han denominado simbiontes.

Más de 90% de las comunidades vegetales que se encuentran habitando el planeta, presentan la característica de formar la simbiosis micorrízica. Se conocen dos tipos principales de micorriza, las cuales tienen especial importancia para los aspectos ecológicos, así como en los procesos agrícolas y forestales: la Ectomicorriza y la Micorriza Arbuscular (Malloch *et al*., 1980). En el caso de la micorriza arbuscular, los hongos responsables de su génesis pertenecen a la Clase de los *Zygomicetes* y al Orden de los Glomales, distribuidos en seis géneros (*Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Scutellispora*) con un número no mayor de 250 especies en total (Walker, 1992).

2.1.1.1 Definición y concepto de micorriza

El término micorriza, que literalmente significa “hongo-raíz”, fue propuesto por Frank (1885), para definir asociaciones simbióticas (“vivir conjuntamente dos o más organismos”), mutualistas, no patógenas, entre raíces de plantas y micelios de hongos, en las que ambos resultan beneficiados. Actualmente, el concepto de “micorriza” se considera en un sentido más amplio, para dar cabida a aquellas asociaciones simbióticas hongo-planta que no se establecen en raíces, sino en

otros órganos de contacto, especializados para el intercambio de nutrientes, como ocurre en orquídeas y otras plantas aclorofílicas y en otras “plantas inferiores”, carentes de verdaderas raíces (Honrubia *et al.*, 2002).

El carácter heterótrofo de los hongos les condiciona a obtener su fuente carbonada a partir de otros organismos. Los hongos micorrízicos reciben directamente de las plantas los azúcares que precisan para desarrollarse. A cambio captan del suelo y ceden a sus hospedantes vegetales los nutrientes minerales y el agua que éstos necesitan para crecer. Básicamente, en ello consiste la simbiosis micorrízica. Sin embargo, en el caso de las plantas aclorofílicas, el flujo de nutrientes, incluidos los azúcares, es unidireccional, desde el hongo a la planta. Es decir, no hay un mutualismo trófico aparente en sentido estricto, aunque sí una simbiosis (“vivir conjuntamente dos o más organismos”), en la que, al menos, uno de los partícipes resulta beneficiado (Honrubia, 2009).

Se reconocen distintos tipos de micorrizas (Hunrubia *et al.*, 2002; Smith & Read 2008), en función de las especies fúngicas y vegetales que establecen la asociación y en función de su estrategia nutricional, que posibilita una penetración intracelular, o no, por parte del hongo dentro de las células corticales de la raíz del vegetal. En cualquier caso, en todos los tipos de micorrizas, se establece una interface de contacto íntimo entre hifas y células vegetales, donde se produce el intercambio de nutrientes de manera bidireccional (los nutrientes minerales son transvasados disueltos en agua desde el hongo a la planta, mientras ésta cede al hongo los azúcares procedentes de su actividad fotosintética) o unidireccional, como hemos indicado para orquídeas y plantas aclorofílicas. La raíz constituye en realidad un nicho ecológico donde se desarrolla el hongo (Brundrett, 2002)

2.1.2 Antecedentes históricos

Hacia la segunda mitad del siglo XIX, varios investigadores notaron la presencia de hongos en las raíces de las plantas, evidenciando que no mostraban ningún síntoma de enfermedad o necrosis. Los hongos micorrízicos son pues tan antiguos como las propias plantas; esto se puede deducir de la observación del primer

registro fósil, que se conoce de un vegetal, el fósil (*Aglaophyton*) del cuarzo Riñe, fechado en 370 millones de años, en la fase temprana Devoniana (Nicolson, 1975).

Los antecedentes históricos según (Guerra, 2008), menciona que la vida estaba únicamente en el agua, los vegetales podían utilizar directamente los elementos minerales disueltos en ella, y encontraban fácilmente recursos casi inagotables. Posteriormente, las plantas comenzaron a colonizar las tierras emergidas, hace unos 400 millones de años en el período Devónico, en donde encontraron condiciones totalmente adversas y hostiles. Los suelos procedentes de la degradación de las rocas, en donde los elementos minerales se encontraban básicamente en forma insoluble, su concentración fue extremadamente pequeña, en las soluciones del suelo, y los intercambios entre las formas solubles e insolubles fueron lentos. Por lo tanto, las soluciones de elementos minerales en el suelo se agotaban rápidamente, debido a la extracción que las raíces llevaban a cabo, sobre todo en la zona radical.

2.1.3 Clases de micorrizas

Según Osorio (2012) describe las principales clases de micorrizas:

Ectomicorrizas: corresponden a relaciones simbióticas entre especies vegetales de interés forestal y hongos Basidiomicetes y Ascomicetes.

Endomicorrizas o micorrizas arbusculares: se constituyen en la interacción entre las raíces de la mayoría de las especies vegetales incluyendo muchas especies de plantas de interés agropecuario y hongos Glomeromycetes, denominados HMA.

Aunque los HMA no presentan especificidad por una planta hospedera, en algunos experimentos se ha encontrado que la respuesta a la inoculación cambia en función del hongo utilizado. Sin embargo, esto puede ser debido a la calidad del inóculo más que a un mecanismo de especificidad.

2.1.3.1 Colonización micorrizal

Cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad son favorables, las esporas e hifas, que actúan como estructuras infectivas de los HMA, germinan en el suelo y entran en contacto con la superficie de las raíces. Durante este proceso de infección, el hongo micorrízico coloniza la epidermis y las células del córtex de la raíz (Osorio, 2012).

Dentro de éstos tejidos el hongo desarrolla estructuras llamadas arbúsculos que le permiten intercambiar nutrientes con la raíz. Las hifas del hongo pueden crecer externamente desde la raíz de la planta hacia el suelo y explorar un volumen de suelo al que las raíces no tienen acceso. Posterior a la formación de los arbúsculos, suelen aparecer, con algunos tipos de HMA, unas estructuras globosas e irregulares llamadas vesículas que se forman generalmente en los extremos de las hifas intrarradicales del hongo y son consideradas órganos de reserva (Osorio, 2012).

2.1.3.2 Factores que afectan el desarrollo, actividad y supervivencia de los HMA

Diversos factores pueden afectar el desarrollo, actividad y supervivencia de los HMA. Dentro de los más importantes, se encuentran las prácticas culturales agrícolas, particularmente la adición de fertilizantes, aplicaciones de pesticidas y rotaciones de cultivos, de igual forma los factores medioambientales son determinantes (Gianinazzi & Schuepph, 1994).

Las prácticas agrícolas, tales como la aplicación de fertilizantes, la rotación de cultivos, la labranza y abono con cal afectan los niveles de la colonización de las raíces y el potencial de HMA en campo. Por ejemplo, se ha encontrado que los altos niveles de la fertilización con fósforo bajan o inhiben la eficiencia de la micorriza en cultivos de soya (Ezawa *et al.*, 2000). Igualmente, los cambios en la fertilidad del suelo, debido a correcciones con fertilizantes minerales o materia orgánica, pueden afectar marcadamente la actividad de la población micorrízica

del suelo, en términos de la cantidad de raíz colonizada y el número de esporas producidas (Hayman, 1987).

Generalmente, una alta fertilización química con N, P y K en forma completa al suelo, conducen a una colonización mínima por parte de la micorriza arbuscular (MA), a tal grado que difícilmente se encontrarán asociaciones simbióticas en suelos cultivados intensivamente, en donde la MA tiende a extinguirse (Gianinazzi & Schuepph, 1994).
La fertilización química aplicada puede disminuirse de un 50 a 80%, ya que los HMA mejoran la absorción de nutrientes del suelo. Del 40 al 50% de los fertilizantes químicos aplicados se lixivian, contaminando suelos, ríos, arroyos, mantos freáticos y la atmósfera (Plenchette *et al.*, 1983).

- **El Nitrógeno (N)**

En cuanto a la absorción directa de N, aparentemente los HMA no desempeñan un papel importante, pero se ha demostrado que incrementa la capacidad de la fijación de N en las leguminosas. La mayoría de las plantas colonizadas se benefician con la simbiosis y muestran un incremento en el crecimiento, absorción de nutrientes, fijación de N_2 atmosférico (si también se le asocia con *Rhizobium* o con *Frankia*) etc. Sin embargo, la mayoría de las plantas muestran estas respuestas fisiológicas a la HMA a niveles bajos de fosforo (P) en la solución del suelo. Así, como también con una alta fertilización nitrogenada se ha demostrado que se afecta negativamente, la simbiosis con estos hongos (Boisson *et al.*, 2001).

- **El Fósforo (P)**

El principal papel de la micorriza arbuscular es proveer las necesidades de P a la planta, debido a que este elemento es extremadamente inmóvil en el suelo. Aun si el P se adiciona en forma soluble al suelo, este terminará por inmovilizarse como P inorgánico, fosfato cálcico, o cualquier otra forma fijada (Guerra, 2008).

El nivel de P en la solución del suelo está relacionado con la colonización radicular por la HMA, al haber un nivel bajo de P, hay un bajo nivel de fosfolípidos en la membrana vegetal, que conduce a una mayor exudación radicular, lo cual trae como consecuencia una estimulación en la colonización del endófito. Las formas existentes del P en el suelo, son poco solubles en el agua y por ello su concentración es muy pequeña (Guerra, 2008).

Entre 95 y 99% del P del suelo no está disponible para las plantas; esto incluye las formas orgánicas y mineral insoluble. La adición de cantidades bajas de fertilizante fosfatado es compatible, e incluso beneficia la simbiosis con la MA, ya que estimula el crecimiento de la planta, pero al incrementar la dosis se comienza a interferir la formación de la simbiosis, llegándose incluso a la inhibición de la colonización. Las diferentes especies de HMA muestran distintos grados de resistencia a la aplicación de fertilizantes y productos fitosanitarios; lo anterior trae como consecuencia, el interés práctico en relación con la selección de los HMA, específicos para una planta en un determinado suelo, que ha recibido dichos aportes (Hayman, 1987).

2.1.3.3 Transporte del fosfato

El transporte del fosfato, desde la solución del suelo hacia la planta, se presenta en tres fases: a) El fosfato es captado por las hifas externas de la planta, unas 1 000 veces más rápido, que por difusión en la solución del suelo; b) desde donde el fosfato es trasladado a través de las hifas intrarradicales, c) luego, ocurre la trasferencia al citoplasma o acumulación en las vacuolas, en forma de gránulos de polifosfato que son impulsados a través del lumen de las hifas, por corrientes citoplasmáticas hacia los arbúsculos, en donde el polifosfato es degradado y el ion fósforo es transferido a la célula hospedadora (Le Tacon, 1985). Para la formación de los gránulos de poli fosfatos, intervienen las polifosfatoquinasas específicas situadas en las hifas externas, mientras que en la degradación de dichos gránulos intervienen, las fosfatasas alcalinas (Guerra, 2008).

2.1.3.4 Áreas de aplicación de la micorriza arbuscular

Las plantas que han sido “micorrizadas” reciben beneficios adicionales, tales como, resistencia a estrés hídrico, exclusión y protección a patógenos del suelo y tolerancia a metales pesados. Se ha visto que las poblaciones naturales de HMA son a veces insuficientes o ineficientes para que se dé una buena simbiosis; esto afecta negativamente al desarrollo de los cultivos; por ello es que se pueden incrementar estos hongos, mediante la producción de inóculos nativos de un determinado suelo, o también se han aplicado hongos que sin ser nativos han resultado ser eficientes y competitivos. De estas dos prácticas, se prefiere el manejo agrocultural de los hongos nativos y no la introducción de hongos exóticos, pues estos últimos no están adaptados a las condiciones edáficas de un ecosistema en particular (Guerra, 2008).

2.1.3.5 Inoculación

Es el proceso de aplicar un sustrato que contenga estructuras infectivas (esporas, hifas, raíces infectadas) alrededor del sistema radical de la planta, con el fin de lograr la colonización de las raíces. La inoculación micorrízica se facilita en aquellos cultivos que tienen una fase de semillero, vivero o almacigo. En esos casos se puede aplicar el inóculo en el hoyo donde se siembra la semilla o la plántula. También se puede mezclar el inóculo con el sustrato de crecimiento de las raíces. La dosis es variable (20-40 g/kg) y depende, en buena parte, de la calidad del inóculo (Osorio, 2012).

2.1.3.6 Condiciones para la inoculación de plántulas con HMA

Según Osorio (2012) describe cuando es factible la inoculación a las plántulas.

- Las plantas requieren altas cantidades de P.

- La concentración de P disponible es baja.

- La población de HMA nativa del suelo es escasa, poco agresiva e ineficaz, como ocurre en suelos erosionados, degradados o contaminados.

- Se ha realizado un manejo intensivo de fungicidas.

- La especie vegetal depende de la asociación micorrízica. Algunas especies tienen una alta dependencia micorrízica, mientras que otras tienen baja dependencia y algunas son independientes de esta asociación.

2.1.3.7 Efectos de la asociación micorrízica

Los efectos de la asociación micorrízica según (Osorio, 2012) indica la amplia red de hifas extraradicales desarrolladas por los HMA se extienden desde la superficie de la raíz, esto aumenta considerablemente la superficie de absorción de la planta de 100 a 1000 veces, y por tanto su capacidad de absorción. A medida que las hifas crecen captan y transfieren nutrientes de baja difusión, principalmente P, Cu, Zn, entre otros, desde la solución del suelo hasta la planta huésped. Además de su papel en la nutrición vegetal, la asociación micorrízica contribuye significativamente al mejoramiento de la estructura del suelo, incrementa la resistencia de la planta al estrés hídrico, al ataque de enfermedades y favorece interacciones con otros microorganismos benéficos.

La inoculación micorrízica ha mejorado el crecimiento de plántulas de diversas especies vegetales como: aguacate, café, pastos, especies de interés forestal, entre otras. La calidad del inóculo es determinante para evaluar su efectividad sobre las plántulas; en general, se considera un inóculo adecuado cuando este contiene al menos 30 propagulos infectivos por g de suelo. Comercialmente se exige que haya 50 propagulos micorrizales infectivos por g de suelo. El inóculo micorrízico debe estar y mantenerse seco, esto le permite mantener su viabilidad por varios meses y aún años (Osorio, 2012).

Los mejores resultados con la inoculación micorrízica se obtienen cuando en la solución del suelo hay una concentración de P de 0.02 mg/L. Concentraciones

muy bajas (0.001-0.005 mg/L) no permiten que haya respuesta a la inoculación micorrízica, mientras que concentraciones muy altas (0.2 mg/L) inhiben la efectividad del hongo y en algunos casos generan efectos negativos del hongo sobre la plantas.

En el caso de las plántulas de pinos (*Pinus patula*, *P. tecunumanii* y *P. oocarpa*), la respuesta a la inoculación con hongos ectomicorrizicos es bastante relevante. Estas especies de interés forestal necesitan de la presencia de hongos en sus raíces para crecer satisfactoriamente. Con la inoculación de hongos ectomicorrizicos (*Amanita muscaria*) se puede asegurar un adecuado crecimiento de plántulas en el vivero y garantizar un buen establecimiento y desarrollo en el campo (Osorio, 2012).

Cuando las plántulas se trasplantan al campo sin el hongo micorrízico, su crecimiento y desarrollo es muy lento, hay más vulnerabilidad al ataque de fitopatógenos y, con frecuencia, las plántulas mueren, lo cual representa una pérdida económica muy alta (Osorio, 2012).

2.1.3.8 Los hongos micorrízicos como insumo microbiológico

Los HMA constituyen un insumo microbiológico promisorio para el desarrollo de una agricultura sostenible; su papel en el funcionamiento de los ecosistemas y su potencial como fertilizantes biológicos, son quizás motivos suficientes para considerarlos como uno de los componentes importantes en la agroecología moderna (Guerra, 2008).

2.1.4 Características generales de la *G. arbórea* Roxb

Según Le Tacon (1985) la especie *G. arbórea* Roxb se encuentra ubicada dentro de un grupo taxonómico bastante heterogéneo, desde el punto de vista de anatomía de la madera, por lo que es de vital importancia realizar estudios de variabilidad de elementos xilemáticos.

2.1.5 Manejo de vivero

Durante la producción de la planta en el vivero se realizan varias operaciones, que permiten al viverista la manipulación de algunas de las condiciones ambientales presentes en el mismo. El riego y fertilización influyen en la morfología y fisiología de la planta, que pueden ser modificadas mediante la realización de actividades como el repicado o el trasplante (Birchler *et al.*, 1998).

2.1.6 Índices morfológicos de plántulas

- **Relación parte aérea/parte radical**

Es el balance entre la parte transpirante y la parte absorbente, y se calcula habitualmente a partir de la relación de los pesos secos de cada una de las partes (Birchler *et al.*, 1998).

- **Cociente de esbeltez**

Es la relación entre la altura de la planta en (cm) y su diámetro en (mm), siendo un indicador de la densidad de cultivo. Es un parámetro importante en las plantas en contenedor, donde se pueden desarrollar plantas ahiladas (Birchler *et al.*, 1998).

- **Índice de calidad de Dickson**

Este índice integra a los dos anteriores y se calcula mediante la relación entre el peso seco total de la planta (g) y la suma de la esbeltez y la relación parte aérea/parte radical. Este índice se ha empleado con éxito para predecir el comportamiento en campo de varias especies de coníferas (Birchler *et al.*, 1998).

2.2 Fundamentación teórica

2.2.1 Micorrizas en árboles y en sistemas agroforestales

Estudios realizados por Vilar *et al.,* (2000) referentes a valores de colonización o infestación de micorrizas, indican que son componentes importantes para desarrollar modelos de agricultura sostenible y en especial en sistemas donde existe elevada fertilización de fósforo proveniente de fertilizantes solubles en suelos de bajo pH**.** Estos resultados concuerdan con los reportados por Molina *et al.,* (2005) quienes evaluaron el efecto de intercalar leguminosas en verano para abono verde, en la aparición de micorrizas en café y encontró incremento en la diversidad de especies de micorrizas, lo que a su vez estuvo relacionado con el incremento en la producción y la sostenibilidad del sistema de producción de café.

Es sabido que los HMA pueden presentar condiciones de mutualismo en sistema agroforestales. Así como lo indica Prieto *et al.,* (2012) en un estudio realizado en la identificación de HMA en cinco sistemas agroforestales con cacao, donde encontraron *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Glomus* y *Scutellospora* asociados, presentando mayor densidad de colonización por gramo de suelo el género *Glomus*, mientras que la menor cantidad de esporas presento el género *Gigaspora.* De igual manera se ha demostrado la eficiencia y potencial de los HMA sobre variables agronómicas en (*Brachiaria decumbens*) al inocular *Glomus ssp.,* o en combinación con *Scutellospora spp.* (Prieto *et al.,* 2011).

2.2.2 Efecto de la aplicación de micorrizas y de inóculos en el desarrollo de plántulas de *Eryhrina edulis* (Chachafruto).

Estudios realizados por Molina *et al.,* (2005) en donde evaluaron el efecto de la aplicación de micorrizas y de inóculos en el desarrollo de plántulas de *E. edulis,* en etapa de vivero en cuanto a: tipo de micorriza y sustrato utilizado, altura de planta, porcentaje de infección de raíces por la micorriza, peso seco de la parte aérea y peso radicular de la plántula.

2.2.3 Efectos de HMA y bacterias estimuladoras del crecimiento vegetal en el desarrollo y absorción de fosforo (P) por *Leucaena leucocephala*.

En estudios realizados por Ramírez *et al.,* (2001) determinaron efectos positivos generados por la combinación de *Glomus fistulosum, Pseudomonas fluorescentes* y fosfato, sobre el crecimiento y la absorción de P por *Leucaena leucocephala* sembrada en un suelo andisol. La inoculación con *G. fistulosum* incrementó el crecimiento de las plantas y la absorción de P. Los efectos fueron mayores cuando se aplicaron conjuntamente *Pseudomonas* y *G. fistulosum***.** La absorción de P estuvo significativamente correlacionada con la longitud de raíces, que a su vez fue significativamente afectada por la inoculación con *G. fistulosum.* En ausencia de *G. fistulosum* la aplicación de P no incrementó significativamente su absorción por las plantas. En contraste, cuando este hongo micorrízico fue inoculado, hubo aumento significativo en la cantidad de P absorbido.

De igual manera Velasco & Zambrano (2000) investigaron el mejoramiento del suelo por *Acacia mangium* en un sistema silvopastoril con *Brachiaria humidicola,* donde encontraron una relación directa entre el contenido de P edáfico y la población de hongos endomicorrízicos; el número de esporas bajo la copa fue mayor que fuera de ella, aunque no existen diferencias estadísticas. Cuando la humedad en el suelo bajo el efecto de los árboles fue mayor, se favoreció la población de hongos micorrizógenos. Durante los meses húmedos (junio y julio) la población de hongos endomicorrícicos en el sistema de alta densidad superó al de baja densidad en 79%.

Con respecto a la fertilización con P, Ramírez *et al.,* (2001) encontraron efecto positivo en la actividad de la micorriza y en el crecimiento de las plantas. Estos autores encontraron respuesta de la *L. leucocephala* a la inoculación micorrizal, aún con niveles altos de P en la solución del suelo. A pesar de los reportes del efecto positivo del P en la actividad de las micorrizas, algunos autores indican un efecto contradictorio.

2.2.4 Manejo de la micorrización controlada y factores que la afectan

La primera etapa en un programa de inoculación de HMA o ectomicorrizas para usar en agricultura o silvicultura depende de la inoculación más apropiada. En este sentido, la principal opción es el manejo de las poblaciones nativas (Molina *et al.*, 2005). Para la obtención de los HMA a utilizar, se han desarrollado diversas metodologías tendientes al entendimiento de la ecología y funcionamiento de esta asociación simbiótica, incluyendo el aislamiento de esporas a partir de suelo, la tinción diferencial de raíces para evidenciar la colonización y metodologías moleculares para la identificación y taxonomía (Corredor, 2003). La micorrización controlada en viveros es una operación hoy en día necesaria para obtener buenos resultados, y para que un programa sea eficaz se necesita utilizar hongos que sean competitivos tanto en vivero, como en el campo. Se ha demostrado la efectividad de la inoculación con micorrizas en numerosos cultivos y (Sempere & Santamaría, 2001; Barea & Honrubia, 2004).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Tipo de investigación

La presente investigación se la realizó a nivel de campo en plantaciones ubicadas dentro del cantón Valencia. Los estudios de HMA se efectuaron en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal e invernadero de la UTEQ.

Las características edafoclimáticas dominantes de la zona de estudio fueron: suelos arenosos con topografía originados a partir de cenizas volcánicas. La temperatura promedio anual es de 25,4ºC, precipitación promedio anual de 1609,3 mm, 82 % de humedad relativa y 923 horas luz año.

3.2 Método de investigación

Se empleó el método inductivo, que llegó a evaluar el estado de colonización micorrízica arbuscular en plantaciones de melina por parte de los elementos de la invetigación, cuantificando el porcentaje de colonización micorrízica arbuscular e identificando hongos formadores de micorriza arbuscular en plantaciones de melina, a través de procedimientos que permitieron descubrir los resultados.

Materiales

De campo

- Botas
- Fundas plásticas
- Machete
- Marcador permanente
- Pala

De laboratorio

- Algodón
- Asas de inoculación
- Cajas petri
- Cubre objetos
- Embudo plástico
- Gasa
- Hojas de bisturí

- Jeringuillas
- Lápiz demográfico
- Mangos de bisturí
- Mascarilla
- Pipetas
- Piscetas
- Porta objetos
- Probetas graduadas
- Resmas de papel bond A4
- Soporte universal
- Tamices
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación

Reactivos

- Ácido clorhídrico
- Ácido láctico
- Azul de tripano
- Cloruro de potasio
- Glicerol
- Hidróxido de potasio
- Peróxido de hidrógeno
- Sacarosa

Equipos

- Agitador magnético
- Balanza de precisión
- Computadora
- Estéreo microscopio
- Estufa
- Flash memory
- Impresora
- Microscopio
- pH-metro

3.3 Población y muestra

3.3.1 Población

El estudio investigativo se realizó en la estación seca, y se utilizó como método y procedimiento para la recopilación de información la estadística descriptiva. Para la recopilación de información se consideró una población de 10 y 8 has de las plantaciones *G. arbórea* de 1 y 3 años de edad en la zona de influencia de la UTEQ. Desde cada plantación se extrajeron cinco muestras de suelo con 50 y 60 g de raíces a una profundidad considerada entre 0 a 20 cm bajo la proyección de la copa de los árboles. Cada muestra de suelo tuvo un peso aproximado de 1 kg, siendo las muestras recolectadas en fundas plásticas, debidamente identificadas y fueron traslada al laboratorio bajo refrigeración.

3.3.2 Muestra

Para la determinación de HMA en cada muestra se pesó 100 gramos de suelo húmedo (gsh^{-1}) a partir de la cual se efectuaron los análisis respectivos y pudo cumplir con los objetivos de la investigación.

3.4 Fuentes de recopilación de la información

El cuadro (1, 2 y 3), muestra la recolección de información de las variables edafoclimaticas, densidad de colonización micorrizica y población de HMA aisladas por 100 gramos de suelo húmedo (gsh^{-1}) en plantaciones de *G. arbórea* Roxb de 1 y 3 años de edad del cantón Valencia. Las muestras fueron evaluadas en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal de la UTEQ, localizado en el Campus Ing. Manuel Haz Alvares, ubicado en el Km 1,5 de la vía Quevedo – Quito.

Cuadro 1. Variables edafoclimáticas en dos plantaciones de *G. arbórea* Roxb de 1 y 3 años de edad, ubicados en la zona de influencia de la UTEQ, Trópico Húmedo Ecuatoriano.

VARIABLES	**1 año**	**3 años**
UBICACIÓN	Cantón Valencia; Parroquia El Vergel; Rcto. La Libertad	Cantón Valencia; Parroquia El Vergel; Rcto. La Libertad
PROPIETARIO	Sr. Teófilo Guerrero	Sr. Teófilo Guerrero
ÁREA DE LA PLANTACIÓN	10 Has.	8 Has.
PRECIPITACIÓN MEDIA ANUAL	1610,5 mm	1610,5 mm
TEMPERATURA MEDIA ANUAL	25,5 ºC	25,5 ºC
HUMEDAD RELATIVA	82%	82%
HELIOFANIA	923,5	923,5
TIPO DE SUELO	FRANCO	FRANCO
TOPOGRAFÍA	IRREGULAR	IRREGULAR
DRENAJE	BUENO	BUENO

Cuadro 2. Tabla para evaluar la densidad de colonización micorrízicas en 150 raicillas en plantaciones de *G. arbórea* Roxb de 1 y 3 años de edad.

Número de raíces evaluadas	**Densidad visual**
1	
2	
3	
150	

Cuadro 3. Tabla para evaluar la población de esporas de HMA aisladas por 100 gramos de suelo (gsh^{-1}) en plantaciones de *G. arbórea* Roxb, de 1 y 3 años de edad utilizando tamices con diferentes dimensiones.

CANTIDAD ESPORAS	EDAD						
	1 AÑO			3 AÑOS			
GENEROS	425 µm	90 µm	25 µm	425 µm	90 µm	25 µm	Total
Total							

3.5 Instrumento de la investigación

3.5.1 Tinción de raíces de *G. arbórea* Roxb

Para el efecto se empleó el método de (Phillips & Hayman, 1970; Giovanetti & Mosse, 1980) que consiste en:

- Lavar las raíces con abundante agua corriente.
- Cubrir las raíces con solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10% y colocarlas en baño de maría (90°C) durante 10 a 15 minutos.
- Eliminar el KOH, 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 (H_2O_2) al 3% durante 10 a 20 minutos será necesario. Las raíces clareadas y blanqueadas se lavarán con abundante agua.
- Lavar las raíces por inmersión durante 5 a 10 minutos en una solución fresca de KOH al 10% y H_2O_2 al 10%, mezclado en proporción 1:1 (V/V).
- 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 10 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 un portaobjetos, 10 raíces de más o menos 1cm de largo cada una y observar al microscopio.

Por cada muestra de raíces de *G. arbórea* Roxb se realizaron montajes al microscopio. En una lámina portaobjetos se colocaran 10 segmentos de raíces adicionando gotas de glicerol (50%). Las observaciones se hicieron por triplicado (3 repeticiones) en un microscopio a 40x.

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

3.5.2 Aislamiento e identificación de HMA

Se empleó el método descrito por (Gerderman & Nicholson, 1963) que consiste en el tamizado y decantación en húmedo, con modificaciones. A continuación se describe el proceso.

Se pesaron 100 g de suelo y se colocaron en un vaso de precipitación, al que se añadieron 1000 mL^{-1} de agua y agitaron durante 3 a 5 minutos. Con la agitación se produjo la disgregación de los terrones.

- La suspensión dejó reposar durante unos segundos y el sobrenadante 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 por lo menos tres veces.

- El material que quedó atrapado en los diferentes tamices se recogió en placas de Petri cuadriculadas, y observaron a través de una lupa, para cuantificar el número de esporas por gramo de suelo seco.

La identificación de los HMA se efectuó a nivel de morfoespecies, la observación de rasgos distintivos en las estructuras fúngicas se llevaron a cabo en un microscopio óptico, y posteriormente se compararon con las claves taxonómicas disponibles (Brundrett *et al.,* 1996; Powell & Bagyaraj, 2000).

3.5.3 Medición de pH del suelo

A los suelos procedentes de cada plantación estudiada se le midió el pH empleando la metodología propuesta por Steubing *et al.,* (2001) que mide el pH en agua (H_2O) y cloruro de potasio (KCl) al 0,1 N. El procedimiento consistió en: depositar en un vaso de precipitación 10 g de suelo seco y tamizado con 25 mL^{-1} de agua destilada. Paralelamente, en otro vaso de precipitación se colocó igual cantidad de suelo con 25 ml^{-1} de KCl se agitó las suspensiones durante 10 minutos. La lectura del pH se registró en el sobrenadante de las suspensiones con un pH-metro marca OAKTON modelo 510 series.

3.6 Procesamiento y análisis

Una vez analizadas las variables estudiadas, se identificaron y seleccionaron las

morfoespecies o consorcios de morfoespecies de HMA que se haya generado a nivel de laboratorio con el propósito de conservarlos como inoculantes.

3.6.1 Propuesta para incluir HMA como insumo microbiológico en plántulas de *G. arbórea* a nivel de vivero

La propuesta consistirá en conocer los costos de producción estimados al incluir HMA en 6500 plántulas de *G. arbórea* Roxb, los mismos que serán inoculados al inicio del establecimiento en el vivero, y; que conllevara después de su inoculación el manejo adecuado de las plántulas por un período de mantenimiento de 25 días, tiempo estimado para la venta.

3.6.2 Ubicación del proyecto

Se propone la implementación de este proyecto en el Vivero Forestal, Quinta Ecológica la "FASE", localizada en el Km 8 de la vía Quevedo-Mocahe, provincia de los Ríos, cuya ubicación geográfica es de 1º6'18" de latitud Sur y 79º29'24" de longitud Oeste, a una altura de 120 msnm.

3.6.3 Recursos del proyecto

Para la implementación del proyecto, se considerará los siguientes recursos materiales y humanos:

- 50 Pipetas Pasteur
- 4 Picetas de 500 ml
- 10 Placas de Petri plásticas de 9 cm de diámetro
- 1Rollo de sarán
- 1 Rollo de plástico negro
- 20 Frascos plásticos herméticos de 100 ml
- 5000 Tubos Ependor de 1,5 ml

- Responsable del aislamiento e inoculación de las esporas HMA
- Responsable para el manejo cultural del vivero (Jornales)
- 15 gr de Hidróxido de potasio
- ¼ Rollo de parafilm
- 454 kg de Tierra de huerto
- 7 kg de Semillas de melina
- 5000 Fundas de polietileno de 4X6 cm
- 3 Litros de Formol

3.6.4 Reproducción de inóculos seleccionados

Para realizar esta actividad se utilizará contenedores plásticos de 43 cm x 37 cm x 26 cm (aproximadamente 41 litros/contenedor) que se llenaran con: dos partes de suelo orgánico, 1 parte de suelo de la plantación forestal (melina) de 1 año de edad y arena estéril (1/8). Dicho sustrato se esterilizará con Basamid a la dosis recomendada (60 g/m2). Después de aplicar el fungicida, el suelo se cubrirá herméticamente con un plástico durante una semana, y posteriormente se aireará durante 7 días más. Luego se procederá a inocular el suelo con los HMA (*Glomus y Gigaspora*) generados de las plantaciones de melina de 1 y 3 años de edad previamente seleccionados utilizando las esporas como inóculo por contenedor y *Zea maíz* (maíz) como planta hospedera.

3.6.4.1 Producción de plántulas a nivel de vivero

Para la producción de plántulas se consideraran el siguiente procedimiento:

Para el aprovisionamiento de la semilla y con el fin de tener el mayor porcentaje de germinación, se realizara un tratamiento pregerminativo, que consistirá en dejar la semilla por 4 días en remojo y 4 días almacenados en sacos.

Luego de que la semilla se le realice el tratamiento pregerminativo, se procederá a germinar la semilla de melina, para lo cual se utilizaran 7 kg de semillas, 90 kg de sustrato y 500 cc de formol, que será aspergeado con una bomba de mochila sobre la estructura de la cama, hecha de madera o caña, y con un plástico como base con las siguientes dimensiones: largo, ancho y espesor (1m x 5m x 0,15m).

Posteriormente después de que se haya depositado las semillas en la cama, se taparan por 4 días consecutivos con un plástico negro, y se realizara el regio con agua cuando fuese necesario. Pasado los 4 días se retirará el plástico, permitiendo así que no obstaculice la emergencia y desarrollo de las plántulas.

Pasado los 8 días, se procederá a seleccionar y repicar 6500 plántulas de melina de las plántulas emergidas de la cama germinadora. Seguido a esto, el repique se hará en función de las plántulas que hayan presentado las mejores variables dasométricas, y que serán puestas en sus respectivas fundas de 4x6 cm con sustrato esterilizado.

Luego de que se hayan seleccionado las 6500 plántulas, y poder procurar la supervivencia, crecimiento y desarrollo de las mismas, serán ubicadas en un invernadero que presentare las condiciones apropiadas para la inoculación de las plántulas, y que perdurarán en el invernadero por el tiempo de 25 días, tiempo estimado para la venta.

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 Porcentaje de colonización micorrízica en raíces de *G. arbórea* Roxb.

La Figura 1, muestran los valores de densidad de colonización visual en raíces obtenidas en plantaciones de melina de 1 y 3 años de edad, encontrando el mayor porcentaje de colonización micorrízica obtenida en raíces de plantaciones de 1 año de edad con 1,9 %, seguido por la de 3 años de edad con 1,7 % respectivamente.

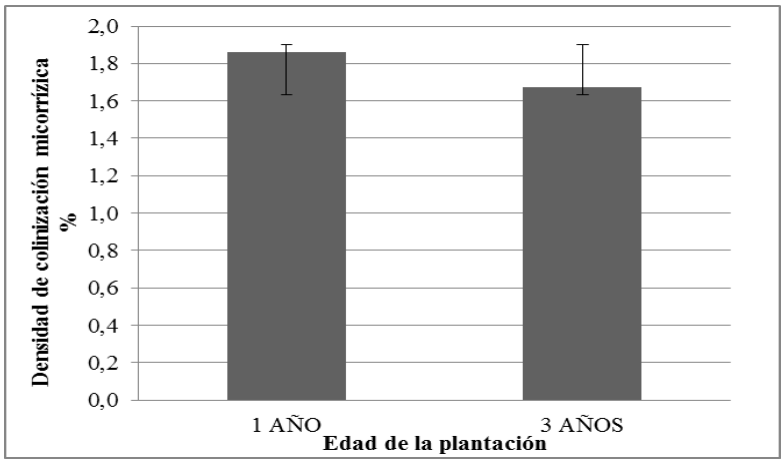


Figura 1. Porcentaje de densidad de colonización micorrízica en raíces de *G. arbórea* Rox, de las plantaciones forestales. Los valores representan la media de 150 raicillas evaluadas, con barras de desviación estándar y error estándar.

Los porcentajes de colonización encontradas en raíces de plantaciones de *G. arbórea* Roxb, hace suponer que tienen relación semejante con las condiciones ecogeográficas y períodos estacionales del trópico, al ser indicadores de la densidad de colonización micorrízica.

La asociación micorrízica es abundante en las regiones tropicales, en donde se establece de forma natural en árboles y arbustos, plantas herbáceas que constituyen una parte fundamental de su estructura y funcionamiento (Pérez-Moreno & Read, 2004). Aunque los HMA se encuentran presentes en todos los ecosistemas tropicales, su distribución no es homogénea, existiendo variabilidad en las épocas estacionales (Vargas *et al.*, 2010). Además la actividad microbiana es afectada por variables ecológicas primarias, tales como la densidad y composición de la flora, etapa sucesional y variables secundarias, como la estación del año. Seguido a esto, existe reporte sobre las actividades biológicas en etapas sucesionales, así como lo indica (Alvear *et al.*, 2007) al evaluar bajo dos

etapas sucesionales y estacionales de un bosque templado del centro-sur de Chile la relación la materia orgánica, ciclado de nutrientes y la humedad con la actividad microbiana; registrando en otoño los valores más alto para todas las actividades evaluadas; mientras que en primavera el porcentaje de agregados estables fue mayor en ambas etapas sucesionales. Las condiciones presentadas

La colonización y estructura de la comunidad de HMA pudieran estar relacionadas por las perturbaciones, fragmentación, cambio y uso de suelo. Por tal razón es importante entender las interacciones ecológicas y factores abióticos que contribuyen a mejorar el establecimiento de algunas especies, y que pudieran verse influenciado por el tiempo, así como lo indica (Lara *et al.,* 2014) al encontrar en raíces de *Alsophila firma*, micorrización de 19 especies de HMA: *Gigaspora* (7), *Acaulospora* (4), *Glomus* (4), *Funneliformis* (2), *Sclerocystis* (1) y *Scutellospora* (1). Siendo los niveles de colonización micorrízica total de raíz mayores en el sitio conservado.

En términos generales, se considera que las plantas leñosas suelen ser más dependientes de la simbiosis micorrízica que las herbáceas (Flores & Cuenca, 2004) debido a la carencia de pelos radicales para la adquisición de nutrientes, las plantas con raíces no ramificadas presentan una mayor dependencia de las asociaciones micorrízicas que aquellas con sistemas radicales ramificados (Rodríguez *et al.,* 2011). Sin embargo, algunos estudios indican que las especies tropicales con raíces fibrosas son más susceptibles a la colonización micorrízica y presentan mayor respuesta en el crecimiento ante el efecto de la simbiosis (Zangaro et al., 2005).

4.1.1 PH en el suelo de las diferentes edades de las plantaciones de *G. arbórea* Roxb.

El Cuadro 4, muestra los valores de pH de suelo obtenidos en Agua (H_2O) y Cloruro de potasio (KCl). El pH obtenido en agua fue de 6,23 y 6,45, mientras que el encontrado al emplear KCl, osciló entre 5,22 y 5,25 para plantaciones de melina de 1 y 3 años respectivamente. Esto quiere decir que los valores de pH

obtenidos en el suelo donde crecen las plantaciones de melina son ligeramente ácidos y moderadamente ácidos.

Cuadro 4. PH en el suelo de dos edades de plantaciones de *G. arbórea* Roxb.

MEDICIÓN DEL pH	**1 AÑO DE EDAD**	**3 AÑOS DE EDAD**
pH DEL SUELO EN AGUA	6,23	6,45
pH DEL SUELO EN CLORURO DE POTASIO	5,22	5,25

La colonización micorrízica de *G. arbórea* Roxb de 1 y 3 años de edad, presentaron un pH moderadamente y ligeramente ácidos, lo que hace suponer que las variables edafoclimáticas del lugar independientemente de la edad se ven favorecidas por la presencia de HMA. Sin embargo diversos factores bióticos y abióticos afectan la colonización micorrizica en los ecosistemas tropicales. Entre ellos se encuentra el pH (Alvarado *et al*., 2004), el estrés hídrico (Gavito *et al*., 2008), la disponibilidad de luz (Shukla *et al*., 2008) y la habilidad para obtener carbono producido por las plantas. Alvarado *et al.,* (2004) estudiaron el efecto del pH del suelo en la micorrización por HMA en plantas de teca (*Tectona grandis* L.) en Costa Rica y señalaron que en suelos con pH <5,5 existieron bajas colonizaciones micorríziсas, de hasta 8%. Sin embargo, debido a que usualmente los suelos ácidos poseen asociada toxicidad por Al y Mn y deficiencias de P, Ca, Mg y K (Marschner, 1991), es difícil explicar la baja colonización micorrízica exclusivamente en función de la disminución del pH. Más bien las bajas colonizaciones en suelos ácidos pueden deberse a una combinación de acidez y de las toxicidades y deficiencias de los nutrimentos mencionados.

En contraposición a lo reportado por Alvarado *et al*. (2004), otros autores han encontrado que existen HMA adaptados a pH ácidos (<5), los cuales resultan fundamentales para el abastecimiento nutrimental a las plantas aún en estas condiciones tan adversas (Clark *et al*., 1999). Es así claro que la asociación micorrízica arbuscular es altamente compleja, especialmente en las regiones

tropicales donde paradójicamente, los estudios ecofisiológicos de dicha simbiosis han sido escasos.

4.1.2 Población de HMA en plantaciones de *G. arbórea* Roxb de 1 y 3 años de edad

La plantación que presentó la mayor concentración de esporas de HMA por cada 100 gramos de suelo húmedo (gsh^{-1}), fue la plantación de 1 año de edad, con un total de 70 esporas, seguido de la plantación de 3 años de edad con 62 esporas, respectivamente. Independientemente de la edad, la mayor cantidad de esporas de HMA fueron atrapados por el tamiz de 25 µm. La mayor parte de esporas de HMA pertenecieron al género *Glomus*, seguido de *Gigaspora* (Cuadro 5; Figura 2).

Cuadro 5. Géneros y número de esporas de HMA obtenidos por cada 100 gramos de suelo húmedo (gsh-1), en tamices con apertura de mallas de 425, 90 y 25 µm, en dos plantaciones forestales de *G. arbórea* Roxb

CANTIDAD ESPORAS	EDAD							
	1 AÑO				3 AÑOS			
GENEROS	425 µm	90 µm	25 µm	Total	425 µm	90 µm	25 µm	Total
Glomus	12	15	18	45	9	10	14	33
Gigaspora	7	8	10	25	8	9	12	29
Total	19	23	28	70	17	19	26	62

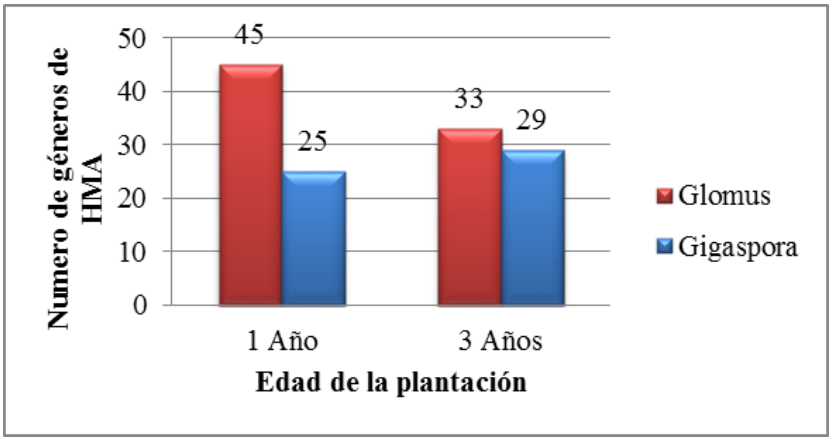


Figura 2. Géneros y números de esporas de HMA obtenidos por cada 100 gramos de suelo húmedo (gsh^{-1}), en plantaciones de *G. arbórea* Roxb.

La población de HMA de la plantación *G. arbórea* Roxb, presentaron géneros semejantes (*Glomus* y *Gigaspora*), independientemente de la edad, pero con variación en cantidades de HMA encontrados por cada 100 gramos de suelo húmedo (gsh^{-1}). Estos resultados hacen suponer que los géneros de HMA son comunes y abundantes en plantaciones forestales y sistemas agroforestales como el género *Glomus* de las regiones tropicales. Así como lo indica Prieto *et al.*, (2012) en un estudio realizado sobre identificación de HMA en cinco sistemas agroforestales con cacao, donde encontraron *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Glomus* y *Scutellospora* asociados, presentando mayor densidad de colonización por gramo de suelo húmedo (gsh^{-1}) el género *Glomus*, mientras que la menor cantidad de esporas presento el género *Gigaspora.* De igual manera se ha demostrado la eficiencia y potencial de los HMA sobre variables agronómicas en (*Brachiaria decumbens*) al inocular *Glomus ssp.*, o en combinación con *Scutellospora spp.* (Prieto *et al.*, 2011)

La población de HMA de los géneros G*lomus y Gigaspora* en el ThE hace suponer que tiene relación con los ecosistemas tropicales, así como lo indica (Méndes *et al.*, 2103) al identificar los géneros: *Glomus, Funneliformis, Rhizophagus, Acaulospora,* y *Pacispora* para selva alta perennifolia SAP; y *Claroideoglomus, Funneliformis, Glomus, Rhizophagus, Sclerocystis, Paraglomus, Entrophospora, Scutellospora* y *Pacispora Glomus*, para selva alta superennifolia SMS.

Por otra parte, los sistemas agroforestales o en áreas naturales de Asia, donde se han introducido especies maderables como la caoba, han identificado HMA de los géneros *Glomus y Gigaspora* principalmente, y en menor proporción a especies de los géneros *Acaulospora*, *Entrophospora*, y *Scutellospora* en el suelo rizosférico. Además, se ha reportado que 30-55% de las raíces finas poseen colonización por HMA (Dhar & Mridha, 2006). Sin embargo, en la mayoría de los casos se desconoce la identidad precisa de los HMA asociados en condiciones naturales y el efecto de la micorrización en el crecimiento y la supervivencia de estas especies.

La dependencia micorrízica también puede estar relacionada al estado sucesional de las plantas (Zangaro *et al*., 2005) y el contenido nutrimental de las semillas. Se ha encontrado que especies clímax con semillas que contienen altas reservas de nutrientes y minerales, son capaces de mantener el crecimiento inicial de las plántulas, e inclusive inhibir la colonización micorrízica en las primeras semanas de desarrollo (Zangaro *et al*., 2000; Silva *et al*., 2010). En contraste, en los trópicos las especies pioneras con semillas pequeñas son más dependientes a las asociaciones micorrízicas en relación a su crecimiento y a la supervivencia inicial (Kiers *et al*., 2000; Flores & Cuenca, 2004; Zangaro *et al*., 2005).

4.2 Costos de producción para incluir HMA como insumo microbiológico en plántula de *G. arbórea* Roxb a nivel de vivero

Con el propósito de aprovechar el potencial de los HMA en plántulas de *G arbórea* Roxb a nivl de vivero, se presenta a continuación un análisis de costo beneficio para la zona de Valencia.

Detalle de los costos de producción estimados y suministros al incluir HMA en 6500 plántulas de *G. arbórea* Roxb a los 25 días de mantenimiento en el vivero; donde muestra valores superiores de 440,50 dólares el suministro de insumos, seguido de 210,00 dólares el suministro de mano de obra y 172,00 dólares el suministro de herramientas. Estos valores son menores a los ingresos con 975,00 dólares a partir de las 6500 plántulas que serán vendidas a un costo de 0,15 centavos de dólar. La diferencia de los costos de producción proporcionó un ingreso bruto de 152,49 dólares, y una Relación B/C de 1,19 dólares, es decir que por cada dólar invertido se recupera 0,1 centavos de dólar (Cuadro 6; Figura 4).

Cuadro 6. Costos de producción al incluir HMA en 6500 plántulas de *G. arbórea* Roxb a los 25 días de mantenimiento en el vivero.

Rubro	Unidad de medida	Cantidad	Precio unitario	Total
Costos				
Insumos				
Caja de pipetas Pasteur	cajas	10	0,60	6,00
Formol	litro	2	6,00	12,00
Picetas de 500 mL	ml	4	10,00	40,00
Placas de Petri plásticas de 9 cm de diámetro	placas	10	0,75	7,50
Placas de Petri plásticas de 4 cm de diámetro	placas	10	0,75	7,50
Parafilm	rollo	¼	15,00	15,00
Sustrato (tierra de huerto)	kg	455	0,28	127,40
Semillas de melina	kg	6	8,00	48,00
Bolsa de polietileno de 4x6 cm	fundas	5050	0,002	10,10
Sarán	rollo	1	4,56	4,56
Frascos plásticos herméticos de 100 mL	frascos	20	0,60	12,00
Tubos ependor de 1,5 ml	tubos	500	0,06	30,00
Hidróxido de potasio	gr	15	0,03	0,45
Fuente de inoculo	esporas	150000	0,0008	120,00
Costos de insumos				440,51
Herramientas				
Carreta de mano		1	60,00	60,00
Azadones		2	6,00	12,00
Palas		2	5,00	10,00
Bonba de mochila		1	60,00	60,00
Regadora		2	15,00	30,00
Costos de herramientas				172,00
Mano de obra				
Aplicación (biofertilizante, riego)	jornales	5	15,00	75,00
Llenado de fundas	jornales	4	15,00	60,00
Control de malezas	jornales	5	15,00	75,00
Costos de mano de obra				210,00
Total costos				**822,51**
Ingresos				
Plántulas inoculadas		6500	0,15	975,00
Ingreso bruto				**152,49**
Relación B/C				**1,185**
Rentabilidad (%)				**18,54**

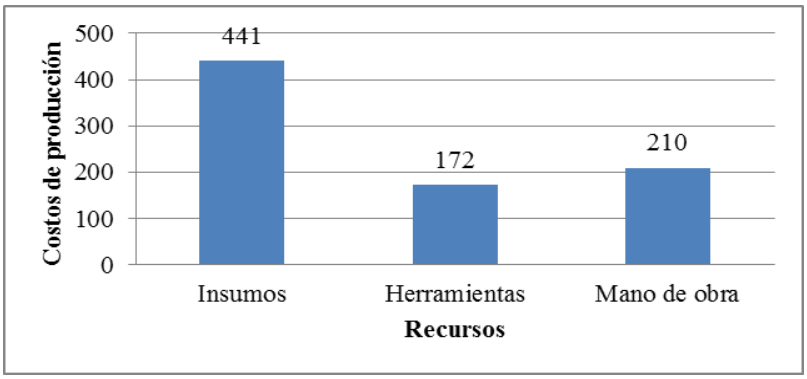


Figura 3. Costos de producción y recursos económicos estimados al incluir HMA en 6500 plántulas de *G.arbórea* Roxb a los 25 días de mantenimiento en el vivero.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- La edad de una plantación es un factor fundamental para considerar los porcentajes de colonización micorrízica en raíces de melina (*G. arbórea* Roxb), ya que las más jóvenes por ser menos lignificadas representan densidades de micorrización favorables, como lo demuestran los resultados encontrados en esta investigación: 1,9% en plantaciones de 1 año de edad y 1,7% en plantaciones de 3 años de edad.

- La diversidad de especies o géneros de HMA son comunes en las zonas agroecológicas del ThE. Pero por otro lado la cantidad de estos hongos se ven limitadas por las condiciones bióticas o abióticas de la zona y edad de la plantación, que parecen estar relacionados con el incremento en la producción de esporas en el suelo, así como lo demuestran los resultados de investigación al encontrar géneros de HMA (*Glomus y* Gigaspora).

- La determinación de los costos de producción estimados al incluir HMA en plántulas de melina a los 25 días de mantenimiento en el vivero, presentó una Relación B/C de 1,19 dólares, es decir que por cada dólar invertido se recupera 0,19 centavos de dólar, y una rentabilidad de 18,54%.

5.2 Recomendaciones

- Realizar el muestreo de raicillas de la especie forestal con calicatas, ya que permitirá encontrar y obtener mayor cantidad de raicillas con características morfológicas idóneas.

- Seguir con estos estudios investigativos, para conocer la diversidad y abundancia de HMA posibles, que conlleve un mayor número de muestra y edad de la especie forestal en las diferentes zonas agroecológicas del ThE.

- Establecer convenios interinstitucionales y colectivos con el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal de la Universidad Técnica Estatal Quevedo (UTEQ), para que los viveristas de la zona de influencia del cantón Quevedo, puedan mejorar la calidad de las plántulas incluyendo HMA a nivel de vivero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarado, A., Chavarría, M., Guerrero, R., Boniche, J., & Navarro, J. (2004). Características edáficas y presencia de micorrizas en plantaciones de Teca *(Tectona grandis* L. f.). *Agron. Costrric., 28*, 89-100.

Alvear, M., Urra, C., Huaiquilao, R., Astorga, M., & Reyes, F. (2007). Actividades biológicas y estabilidad de agregados en un suelo del bosque templado chileno bajo dos etapas sucecionales y cambios estacionales. *R.C.Suelo Nutr. Veg., 7*(3), 38-50.

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

Barea, J., & Honrubia, M. (2004). La micorrización dirigida de la planta forestal. In: Vallejo, R. & al. (ed.), Avances en el estudio de la gestión del monte mediterráneo. CEAM. 84-921259-3-4. 215-260.

Birchler, T., Aroyo, A., & Pardos, M. (1998). La planta ideal: revision del concepto, parámetros definitorios e implementación práctica. *Invest. Agr. : Sist. Recur. For, 1*(1 y 2).

Boisson Dernier, A., Chabaud, M., García, F., Bécard, G., Rosenberg, C., & Barker, D. (2001). Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of Medicago truncatula for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interact*, 695-700.

Brundrett, M. M. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist, 154*(1), 275-304.

Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., & Malajczuck, N. (1996). Working whit mycorrhizas in forestry and agriculture. Camberra, Australia. 374.

Clark, R., Zobel, R., & Zeto, S. (1999). Effects of mycorrhizal fungus isolates on mineral acquisition by Panicum virgatum in acidic soil. *Mycorrhiza, 9*, 167-176.

Corredor, G. (2003). Micorrizas arbusculares: Aplicación para el manejo sostenible de los agroecosistemas. Programa Nacional De Recursos Biofísicos, Corpoica, Bogotá. 12-17.

Dhar, P., & Mridha, M. (2006). Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in different trees of Madhupur forest, Bangladesh. *J. FOR. RES. 17: 201-205, 17*, 201-205.

Donoso, E., Gustavo, L., & Rojas, N. (2008). Efecto de Trichoderma harzianum y compost sobre el crecimiento de plántulas de Pinus radiata en vivero. *Bosque, 29*(1), 52-57.

Ezawa, T., Yamamoto, K., & Yoshida, Y. (2000). Species composition and spore density of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under different conditions of P-fertilityas revealed by soybean trap culture. *Soil Sci. Plant Nutr, 46*(1), 291-297.

Flores, C., & Cuenca, G. (2004). Crecimiento y dependencia micorrízica de la especie pionera y polenectarífera *Oyedaea verbesinoides* (Tara amarilla), Asteraceae. *Interciencia, 29*, 632-637.

Gavito, M., Pérez-Castillo, D., González-Monterrubio, C., Vieyra-Hernández, T., & Martínez-Trujillo, M. (2008). High compatibility between arbuscular

mycorrhizal fungal communities and seedlings of different land use types in a tropical dry ecosystem. *Mycorrhiza, 19*, 47-60.

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*(1), 235-244.

Gianinazzi, S., & Schuepph, J. (1994). Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. Birkh¨auser Verlag, Basel. 226.

Giovanetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytologist, 84*(1), 489-500.

Guerra, B. (2008). Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología en Marcha, 21*(1), 191-201.

Hayman, D. (1987). Mycorrhizas in field cropsystems. In: Ecophysiology of VA micorrhizal Plants. (G. R, ed). 171-192.

Hernández, W., & Salas, E. (2009). La inoculación con glomus fasciculatum en el crecimiento de cuatro especies forestales en vivero y campo. *Agronomía Costarricense, 33*(1), 17-30.

Honrubia, M. (2009). Las micorrizas una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. Anales del Jardín Botánico de Madrid. *66*(1), 133-144.

Honrubia, M., Morte, A., & Díaz, G. (2002). Dinamismo del componente fúngico micorrícico y su incidencia en la regeneración del bosque mediterráneo. In: Charco, J. (coord.). La regeneración natural del bosque mediterráneo en la península Ibérica: evaluación de problemas y propuesta de soluciones. ARBA-MMA *(eds), ISBN 84-922095-5-0*, 87-113.

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

Kiers, E., Lovelock, C., & Herre, E. (2000). Differential effects of tropical arbuscular mycorrhizal fungal inocula on root colonization and tree seedling growth: implications for tropical forest diversity. *Ecol. Lett, 3*, 106-113.

Lara-Pérez, L., Noa-Carrazana, J., Landa-López, A., Hernández-González, S., Oros-Ortega, I., & Andrade-Torres, A. (2014). Colonización y estructura de la comunidad de hongos micorrízicos arbusculares en Alsophila firma (Cyatheaceae) en bosque mesófilo de montaña en Veracruz, México. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744), 62*(4), 1609-1623.

Le Tacon, F. (1985). Le Tacon, F.Las micorrizas: una cooperación entre plantas y Hongos. *Mundo Científico, 49*(5), 776-784.

Marschner, H. (1991). Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant Soil, 134*, 1-120.

Mendes-Cortes, H., Marmolejo-Monsiváis, J., Cantú-Ayala, C., Olalde-Portugal, V., Estrada-Castillon, E., & Posadas-Leal, C. (2013). Respuesta de Cedrela Odorata L. a diversos inoculantes micorrízicos procedentes de dos ecosistemas tropicales. *Madera y Bosques, 19*(3), 23-34.

Molina, M., Machecha, L., & Medina, M. (2005). Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. *Rev Col Cienc Pec, 18*(2).

Molloch, D., Pirozynski, P., & Haven, P. (1980). Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbiosis in vascular plants (A review). Proc. Natl. Acad. Sci. 77(44): 2113-2118. *Proc. Natl. Acad. Sci., 77*(44), 2113-2118.

Nicolson, T. (1975). A flotation method for collecting spores of a phytomycetous mycorrhizal parasite from soil. *Phytopathology, 47*(1), 751-752.

Osorio, N. (2012). Uso de hongos formadores de micorriza como alternativa biotecnológica para promover la nutrición y el crecimiento de plántulas. *Manejo Integral del Suelo y Nutrición Vegetal, 1*(2).

Pérez-Moreno, J., & Read, D. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia, 29*, 239-247.

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*(1), 158-161.

Plenchette, C., Fortin, J., & Furlan, V. (1983). Growth response of several plants species to mycorrhizal in a soil of moderate Pfertility. *Plant Soil, 70*(1), 1999-209.

Powell, C., & Bagyaraj, D. (2000). MA Mycorrhiza. Florida. Printed in the United States. 232.

Prieto Benavides, O., Belesaca Pinargote, C., Mora Silva, C., Vallejo Zambrano, E., Gutierrez Lara, V., & Pinargote Mendoza, E. (2011). Inoculación de *Brachiaria decumbens* con hongos formadores de micorriza arbuscular nativos del Trópico Húmedo Ecuatoriano. *Ciencia y Tecnología, 4*(2), 9-18.

Prieto Benavides, O., Belezaca Pinargote, C., Mora Silva, F., Garcés Fiallos, R., Sabando Ávila, A., & Cedeño Loja, E. (2012). Identificación de hongos micorrízicos arbusculares en sistemas agroforestales con cacao en el

Trópico Húmedo Ecuatoriano. *Agronomía Mesoamericana, 23*(2), 233-239.

Ramírez, A., Otálvaro, D., & Álvarez, C. (2001). Efectos de microorganismos rizosféricos sobre la absorción de fosfato y el crecimiento de Leucaena en un andisol. *Revista Suelos Ecuatoriales, 31*(2).

Reybampac. (2012). *Plan de manejo forestal http://www.reysahiwal.com/Resumen%20Plan%20de%20Manejo%20Forestal.%20Reybanpac%20C.A..pdf*. Recuperado el 13 de 8 de 2015, de http://www.reysahiwal.com/Resumen%20Plan%20de%20Manejo%20Forestal.%20Reybanpac%20C.A..pdf.

Rodríguez, V., Soto, A., Pérez, J., & Negreros, P. (2011). Los hongos micorrízicos arbusculares y su implicación en la producción y manejo de especies neotropicales forestales, con enfasis en meliáceas. *Interciencia, 36*(8), 564-569.

Sempere, F., & Santamarina, P. (2001). La Aplicación de las Micorrizas. *Revista Agrícola Vergel, 232*, 198-201.

Shukla, A., Kumar, A., Jha, A., Chatuveredi, O., Prasad, R., & Gupta, A. (s.f.). Effects of shade on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of crops and tree seedlings in Central India. *Agrofor. Syst, 76*, 95-109.

Silva, D., Uhlman, A., Silva, V., & Sturmer, S. (2010). How mycorrhizal associations and plant density influence intra- and inter-specific competition in two tropical tree species: Cabralea canjerana (Vell.) Mart. and Lafoensia pacari A.St.-Hil. *Plant Soil, 330*, 185-193.

Smith, S., & Read, D. (2008). Mycorrhizal Symbiosis. *3er Ed. Academic Press. ISBN 9780123705266*, 800.

Steubing, L., Godoy, R., & Alberdi, M. (2001). Métodos de ecología vegetal. Santiago de Chile, CH. Editorial universitaria. 34.

Vargas, R., Hasselquist, N., Allen, E., & Allen, M. (2010). Effects of a hurricane disturbance on aboveground forest structure, arbuscular mycorrhizae and belowground carbon in a restored tropical forest. *Ecosystems, 13*, 118-128.

Velasco, A., & Zambrano, J. (2000). Mejoramiento del Suelo por Acacia Mangium en un sistema silvopastoril con Brachiaria Humidicola. CATIE, Costa Rica. 15.

Vilar, A., Siquiera, J., Layola, J., & Rocha, A. (2000). Micorrizas arbusculares. Boletín Pesquisa, EMBRAPA, Brasil, 2000, Nro. 17.

Walker, C. (1992). Walker, C. 1992. Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales) - a possible way forward. *Agronomie, 12*, 887-897.

Zangaro, W., Bononi, V., & Trufen, S. (2000). Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. *J. Trop. Ecol., 16*, 603-622.

Zangaro, W., Nishidate, F., Camargo, F., Romagnoli, G., & Vandressen, J. (2005). Relationships among arbuscular mycorrhizae, root morphology and seedling growth of tropical native woody species in southern Brazil. *J. Trop. Ecol., 21*, 529-540.

ANEXOS

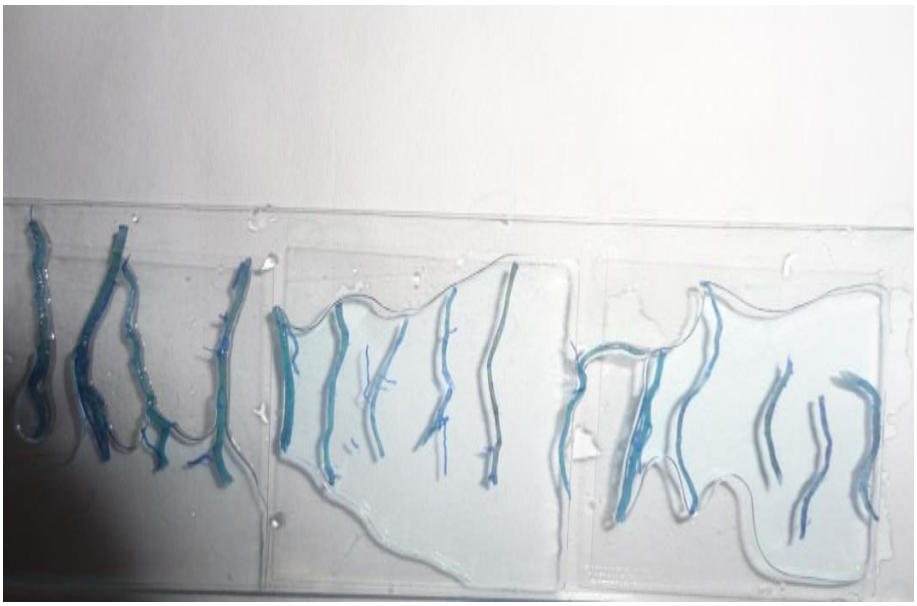
Anexo 1. Valores de densidad de colonización micorrízica en 150 raicillas de 1 año de edad en plantaciones de *G. arbórea Roxb.*

Número de raíces evaluadas	Densidad visual	Número de raíces evaluadas	Densidad visual	Número de raíces evaluadas	Densidad visual
1	1	51	15,5	101	1
2	1	52	2,5	102	1
3	1	53	2,5	103	1
4	2,5	54	1	104	1
5	0	55	1	105	1
6	1	56	1	106	0
7	2,5	57	1	107	0
8	0	58	1	108	0
9	1	59	1	109	2,5
10	1	60	1	110	2,5
11	1	61	1	111	2,5
12	0	62	1	112	2,5
13	1	63	1	113	1
14	1	64	2,5	114	0
15	1	65	2,5	115	1
16	1	66	0	116	1
17	1	67	0	117	1
18	1	68	1	118	1
19	2,5	69	1	119	1
20	15,5	70	1	120	0
21	2,5	71	1	121	1
22	1	72	1	122	2,5
23	1	73	2,5	123	2,5
24	2,5	74	2,5	124	2,5
25	15,5	75	0	125	1
26	1	76	2,5	126	1
27	1	77	1	127	1
28	2,5	78	2,5	128	2,5
29	15,5	79	2,5	129	1
30	0	80	1	130	1
31	1	81	1	131	0
32	1	82	1	132	0
33	0	83	1	133	1
34	0	84	15,5	134	1
35	0	85	1	135	1
36	0	86	2,5	136	12,5
37	1	87	1	137	1
38	1	88	1	138	1
39	0	89	1	139	1
40	0	90	1	140	0
41	1	91	1	141	0
42	1	92	1	142	1
43	1	93	1	143	1
44	1	94	1	144	0
45	2,5	95	1	145	1
46	2,5	96	2,5	146	1
47	1	97	1	147	1
48	1	98	1	148	1
49	1	99	1	149	1
50	1	100	2,5	150	1

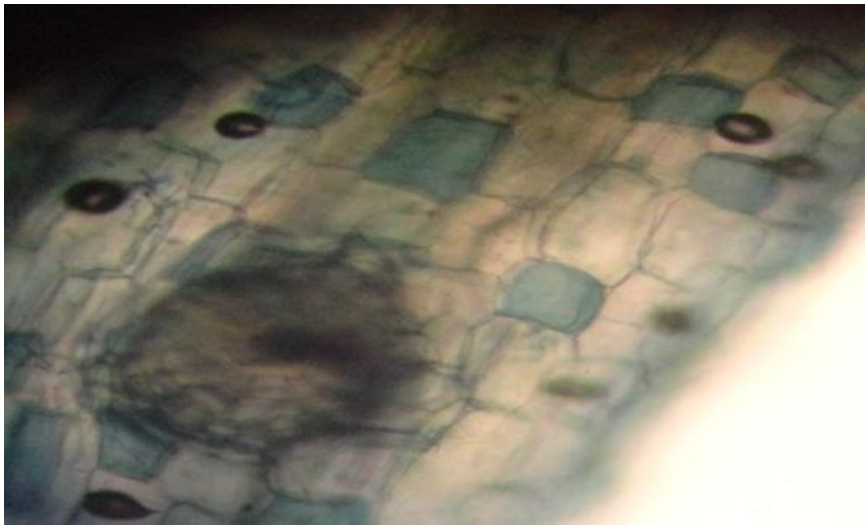
Anexo 2. Valores de densidad de colonización micorrízica en 150 raicillas de 3 años de edad en plantaciones de *G. arbórea Roxb.*

Número de raíces evaluadas	Densidad visual	Número de raíces evaluadas	Densidad visual	Número de raíces evaluadas	Densidad visual
1	0	51	15,5	101	1
2	0	52	2,5	102	1
3	1	53	2,5	103	1
4	2,5	54	1	104	1
5	0	55	1	105	1
6	15,5	56	1	106	0
7	2,5	57	1	107	0
8	15,5	58	1	108	0
9	1	59	1	109	2,5
10	1	60	1	110	2,5
11	1	61	1	111	2,5
12	0	62	2,5	112	2,5
13	1	63	1	113	1
14	0	64	2,5	114	0
15	0	65	2,5	115	1
16	0	66	0	116	1
17	0	67	0	117	1
18	1	68	1	118	1
19	2,5	69	1	119	1
20	15,5	70	1	120	0
21	2,5	71	1	121	1
22	1	72	1	122	2,5
23	1	73	2,5	123	2,5
24	2,5	74	2,5	124	2,5
25	15,5	75	2,5	125	1
26	1	76	2,5	126	1
27	1	77	1	127	1
28	2,5	78	2,5	128	2,5
29	15,5	79	2,5	129	1
30	0	80	1	130	1
31	1	81	1	131	0
32	1	82	1	132	0
33	0	83	1	133	1
34	0	84	15,5	134	1
35	0	85	1	135	1
36	0	86	2,5	136	12,5
37	1	87	1	137	1
38	1	88	1	138	1
39	0	89	1	139	1
40	0	90	1	140	0
41	1	91	1	141	0
42	1	92	1	142	1
43	1	93	1	143	1
44	1	94	1	144	0
45	2,5	95	1	145	0
46	2,5	96	1	146	0
47	1	97	1	147	1
48	1	98	1	148	1
49	1	99	1	149	1
50	1	100	2,5	150	1

Anexo 3. Fotografías de la preparación y observación para el conteo de raicillas de melina (*G. arbórea* Roxb) micorrizadas; y, resultados de la determinación del pH en muestras de suelo.



Seleccionando raicillas de melina para ser vistas en el microscopio



Observación de raíces de *G. arbórea* Roxb colonizadas (micorrizadas) con HMA

Recolección de la muestra de suelo en las plantaciones de melina (*G. arbórea* Roxb) para la identificación y cuantificación de los HMA.

Medición del pH en soluciones de agua y KCl en el Laboratorio de Suelos y Aguas de la UTEQ.

Glomus sp

Gigaspora sp

Esporas de HMA pertenecientes a los géneros encontrados en las plantaciones de melina

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
LABORATORIO DE SUELOS Y AGUAS

Oficio N° 0011 LSAA-UTEQ-2015
Quevedo, 25 de Noviembre del 2015

Asunto: RESULTADOS MUESTRAS DE SUELO

Ing. Fabricio Fabián Meza Bone

De mi consideración.-

Estimado Ing. Meza, junto con extenderle un cordial saludo, le notifico los resultados obtenidos de las muestras de suelo que se analizaron en el Laboratorio de Suelos y Aguas de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Los resultados que a continuación se describen, son el promedio de tres repeticiones por muestra analizada:

Tabla 1. Resultados de la determinación del pH en muestras de suelo.

Muestra	**Descripción de la Muestra**	**pH**	
		Agua destilada	**Cloruro de Potasio (KCL)**
1	Muestra de suelo de plantación de G. arbórea Roxb de **1 año** de edad.	6,23	5,22
2	Muestra de suelo de plantación de G. arbórea Roxb de **3 año** de edad.	6,45	5,25

Elaborado por: Laboratorio de Suelos y Aguas de la UTEQ, 2015

Gustosos de contribuir en su investigación le deseamos éxitos en sus estudios.

Atentamente,

Ing. Diana Véliz Zamora. M. Sc.
Responsable del LSAA-UTEQ

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

UNIDAD DE POSTGRADO

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

Quevedo, 21 de Enero del 2016

Sr. MC. Roque Vivas

Director de la Unidad de Postgrado

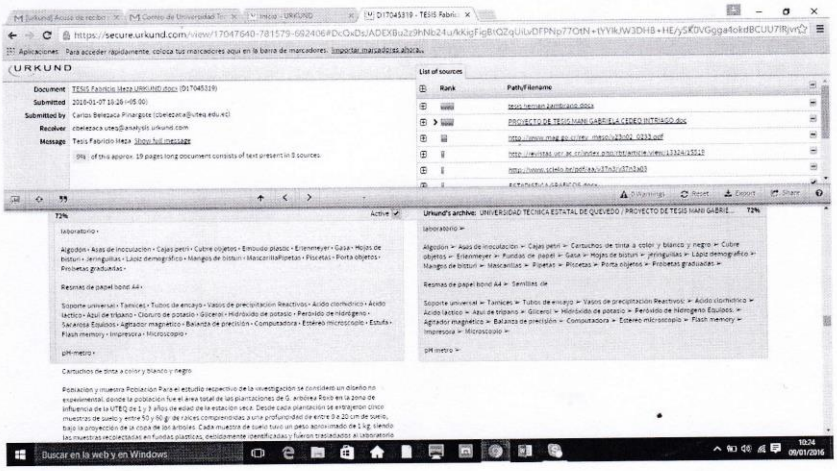
Universidad Técnica Estatal de Quevedo

Presente.

Cordialmente informo a usted que he revisado y subido a la plataforma URKUND la tesis de Magister, titulada **"Hongos micorrízicos de plantaciones de melina (*Gmelina arbórea* Roxb.) y su potencial como biofertilizantes a nivel de vivero"**, perteneciente al Candidato a Magister, Ing. Fabricio Meza Bone. Informo a usted que según el análisis realizado y posterior informe enviado por la plataforma URKUND, la tesis antes mencionada presenta un 91% de originalidad y un 9 % de similitud con otros trabajos publicados.

Particular que pongo a su conocimiento para los fines pertinentes. Ajunto foto de pantalla de plataforma URKUND donde consta informe.

Atte.,

Dr. Carlos Belezaca Pinargote

Tutor Unidad de Postgrado