1. INTRODUCCIÓN

Fue a mediados del siglo pasado cuando comenzó a cobrar interés el estudio de los efectos de las micorrizas en el crecimiento y desarrollo de las plantas. El primer trabajo señalaba al manzano, el cual presentaba Fe y Cu en suelos deficientes de estos micronutrientes (Mosse, 1959). Posteriormente se puso de manifiesto que los hongos formadores de micorrizas arbusculares aumenta la absorción de fosfato por la planta (Gerdeman & Trappe1974; Deaft & Nicolson, 1966).

La presencia de uno u otro tipo de micorriza en una determinada área, parece estar relacionada con la latitud, altitud, la composición florística y el tipo de suelo en particular, en lo relativo al pH, fósforo, materia orgánica y disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto, el desarrollo de la micorriza se puede ver afectado por el comportamiento de variables ambientales como los factores abióticos (propiedades físico-químicas del suelo, variaciones climáticas) y factores bióticos (tipo de comunidad vegetal, condiciones fisiológicas de las planta hospedera, interacciones con otros organismos, prácticas antrópicas) (Guerrero et al, 1996; Dodd & Thompson, 1994).

De igual manera, las interacciones entre las micorrizas arbusculares (MA) y la fauna del suelo también afectan de manera importante el comportamiento ecológico de la micorriza, donde micro artrópodos y nematodos fungívoros se alimentan de las hifas externas del micelio micorrízico (Fitter & Garbaye, 1994).

Por todo lo anterior, en la obtención de los propágulos de hongos micorrízico provenientes de un sitio, suelo o cultivo, es necesario tomar porciones de suelo cerca de las plantas que incluyan raíces, en la zona de influencia denominada rizósfera; seleccionando además el horizonte donde se presenta el mayor crecimiento de raíces que es donde se espera encontrar mayor cantidad de propágulos, igualmente se requiere que las raíces estén asociadas con partículas obtenidas entre rango de tamaño de 147-834 μ de la rizósfera de la planta lo cual puede ser usado como inóculo del cultivo trampa; posteriormente al reproducir los hongos se requiere de condiciones controladas, con la utilización de plantas micotróficas y sustratos estériles. Este sistema, conocido como cultivo

trampa, permite multiplicar hongos nativos colectados en el campo y amplificar así la cantidad de esporas o promover la esporulación de los hongos escondidos en la muestra (Ferguson & Woodhead, 1982; Habte & Osorio, 2001). Así mismo, las esporas en muestras de campo no están, por lo general, en condiciones adecuadas, para la identificación de las especies de hongos. Por esta razón, la multiplicación de hongos nativos en plantas trampa es importante, pues permite obtener esporas en todos los estadios de desarrollo y con todos los atributos morfológicos necesarios para su identificación.

La importancia de los HMA en la agricultura , está basada en su función de unir a la planta con el suelo, al servir como agente de transporte de nutrimentos entre otros componentes, teniendo un impacto en la conservación de este recurso (Elliot & Coleman, 1988; Bethlenfalvay & Linderman, 1992). En los últimos años ha sido un problema del cual se ha generado una gran cantidad de información.

El desarrollo vegetal puede incrementarse con la utilización de elementos biológicos que actúan en forma coordinada en la interface suelo raíz, entre estos y como factores imprescindibles se encuentran los hongos formadores de micorrizas arbusculares. (Barea, 1998: Fernández, 1999).

En la rizósfera se llevan a cabo importantes procesos, que definen el desarrollo y la producción de las plantas. Existe un flujo de compuestos producto de la fotosíntesis, que son exudados por la raíz, en forma de carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, enzimas y nucleótidos, lo que hace que la rizósfera, una zona ideal para el establecimiento de una gran variedad de microorganismos (Barea et al, 2002).

El papel de las micorrizas no solo se limita a la nutrición mineral de las plantas, también contribuyen a la protección de las mismas frente a patógenos del suelo y mayor tolerancia frente al estrés (salino, hídrico debido a la presencia de metales pesados) (Van Tichelen *et al,* 2001; Azcón-Aguilar *et al*, 2002; Ruiz & Lozano, 2003).

La utilización de micorrizas arbusculares (MA) no implica que se pueda dejar de fertilizar, sino que la fertilización se hace más eficiente y se puede ahorrar

cantidades importantes de fertilizantes minerales al tiempo que se logra una mayor absorción de los nutrientes disponibles en el suelo por parte de las plantas. (Tejeda et al, 1998).

En este trabajo se realizó una evaluación del grado de eficacia de la inoculación de micorrizas en el pasto *Brachiaria decumbens,* en el laboratorio, las micorrizas se obtuvieron de las muestras de la rizósfera de piñón, banano, maíz, soya y plantas nativas.

En la selección de la planta trampa se sugieren criterios como ser micotrófica, de buen crecimiento, compatible a un rango amplio de hongos MA, de fácil manejo de semilla, poda y ser perenne, tolerante a plagas y enfermedades (Cuenca et al, 2003). De igual manera, Ferguson & Woodhead (1982) recomienda a las monocotiledóneas como los pastos Sudan y Bahía, por sus hábitos rigorosos de crecimiento y desarrollo fibroso radicular rápido, ideales para cultivos trampa. Así mismo, (Hamel,1996) indica que para el establecimiento de cultivos trampa se puede utilizar suelos nativos, sugiere la mezcla de 2:1 (arena, suelo) y una duración del proceso que va de cuatro a cinco meses hasta máximo los ocho meses.

2. ANTECEDENTES

Una de las estrategias más exitosas de las plantas para superar el estrés durante la colonización de ecosistemas terrestres es la capacidad de sus raíces para establecer simbiosis benéficas con microorganismos del suelo (Allen, 1991).

Un ejemplo de esto son las micorrizas, las cuales consisten en la simbiosis mutualista entre ciertos hongos del suelo y las raíces de aproximadamente el 95% de las especies vegetales (Sánchez, 1999).

El vocablo Micorriza se utilizó por primera vez con un interés puramente sistemático, por el botánico de origen alemán Albert Bernard Frank en el año 1885, para designar "la asociación que se producía entre las hifas de algunos hongos del suelo con los órganos subterráneos de la gran mayoría de las

plantas superiores". Desde el punto de vista etimológico, la palabra se formó a partir del término griego " mykos" (hongo) y del vocablo latino " rhiza" (raíz) (Rivera *et al*, 2003).

El tipo de micorriza más estudiado se establece entre hongos de la clase Zigomicetes, orden Glomales, y muchas especies vegetales, incluyendo algunas de interés agrícola, hortícola y forestal; tal asociación es llamada endomicorriza o micorriza arbúscular (Harrier, 2001; Abbott y Robson, 1985).

Las hifas extrarradicales de estos hongos micorrízico arbusculares (HMA) se constituyen en extensiones de las raíces, incrementando así la capacidad de absorción de agua y nutrientes, particularmente fósforo (P) (Bolan, 1991; Habte & Manjunath, 1987). La tarea de captar P recae en buena parte en las hifas de los HMA (Schachtman et al, 1998).

El estudio de la asociación micorrízica es importante en los suelos del trópico que usualmente exhiben baja disponibilidad de (P) (Sieverding, 1991).

Por otra parte, se ha demostrado que las asociaciones micorrízicas se encuentran ampliamente distribuidas, desde los polos hasta los trópicos, por lo tanto no debe sorprender en lo absoluto encontrar especies vegetales formando esta asociación en la mayoría de los ecosistemas terrestres, constituyendo excepciones algunas plantas de zonas pantanosas y acuáticas (Solaiman & Hirata, 1995).

Las asociaciones micorrízicas desarrollan múltiples funciones entre las que se destacan: un aprovechamiento más eficiente de la zona radical a partir de un aumento en el volumen de suelo explorado, una mayor resistencia a las toxinas, incremento de la traslocación y solubilización de elementos nutritivos esenciales, aumento de la tolerancia a condiciones abióticas adversas (sequía, salinidad, etc.), así como cierta protección contra patógenos radicales.

Morton & Benny (1990) definieron tres tipos de asociaciones micorrízicas vigentes hasta nuestros días, tomando en consideración sus características morfo anatómicas y ultraestructurales (Ectomicorrizas).

2.1. USO DE MICORRIZAS

En la actualidad hay una gama de productos biofertilizantes internacionales a base de MA, la efectividad de la inoculación dependerá del balance de factores ecofisiológicos en el sistema planta suelo, lo cual significa que un mismo inóculo puede desencadenar efectos muy variados sobre un cultivo, dependiendo del tipo de manejo agronómico que se realice. Por lo tanto, no se puede generalizar el efecto de un tipo de micorrizas sobre todos los árboles ni sobre todos los ecosistemas. (Molina, L. & Col., 2005). Ahí radica la importancia de seleccionar un banco de micorrizas para posteriormente usarlas en la agricultura del Ecuador, en especial en los ecosistemas áridos.

Sieverding (1991) afirma que existe un desconocimiento acerca de la efectividad de las especies nativas frente a las introducidas. Aunque la efectividad de la inoculación para la mejora y mantenimiento de la salud y fertilidad del suelo, así como su efecto benéfico en la producción y el crecimiento de plantas de interés han sido extensivamente demostrados para diferentes sistemas a nivel de investigación (Jeffries et al, 2003; Koide, R. & Kabir, Z. 2000), los reportes de efectividad derivados de aplicación masiva en campo de inóculo producidos para tal fin son más escasos hay mucho por hacer en cuanto a multiplicación y obtención de especies nativas de hongos MA que sirva para mejorar la producción y sostenibilidad de un cultivo específico:

Las micorrizas tienen gran potencial para contribuir a una producción sostenible. Sin embargo, se resalta la importancia de profundizar en la investigación sobre el uso de micorrizas nativas o del sitio, lo que implica conocer más sobre la relación hongo planta, buscando aislar cepas específicas que permitan potencializar el crecimiento y productividad de los árboles en determinados agroecosistemas y evaluar las interacciones de estas con otros microorganismos de dicho suelo.

2.1.1. Ectomicorrizas

Las ectomicorrizas se aprecian con facilidad a simple vista, al entrar en contacto con las raíces de las plantas, las envuelven en una típica capa o manto de hifas (Fig.1) que tejen alrededor de las raíces colonizadas. A partir de esta estructura, las hifas se introducen entre las células de la corteza, sin llegar nunca a penetrarlas, y forman de esta manera la red de Harting, ocasionando diversos cambios anatómicos (Fig.2) (Garrido, 1988 & Strullo, 1978).

Fig. 1. Micorrizas con manto fúngico tomado de Montaño et al, 2009

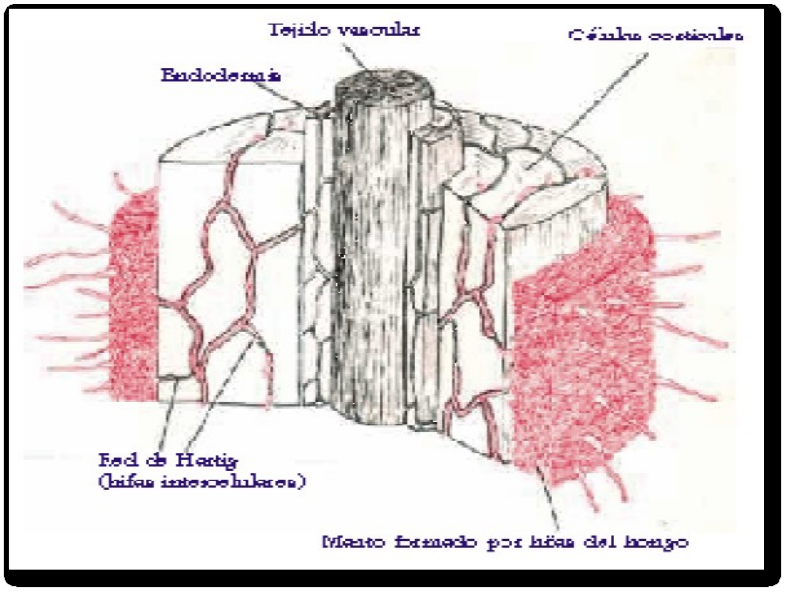


Fig. 2. Colonización de Ectomicorrizas tomado de Dávila & Ramos. 2009.

2.1.2 Endomicorrizas

Las endomicorrizas forman una red externa de hifas menos profusa que la anterior, el micelio invade la raiz inicialmente de forma intercelular, pero luego penetra en el interior de las células radicales desde la rizodermis hasta el interior de las células corticales sin llegar a colonizar el endodermo. Este grupo es el más difundido en el planeta y está dividido en varios subtipos, de los cuales, el más representativo e importante es el arbuscular (Fig. 3).

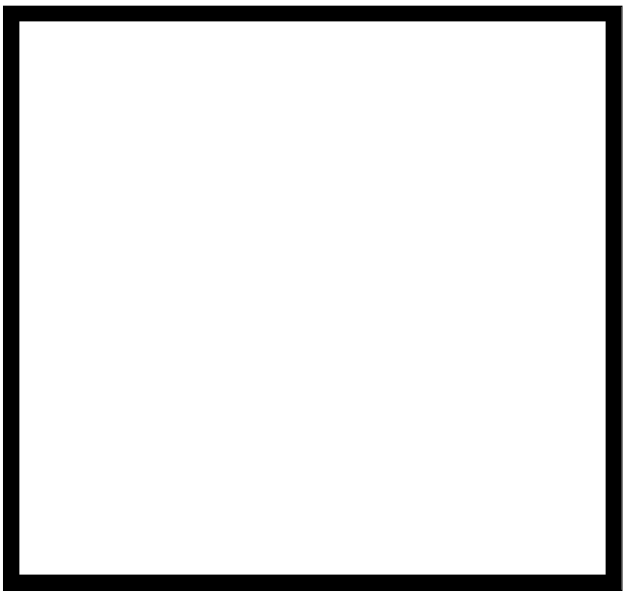


Fig 3. Colonización de Endomicorriza tomado de Azcon, G.& Barea 1980

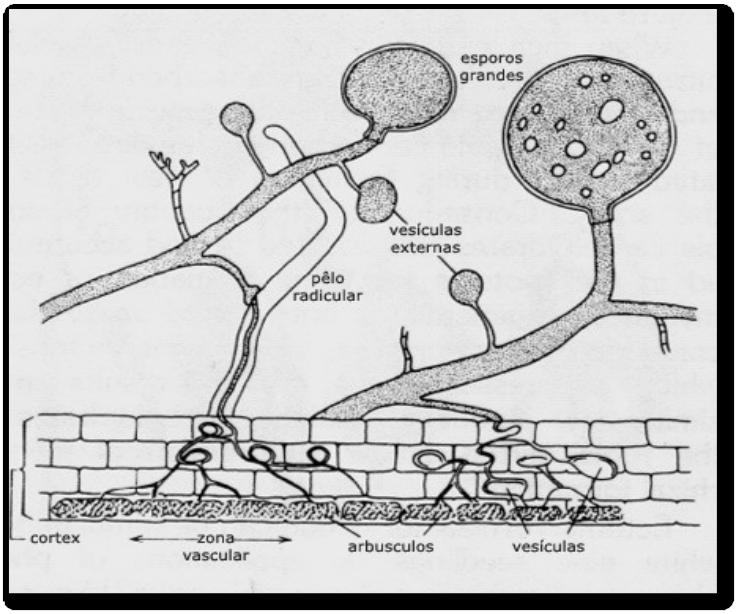


Fig. 4. Representación esquemática de colonización de una endomicorriza tomado de www.ces.purdue.edu/extmedia/FNR/images/FNR-104.fig4.gif

2.1.3. Orquidoides

Los orquidoides están formados por basidiomicetos y plantas de la familia Orchideaceae, esta planta presenta un ciclo de vida heterótrofo y recibe compuestos carbonatados a partir del hongo (Fig. 4) . Este penetra en las células de las raíz invagina la membrana, forma ovillos dentro de la célula, así como agregados de hifas poco estructuradas, conocidos como pelotones que al degenerarse liberan los nutrientes que contienen. Las orquideas son las principales poseedoras de este tipo de micorrizas y representan al tercer tipo más importante de micorrizas, estas plantas son dependientes en estado juvenil, cuando la planta fotosintetiza se independiza del hongo.

2.1.4. Ericoides

Las ericoides están formadas por basidiomicetos o ascomicetos y plantas de la familia Ericaceae. El componente fúngico de esta versatilidad en el uso de distintas fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo , orgánicas o no lo cual contribuye significativamente a la capacidad de las plantas que forman este tipo de micorrizas para crecer en suelos con alto contenido orgánico (Fig.

4) (Pearson & Read, 1975; St Jhon *et al,* 1983), son las más sencillas en forma de hifas cuando penetran las células para formar ovillos.

2.1.5. Arbustoides

Se establecen en plantas del orden Ericales concretamente a tres géneros *Arbutus*, *Artostaphylose* y *Pyrola*, con los hongos Ascomicotina y Basidiomicotina, sin aparente especificidad, poseen manto externo, red de Harting e hifas intracelulares que forman estructuras enrrolladas los "arbustoides" (Fig. 5) (Smith & Read, 1997).

2.1. 6. Monotropoides

Se establecen entre los miembros de la familia Monotropaceae (plantas sin clorofila) Basidiomycotina y hongos (Smith & Read, 1997). Se caracteriza por presentar una capa gruesa, estructuras de redes de Harting e intracelulares, ramificado y designado como "Haustorios" (Fig. 5). apenas diferenciada por la forma de penetración de las hifas a las células radicales.

2.1. 7. Ectendomicorrizas

Los hongos que la producen colonizan de forma dual las raíces: externamente formando un manto cortical e internamente penetrando intercelularmente en el córtex, poseen caracteristicas intermedias de ectomicorrizas al poseer manto externo y endomicorrizas que penetran en el interior de las células.

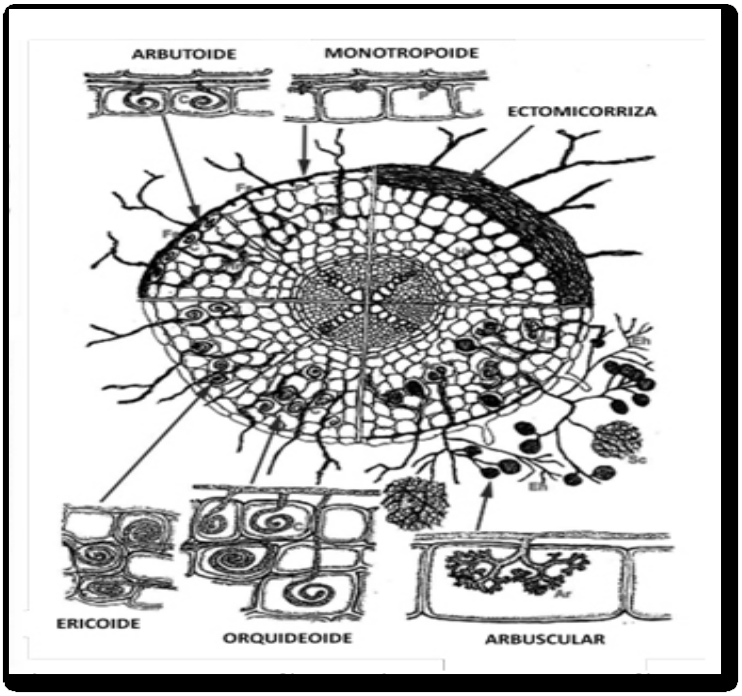


Fig. 5. Colonización de raíces por hongos micorízicos tomado de Montaño et al, 2007

2.2 Micorrizas Vesículo-arbusculares

La principal carcaterística es la presencia de arbúsculos, estructuras típicas de la colonización que el hongo desarrolla en el interior de las células de la corteza de la raíz por ramificación dicotómica repetida de sus hifas (Sánchez et al, 2006) en todos los casos forman arbúsculos y vesículas en algunos de ellos las vesículas son estructuras globosas e irregulares que actúan como órganos que reservan lípidos. Los arbúsculos son las estructuras encargadas de la transferencia bidireccional de nutrientes entre los simbiontes, realizada en la interfase planta-hongo a este nivel (Lorelí & Ortega, 2008). Se podría decir que las micorrizas arbusculares son la de mayor importancia y las que más ampliamente se encuentran distribuidas tanto a nivel geográfico como dentro del reino vegetal. Este tipo de micorrizas se encuentran en condiciones naturales en la mayoría de los cultivos tropicales y subtropicales de interés agronómico (Sieverding, 1991) en la mayoria de las angiospermas.

Las micorrizas vesículo-arbusculares (constituyen el tipo de simbiosis más ampliamente distribuida en la naturaleza. Se sabe en la actualidad que están presentes en el 80 % de las plantas, principalmente Angiospermas como Gimnospermas, Briofitas y Pteridofitas. Los hongos que forman parte de esta simbiosis son microscópicos a diferencia con los demás hongos formadores de micorrizas (Fig. 6).

En particular, la sistemática y taxonomía de los HMA son disciplinas que se encuentran en plena evolución. La clasificación y los arreglos filogenéticos de estos hongos son objeto de frecuentes revisiones por parte de los especialistas.

Durante muchos años, los HMA se ubicaron en el orden Endogonales junto al género no micorrízico *Endogone.* Sin embargo, a la luz de nuevas consideraciones filogenéticas se estableció que su condición simbiótica constituía criterio suficiente para agruparlos en un solo taxón, lo cual dio origen al orden *Glomales* y a un reordenamiento de familias (Morton & Benny, 1990 & Walker, 1992).

Debido a que anteriormente se tenían en cuenta solamente los aspectos morfológicos de las esporas, los cuales daban lugar a clasificaciones erróneas e inexactas (Mosse & Bowen, 1998; Trappe, 1987). La clasificación actual de los hongos formadores de micorrizas arbusculares está basada en los perfiles de ácidos grasos y en la secuencia nucleotídica del ARNr lBs (Morton & Redecker, 2001).

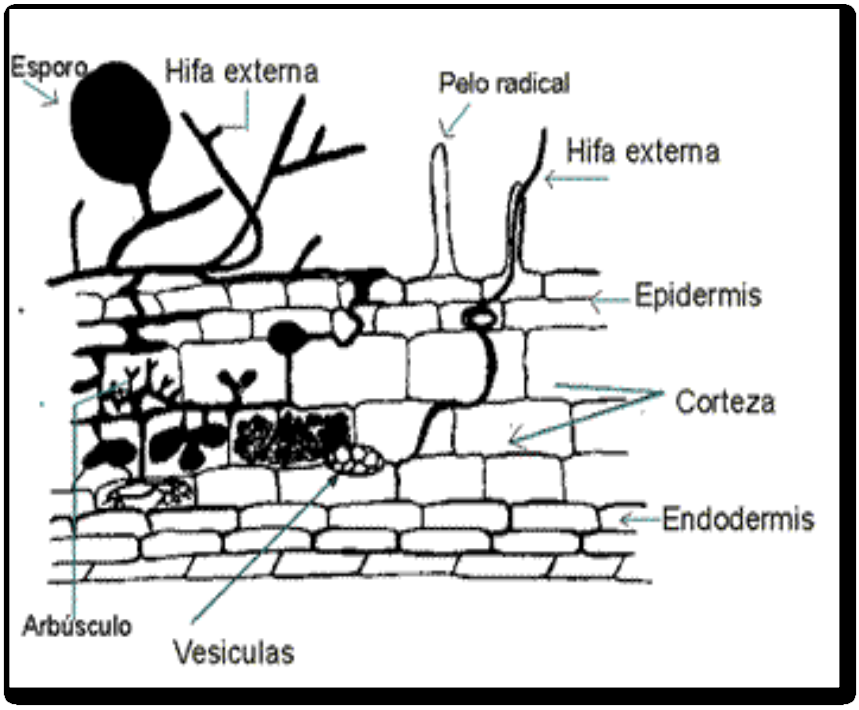


Fig. 6. Estructura de los MVA, tomado de Montaño et al, 2007.

2.3 Clasificación

La clasificación actual que se presenta a continuación incluye dos nuevos géneros, *Paraglomus* y *Archaeospora* basados ya no solamente en características estructurales de las esporas de los géneros *Glomus y Acaulospora sp,* que tenían un comportamiento dimórfico en su estructura, sino también en las diferencias filogenéticas dentro de estos generos (Tabla 1).

Clasificación taxonómica de los HMA

Órdenes (4)	*Familias (11)*	*Géneros (18)*
Glomerales	*Glomeraceae*	*Glomus*
		Funneliforme
		Rhizophagus
		Sclerocystis
Diversiporales	*Claroideoglomeraceae*	*Claroideoglomus*
	Diversisporaceae	*Redeckera*
		Diversispora
		Otospora
	Acalulosporaceae	*Acaulospora*
	Entrophosporaceae	*Entrophospora*
	Gigasporaceae	*Gigaspora*
		Scutellospora
		Racocetra
	Pacisporaceae	*Pacispora*
Archaeosporales	*Geosiphonaceae*	*Geosiphon*
	Ambisporaceae	*Ambispora*
	Archaeosporaceae	*Archaeospora*
Paraglomerales	*Paraglomeraceae*	*Paraglomus*

Tabla 1. Clasicafición taxonómica de los HMA (Schübler & Walker 2010).

2.5. Descripción de *Brachiaria decumbens*

Brachiaria decumbens, es una gramínea perenne cultivada para la producción de forraje destinado a bovinos, se expande rápidamente, proporcionando una gran extensión de área verde, con una altura que varía de 40 a 90 cm, es resistente al pisoteo, la quema y sequía. No obstante, las características naturales de *Brachiaria decumbens*, han permitido que sean reconocidas por su gran facilidad de micorrización con hongos formadores MA (Combatt *et al*, 2008).

En este trabajo se planteó como objetivos: a) evaluar la capacidad de micorrización radicular y producción de esporas de dos géneros de hongos MA, y b) su efecto en *Brachiaria decumbens,* en un suelo de baja fertilidad, bajo condiciones semicontroladas.

2.6. Morfología de los hongos Micorrizicos arbusculares

El nombre arbuscular se deriva de las estructuras características, los arbusculos, estructuras que se desarrollan dentro de las células corticales de la raíz del hospedero. La micorriza arbuscular presenta tres importantes componentes: la raíz misma, las estructuras fúngicas dentro de las células de la raíz y un micelio extrarradical en el suelo (Smith & Read, 1997).

2.6.1 Micelio Interno

El micelio interno se inicia cuando una hifa entra en contacto con la raíz, se forma un apresorio, penetra la dermis, dando origen a nuevas hifas que crecen entre y al interior de las células corticales, se extienden en ellas y colonizan poco a poco hasta llegar a las células más internas de la corteza (Sánchez, 2007) (Fig. 7).

Fig. 7. Micelio interno

2.6.2. Arbúsculo

Una vez formado y establecido el micelio interno, comienza su ramificación dicotómica dando lugar a la formación de arbúsculos, los cuales son órganos de transferencia de nutrimentos tienen un tamaño comparable al de las mitocondrias y su vida aproximada es de una a tres semanas después de los cuales colapsa y parte de él se reabsorbe hacia el citoplasma hifal y el resto de componentes permanecen en la célula hospedera (Escobar *et al,* 1998) (Fig. 8).

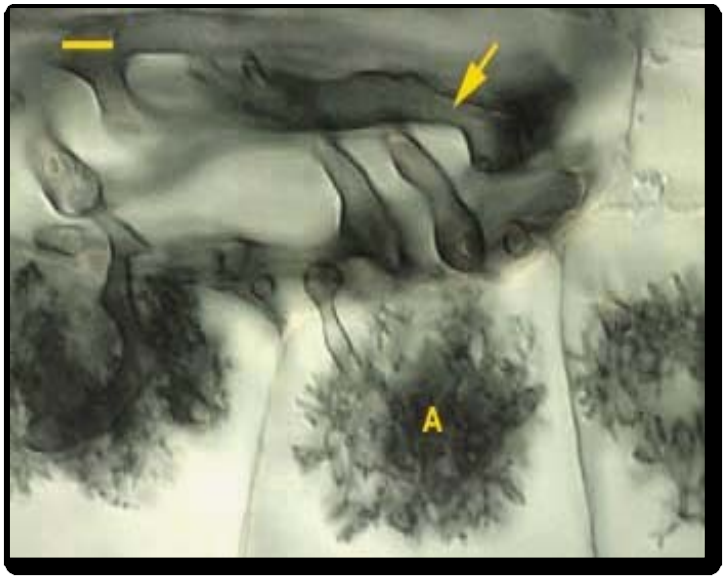


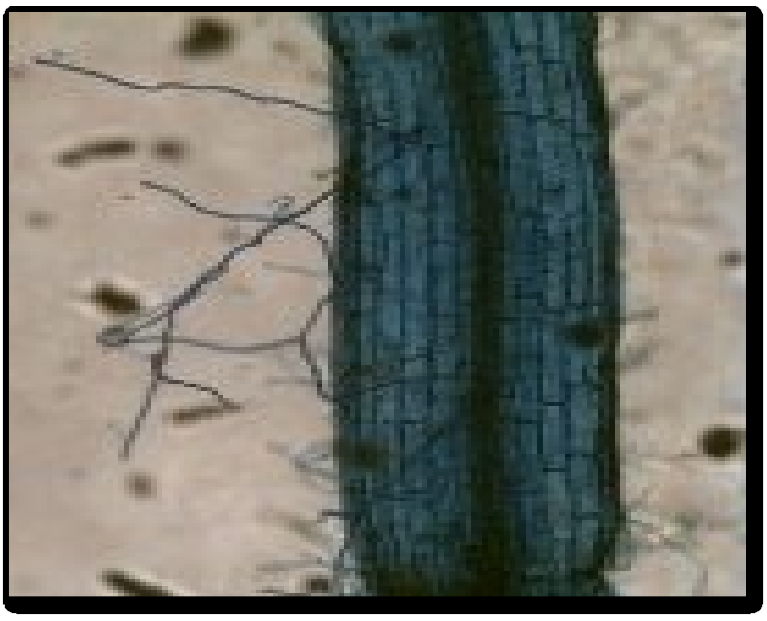
Fig. 8. Arbusculo

2.6.3 Micelio externo

Según Van der Heijden & Sanders (2002), el micelio externo es el puente entre la raíz y el suelo. Actualmente se sabe que esta estructura fúngica se encuentra ampliamente distribuida en el suelo; conecta plantas y puede funcionar como una fuente intercambio nutrimental entre individuos.

El micelio micorrízico constituye entre el 80% y 90% de la masa fúngica en el suelo debido a que el micelio externo se basa en hifas gruesas las cuales tienen como función explorar el suelo cuyo diámetro disminuye con el orden de ramificación (Friese & Allen, 1991).

El micelio externo permite que el hongo extienda la zona absorción de nutrimentos mas allá de la rizósfera que se estima en unos cuantos milimetros en el entorno radical e incrementa el volumen del suelo a explorar, en intensidad y extención, por la planta micorrizada (Abbott & Robson, 1985) (Fig. 9).



.

Fig. 9. Micelio externo

2.6.4. Esporas

En una raíz joven una vez realizada la simbiosis, el hongo completa su ciclo de vida y se forma en el micelio externo y tiene lugar su formación en el micelio externo las esporas asexuales. En el micelio interno se forman algunas de las cuales solo se pueden visualizar en el microscopio (Sánchez, 2007).

Las esporas poseen características propias que constituyen la única estructura externa que permite el reconocimiento morfológico de las especies de micorrizas arbusculares (Escobar *et al,* 1998) (Fig. 10).

Fig. 10. Esporas

2.6.5 Vesículas

En algunos géneros de HMA las hifas internas se modifican, sufren ensanchamientos dando origen a vesículas que se disponen entre las células corticales y dentro de ellas, y ocupan en las posiciones intermedias o terminales (Sánchez, 2007). Estas son estructuras globosas que actúan como órganos

de almacenamiento de energía en forma de lípidos y azúcares (Duchicela & González, 2003) (Fig. 11).

Fig. 11. Vesículas

2.7. Establecimiento de la simbiosis micorrízicas

En ausencia del hospedero el crecimiento del HMA se ve limitado a un tiempo relativamente corto (20-30 dias), después del cual sufre varias modificaciones morfológicas como: retracción del citoplasma del ápice, producción de septos, desarrollo de ramificaciones laterales e hinchazón del ápice hifal. La presencia de la raiz, en cambio, permite el desarrollo de un micelio vegetativo que puede colonizar entre 60-90 % del sistema radical en condiciones favorables (Bonfante & Perotto,1995).

2.7.1 Etapas de colonización

La colonización fúngica no produce alteraciones morfológicas distinguibles reseñables, por lo cual las técnicas microscópicas tienen un rol fundamental al momento de realizar un análisis de la colonización micorrícica. La colonización solo tiene lugar en la epidermis y en el parénquima cortical de las raíces. El

hongo MA no penetra nunca en el cilindro vascular ni en las regiones meristemáticas (Bonfante - Fasolo, 1988).

El proceso de preinfección esta asociada a la actividad de los propágulos presentes en el suelo que circunda la raíz. Dichos propágulos pueden ser esporas o micelios fúngicos. Este último se encuentra asociado a raicillas de plantas vivas o segmentos de raíz infectadas: Si el hongo encuentra una raíz suceptible a ser micorrizada hay una notable estimulación que se manifiesta con abundante producción de micelio, una profusa ramificación del micelio, que incrementa sus posibilidades de contacto con la raíz (Giovannetti *et al,* 1993) **(Fig 12).**

Una vez superada las primeras capas de las células de la raíz que constituyen un auténtico cuello de botella para el establecimiento de la simbiosis, el hongo micorrízico coloniza el córtex de la raíz, siguiendo dos patrones de desarrollo diferentes de acuerdo a la estructura de la raíz: *Arum* y *Paris*. En los de tipo *Arum* las hifas del hongo se extienden por los espacios intercelulares del córtex, formando intervalos regulares de ramificaciones laterales que penetran las paredes celulares, y se ramifican dicotómicamente de forma repetida dando lugar a los arbúsculos en las micorrizas tipo *Ginkgo* (Bonfante-Fasolo & Fontanana, 1985), *Taxus (*Strullo,1978) donde las ramificaciones son más reducidas **(Fig 13).**

Una vez que el hongo penetra se asegura un proceso proliferativo que conduce al establecimiento de una unidad de colonización que se puede extender hasta un centímetro de distancia a partir del punto de penetración, en este caso, la degeneración ocurre por autolisis (Peterson & Bonfante, 1994).

Simultáneamente a la colonización de la raíz, el hongo desarrolla en el suelo una red de micelios que constituyen la fase extrarradical de la simbiosis que a su vez es la principal responsable de la absorción de nutrientes y minerales que posteriormente son transferidos a la planta. Dado el carácter de estricto simbionte del hongo micorrizico (Becard & Fortin, 1988).

Inicialmente se producen unas hifas relativamente gruesas denominadas hifas exploradoras, estas crecen con una marcada apicalidad. Estas hifas exploradoras sufren ramificaciones tomando el nombre de hifas secundarias y terciarias. Las hifas exploradoras son las responsablles del avance del micelio y la colonización fúngica. A intervalos regulares se forman estructuras ramificadas de absorción cuya hipotética acción sería la absorción de nutrientes (Bago *et al,* 2000).

Fig. 12. Espora quiscente

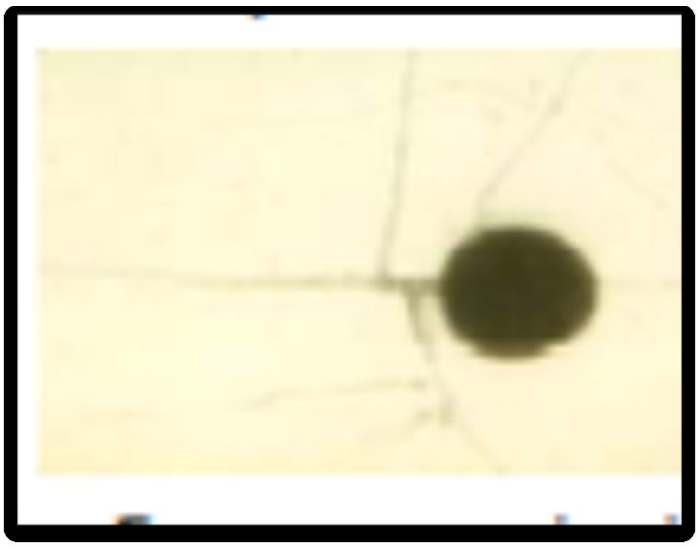


Fig. 13. Espora en germinación

La formación de los apresorios tiene lugar sobre las células epidérmicas producto del aumento de la presión hidrostática en la zona apical de la hifa infectiva (Barea *et al*, 1991) Fig. 14. La penetración se inicia con la formación de un "punto de entrada" que se caracteriza por el desarrollo de un abultamiento o apresorio (Fig. 14) en el punto de contacto sobre la superficie de la raíz. Cada espora genera un solo punto de entrada, mientras que un segmento de raíz puede eventualmente generar más de uno. No es del todo claro si el mecanismo de penetración esta mediado por un evento enzimático, por un evento mecánico o por una combinación de ambos. Cuando una hifa contacta con la raíz forma un apresorio (Fig.14), estructura de precolonización a partir de la cual dos o tres días después se inicia la penetración en la raíz de la planta (Giovannetti *et al,* 1993; Jolicoeur *et al,* 1998).

.

Fig. 14. Formación de apresorios

La unidad de colonización avanza mediante el crecimiento de hifas aseptadas que se extienden entre las células corticales y que generan estructuras características como los arbúsculos y las vesículas **(Fig. 16).** La formación y la extensión de los arbúsculos son controlados por las plantas (Nishimura *et al,*

2002). La vida media de los arbúsculos es de 7 días (Alexander *et al,* 1988) Transcurrido este tiempo los arbúsculos se degeneran. El colapso arbuscular podría estar inducido por el reconocimiento de parte de la planta al arbusculo como una estructura extraña y su consecuente reacción en contra (Garcia-Garrido & Ocampo, 2002). Sin embargo no es descartable que el colapso arbuscular sea parte del desarrollo de los hongos micorrízicos.

Fig. 15. Formación de hifas intercelulares y arbusculos

Fig. 16. Formación de arbusculos y vesículas

El micelio extrarradical se desarrolla directamente en el suelo, se encuentra expuesto a condiciones ambientales, a la acción de otros microorganismos en el suelo, formación de agregados y el mantenimiento del mismo (Jeffries & Barea, 2001). (Fig 17.)

Fig. 17. Micelio extrarradical

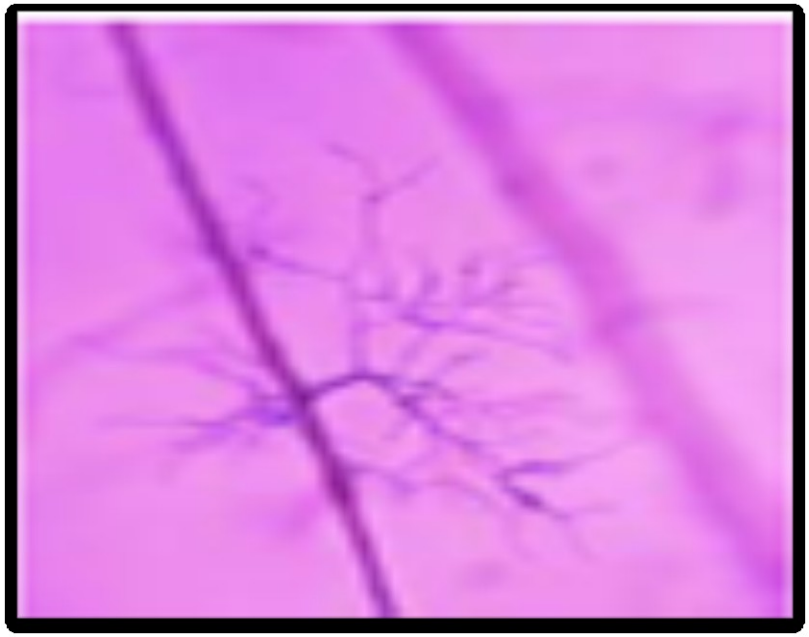


Fig 18. Formación de BAS

En el proceso de desarrollo de la etapa de colonización a la altura del BAS hay una disminución progresiva del grosor de la pared hacia el ápice de las hifas, lo que facilita la absorción de nutrientes (Bago *et al,* 1998).
Las BAS son estructuras transitorias y al cabo de pocos dias pierden su contenido citoplasmático a menos que desarrollen esporas (Fig. 18).

Las esporas según la especie de hongos micorrízicos pueden desarrollarse libres (como en *G. intraradices*) o agrupadas en cuerpos fructíferos conocidos como esporocarpus (caso de *G. mosseae*) concluyendo de este modo el ciclo de vida. Las esporas de los hongo micorrízicos producen esporas de origen asexual, poseen numerosos núcleos y glóbulos lipídicos.

Fig 19. Formación de BAS- esporas.

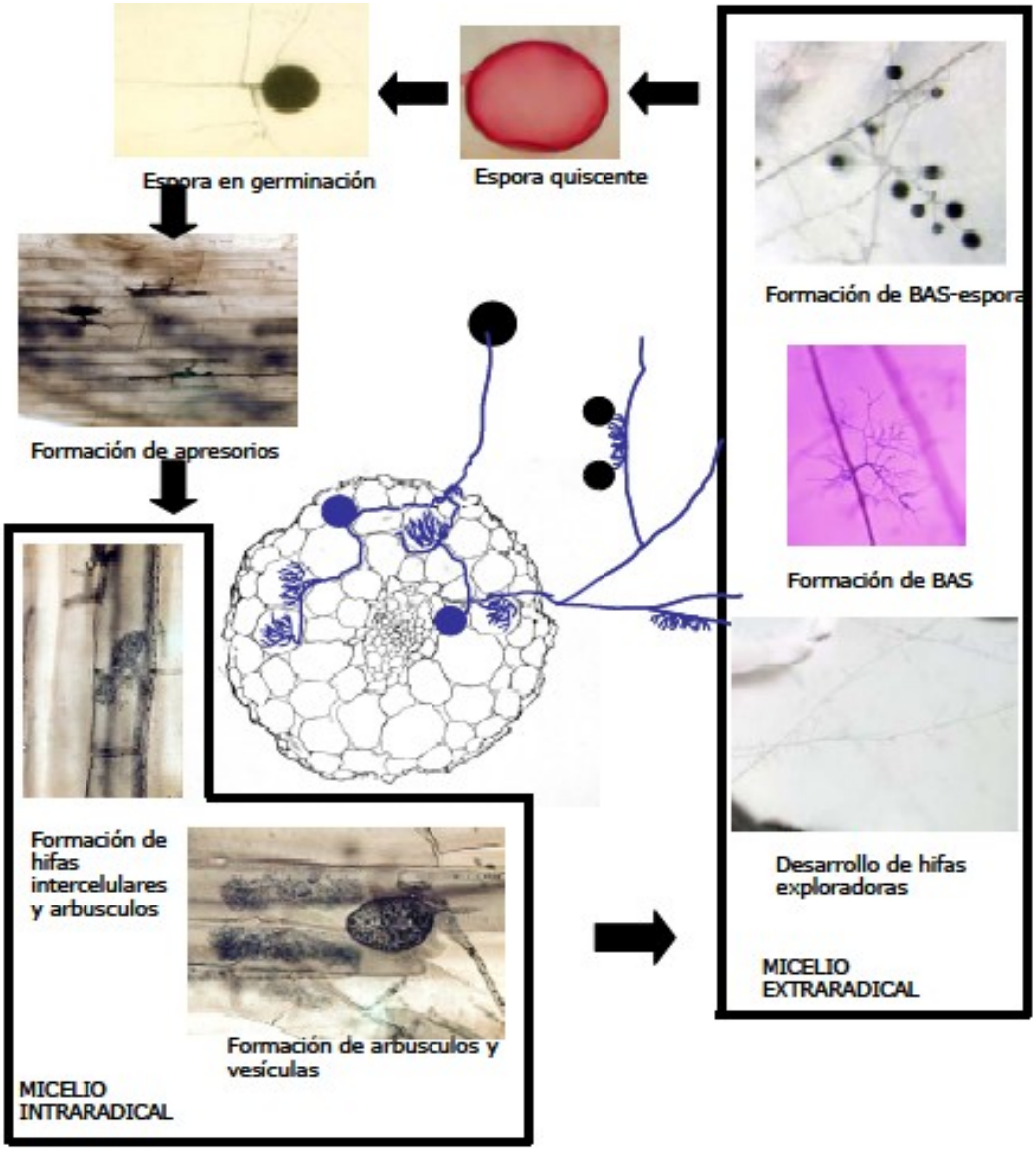


Fig. 20. Proceso de formación de HMA

2.7. Descripción de *Brachiaria decumbens*

Esta especie es usada como forraje para la ganadería en las zonas del trópico y subtrópico del viejo mundo y también en el nuevo mundo, esto se debe a sus altos rendimientos en materia seca y capacidad de pastoreo (Olivera *et al*, 2006).

Este pasto originario de Africa específicamente de Uganda en Sudamérica se introdujo en Brasil, Venezuela y Colombia en 1949, su amplio rango de adap-

tación va desde el nivel mar hasta los 2300 msnm, tolerando precipitaciones entre 700 y 3200 mm, además puede seguir latente hasta 170 días después de una sequía.

La producción de materia seca de esta especie forrajera varía en relación con las condiciones edafoclimáticas y de manejo. En África, América tropical y Australia se ha logrado rendimientos entre 8 y 36 t/ha de materia seca, estudios realizados han reportado contenidos de 12 a 15% de proteína cruda, y hasta 60% de digestibilidad en la materia seca, superando a numerosas forrajeras tropicales (Alvarado *et al,* 1990)

2.7.1 Morfología de *Brachiaria decumbens*

Planta herbácea perenne, semierecta a postrada y rizomatosa, produce raíces en los entrenudos, las hojas miden de 40 cm a 90 cm de longitud de color verde oscuro y con vellosidades. La inflorescencia es en racimos esta especialmente destinada al forraje para alimentación de bovinos, es resistente a la quema y la sequía. No obstante las características de *Brachiaria decumbens* han permitido que sean reconocidas por su gran facilidad de micorrización con hongos formadores de MA (Combatt *et al*, 2008) (Fig. 21).

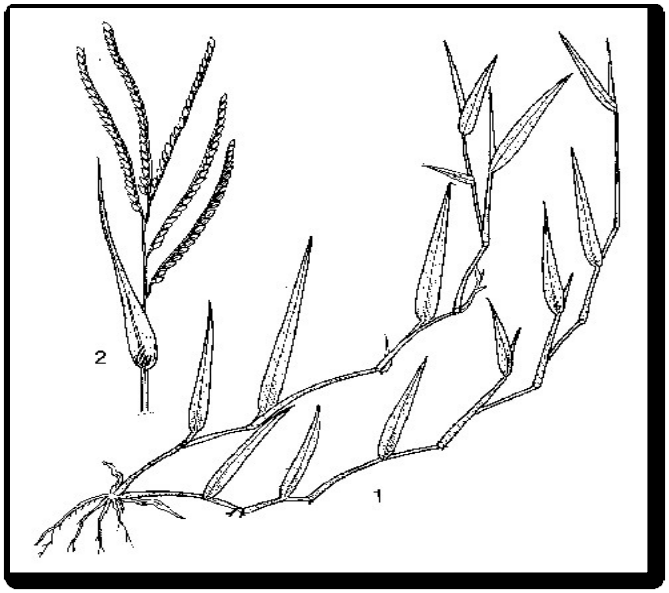


Fig. 21. Morfología de *Brachiaria decumbens*

3. HIPOTESIS

La aplicación de hongos formadores de MA en *Brachiaria decumbens* y su interacción con el sistema radicular provocará un mejor desarrollo vegetativo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Conocer la incidencia de hongos micorrízico arbusculares en *Brachiaria decumbens* a nivel de invernadero.

4.2 Objetivos Específicos

1. Identificar los generos y/o especies de hongos que forman la asociación micorrízica arbuscular (MVA) que muestren mayor capacidad de reproducción en *Brachiaria decumbens.*

.

2. Determinar la densidad (esporas/ g suelo) que forman la asociación micorrízica vesiculo arbuscular (MVA) presentes en el suelo rizosférico de *Brachiaria decumbens*.

3. Determinar el porcentaje de colonización de los hongos formadores de la asociación micorrízica vesículo arbuscular (MVA en raíces de *Brachiaria decumbens).*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

El área de estudio se encuentra localizada en la Provincia del Guayas. Se llega a Limoncito tomando la vía a la Costa hasta el km 30 y se ingresa por el Canal de CEDEGE a unos 15 km más adentro.

Según las reseñas recopiladas por el Sr. Angel Orrala, Moisés González, Toribio Orrala y Erasmo González esta comuna existe desde 1901, año en que llega el Sr. Manuel Orrala Lainez y su esposa Mercedes González Matías con una hija de un año de edad. En 1910 fue escogido como inspector. Posteriormente se asentaron personas de otras comunas como Zapotal, Colonche, etc.

En el año 1923 pasó el primer carro por este recinto, debido a que antes no existía carretera vehicular sólo camino de herradura por donde se trasladaban las personas a "lomo de burro" hasta la Ciudad de Guayaquil.

Los pobladores sostienen que el nombre de Limoncito se debe a que en esta zona se sembraron muchos árboles de limón. En la actualidad se cultivan otros productos como el maíz, el tomate, entre otros. Este recinto también fue llamado "La Teresita" como constó durante muchos años en los mapas.

En el año 2003, contaron con el apoyo del Plan Internacional, quiénes gestionaron el tanque elevado para llevar a cada casa agua por tubería, lastimosamente dejó de funcionar.

Este recinto está regido por un Cabildo conformado por un Presidente, un Secretario, un Tesorero y un Síndico

La recolección de muestras de suelo para el posterior aislamiento e identificación de los hongos formadores de micorriza arbuscular (MA) se realizó en sistemas de cultivos de piñon, banano y plantas nativas

ubicados en la granja experimental de la Universidad Catolica de Santiago de Guayaquil, con una posición geográfica de W 79°53´00. y S 02°09´12", a una altura de 40 metros sobre el nivel del mar (msn). Con una temperatura media anual 25°C y una precipitación media anual de 807.87 mm.

Fig. 22. Ubicación de Limoncito

5.2 Materiales

Materiales de Campo

- Fundas ziploc
- Machete
- Guantes
- GPS map 62sc handheld navigator
- Pala
- Materiales de oficina
- Sacos

Materiales de laboratorio

- Tamices de 500 µm y 45µm
- Nevera
- Anaqueles
- Bandejas
- Frascos contenedores 500 ml
- Placas porta y cubre objetos
- Vaso de precipitación
- Pinzas
- Aguja enmangada
- Matraz de erlenmeyer
- Autoclave
- Estufa
- Microscopio Optika B-352 Pli binocular E-9l quintuple
- Estereoscopio MSL 4000
- Cajas de Petri
- Tubos de ensayo
- Jeringuillas 20ml
- Tijera
- Tubos para centrífuga
- Centrífuga
- Vidrio reloj
- Micropipeta
- Pipeta
- Papel aluminio

- Papel filtro
- Computadora
- Calculadora
- Varilla de vidrio
- Vasos de plástico
- Turba
- Arena
- Cámara fotográfica Fujifilm FMECAF 0680
- Balanza analítica
- Embudo
- Semillas de *Brachiaria decumbens*

Reactivos

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

5.3 Metodología

Muestreo

El lugar escogido para realizar el muestreo fué la granja experimental Limoncito con una superficie de 10 hectáreas en donde se distribuyen los diferentes cultivos que fueron muestreados.

La finca se dividió en varios lotes en función de los cultivos presentes en el lugar, y se muestrearon los siguientes cultivos:

- Cultivo de maíz (*Zea mays*)
- Cultivo de piñon (*Jatropha curcas*)
- Cultivo de banano (*Musa sapientum*)
- Cultivo de soya (*Glycine max*)

Cada lote con una superficie de 0.5 hectáreas aproximadamente.

Se seleccionaron 4 lotes, de aproximadamente 0,5 hectáreas cada uno. En cada lote se tomó cinco submuestras de suelo rizosférico, a una profundidad de 0 – 10 cm, las cuales se empacaron en bolsas ziploc y rotuladas con la fecha, el sitio y código asignado.

De la vegetación circundante se tomó cinco muestras las que fueron llevadas posteriormente al laboratorio de Fisiología vegetal de la Carrera de Ingeniería Agrícola de la Facultad Técnica para el Desarrollo de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.

5.3.1 Fase de laboratorio

El trabajo de laboratorio y experimental se desarrolló en el laboratorio e invernadero de la Carrera de Ingeniería Agrícola de la Facultad Técnica para el Desarrollo de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.

5.3.2 Aislamiento de esporas

Una vez realizado el tamizado respectivo de cada muestra, se procedió al aislamiento de esporas mediante la técnica propuesta por Sieverding, (1984). De cada muestra se tomaron 100 gr de suelo, se depositaron en un Beaker al cual se agregaron de 200 a 300 ml de agua se agitó por 30 minutos, posteriormente se pasó por dos tamices de distinta medida en uno 500 µm y 45 µm, para el secado se usó un papel filtro y embudo la muestra permaneció en el papel filtro hasta su secado total. El contenido una vez seco se colocó en los tubos de centrifuga, a la cual se le agregó con una jeringa al fondo del tubo 25 ml de solución de azúcar al 60 % (Fig. 23-24).

Fig. 23. Tomado de la técnica de Pillips & Hayman 1970

Fig. 24. Aislamiento de esporas tomado de la técnica de Pillips & Hayman 1970

5.3.3 Cuantificación de esporas

De cada muestra procesada por la técnica anterior, tomando encuenta lo indicado por (Schenck & Pérez, 1990), se tomaron 2 ml de cada una de ellas y se depositaron en una caja Petri rayada en cuadriculas de 1cm² para facilitar el conteo respectivo. Cada conteo se realizó por 3 ocasiones para tener un dato confiable de la cantidad de esporas presentes por cada 100 gr de suelo. El resultado ha sido expresado en número de esporas/ 100gr de esta forma se pudo obtener la densidad promedio de hongos micorrízicos.

5.3.4 Separación de morfotipos

Después del conteo respectivo, se colocaron en un vidrio de reloj, se observaron en el estereo microscopio, con una micropipeta se reunieron los morfotipos teniendo en cuenta la similitud en forma, color, tamaño de esporas.

Con una micropipeta se procedió a extraer las esporas, éstas se colocan en una caja petri con agua estéril, se rotulan a cada una con su respectiva identificación: número de muestra, fecha donde fueron recolectadas y las caracteristicas de cada morfotipo encontrado, finalmente se guardaron en la nevera para su posterior utilización**.**

5.3.5 Identificación de género y/o especies

Cada uno de los morfotipos aislados se procedieron a colocar en vidrios de reloj, se observaron en el estéreo microscopio sus características como coloración y tamaño, separando los grupos según sus caracteres. Luego se procede a limpiar las partículas orgánicas e inorgánicas, con la ayuda de una micropipeta, se colocó las esporas en cajas de Petri con agua estéril, posteriormente se preparó láminas portaobjetos con las esporas extraídas.

5.3.6 Montaje y tinción de esporas

En el montaje se utilizó alcohol polivinilico, ácido láctico glicerol (PVLG) y reactivo Melzer (1:1v/v) como reactivos de montaje, en las láminas previamente preparadas con las muestras se ejerció una ligera presión para romper levemente las esporas, luego se secó cada una de las placas preparadas a temperatura ambiente durante 72 horas. Después de este de tiempo se realizó el análisis, con la ayuda del estéreo microscopio se clasifican basándonos según su color, forma, unión hifal y tipos o grupos de paredes, además de considerar la distribución de las ornamentaciones según la literatura citada (Fig. 25) Técnica de (Phillips & Hayman,1970).

Fig. 25. Técnica de Phillips & Hayman 1970

5.3.8. Multiplicación de las esporas nativas de hongos MA en plantas trampas de *Brachiaria decumbens*

Se usaron semillas de pasto (*Brachiaria decumbens*) la selección del pasto para la multiplicación de los hongos micorrízicos arbusculares se hizo según la recomendación de la literatura para la multiplicación de hongos micorrízicos y el uso de gramíneas como plantas trampas, con el uso de estas se busca dis-

minuir el ataque de patógenos que pueden ser iguales o parecidos (Sieverding, 1984) (Fig. 26).

Fig. 26. *Brachiaria decumbens*

5.3.9. Siembra

Para el establecimiento del microcultivo se mezcló el sustrato preparado de arena y turba. Se usaron 20 recipientes con capacidad de 1000 g que sirvieron como macetas. Se sembraron 10 semillas de *Brachiaria decumbens*, por cada maceta teniendo un total de 200 semillas, transcurridos 8 días de germinación, se procedió a inocular 10 esporas de hongos MA previamente aislados e identificados a nivel de género por macetero las mediciones de altura de la planta se realizó 3 veces la primera a los 70 días, la segunda a los 90 días y la última a los 120 días.

5.3.10. Tratamientos

El experimento estuvo conformado por 4 tratamientos (Tabla 2), cada uno constituido por un género de hongo MA:

Nº	Tratamiento
T1	*Glomus sp.*
T2	*Scutellospora sp.*
T3	*Glomus sp. + Scutellospora sp.*
T4	Testigo

Tabla 2. Tratamientos

Cada tratamiento contó con 15 repeticiones (macetas) distribuidas en un Diseño Completamente al Azar, T4 fue el control, este consistió en la aplicación de agua destilada estéril, las evaluaciones se realizaron en tres periodos, 70, 90 y 120 días después de las inoculaciones (cinco repeticiones por evaluación).

5.3.11. Análisis estadístico (Diseño experimental)

Una vez obtenidos los datos de altura de la planta, peso de materia húmeda y cantidad de esporas de cada género, se procedieron a analizar usando el Método Estadístico de ANOVA mediante el cual se obtuvo el grado de significancia entre los tratamientos y el testigo.

Para efectuar el análisis estadístico se consideró el método estadístico ANOVA de un factor se basa en descomponer la suma de cuadrados,

$$SS_T = \sum_{i,j} \left(\overline{X}ij - \overline{X} \right) 2$$

Es la suma de dos términos. La notación se establece de forma que x1, x2, sean las observaciones del grupo 1, por X21, X22, : : :, x2n2, las del grupo 2, etc. El primer término de la descomposición es la suma de cuadrados entre grupos,

$SS_B = \sum_i^{ni} \left(\overline{X}i - \overline{X} \right) 2$

Este se asocia a las diferencias entre los grupos, es decir al efecto del factor, y el otro es la suma de cuadrados dentro de los grupos, asociada a la variabilidad dentro de los grupos, que no depende del nivel del factor

$$SS_w = \sum_{i=1}^{ni}(xi - xi)\,2$$

Como SS_w es la suma de los cuadrados de los residuos, también se la llama suma de cuadrados residual.

$$S^2_i = \frac{1}{\ddot{n}i-1}\sum_{j=1}^{ni}(xi - xi)\,2$$

Resulta SS_w:

$$(n_1\text{-}1)s^2 + .. + (n_k\text{-}1)\,s^2_K = (n\text{-}k)s^2 \ .$$

Por consiguiente, SS_B y SS_w se obtienen fácilmente a partir de las medias $\frac{xi}{\ddot{Y}i}$ las varianzas S^2.

La suma de cuadrados total tiene dft = n-1 grados de libertad, y la suma de cuadrados entre grupos, dfb = k - 1. La suma de los cuadrados de los residuos del grupo 1 tiene n1-1 grados de libertad, la del grupo 2, n2-1, etc. En total, dfw = $(n_1\text{-}1)+\ldots+(n_k\text{-}1)=n\text{-}k$

Se observa que dft = dfb + dfw y que dfb y dfw son los números de grados de libertad usados en la prueba ***F***. A continuación, se calculan los cuadrados medios y el valor ***F***, según las formulas.

$$MS = \frac{SS}{df}, \quad F\ \frac{MSB}{MSW}.$$

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor *F*	Nivel de significancia	
Entre grupos	SS_B	Dfb	MS_B	*F*	*P*	
Dentro de los grupos	MS_W	Dfw	MS_W			
Total	SS_T	Dft				

Tabla 3. ANOVA

6. VARIABLES DE RESPUESTA

De acuerdo con los análisis realizados en el Laboratorio de Fisiologia Vegetal de la Facultad Técnica para el Desarrollo de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, los resultados finales del análisis de *Brachiaria decumbens* inoculada con hongos micorrízicos arbusculares extraídos de la rizósfera de los cultivos de banano, piñón, maíz, soya y plantas nativas fueron los siguientes:

Tratamientos	Número de esporas a los 70 días	Número de esporas a los 90 días	Número de esporas a los 120 días
Glomus sp.	50	75	110
Scutellospora sp.	70	90	120
Glomus sp. + Scutellospora sp.	90	110	140
Testigo	0	0	0

Tabla 4. Resultados del número de esporas por tratamientos

6.1. Densidad de las esporas en sustrato a nivel de invernadero

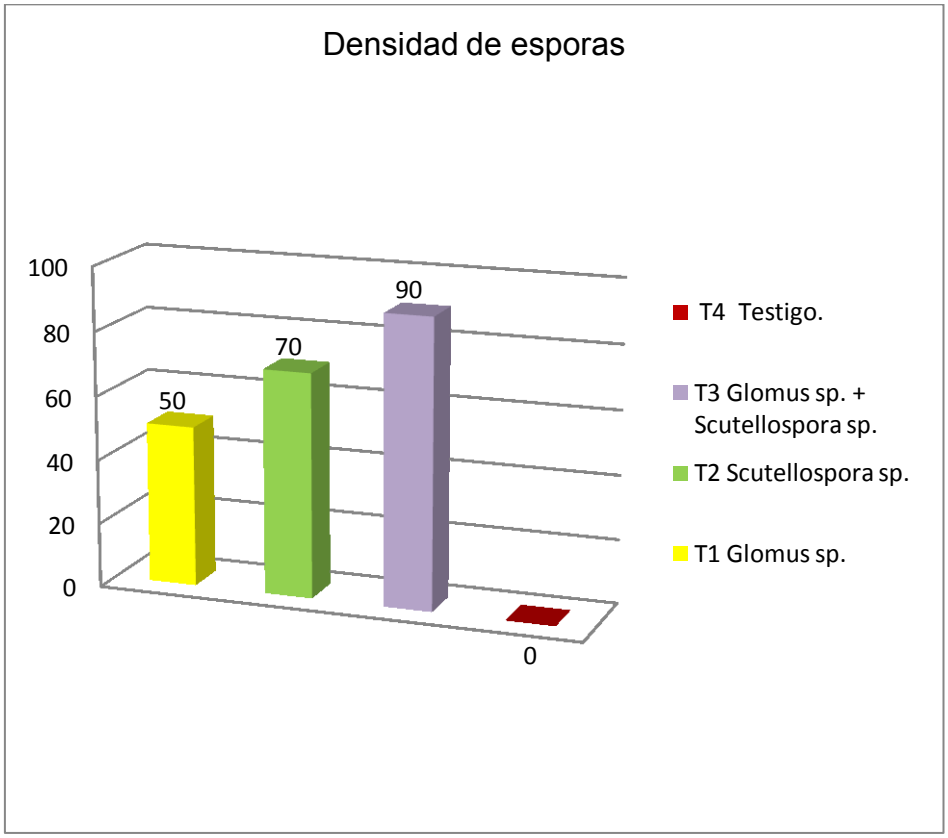


Gráfico № 1. Esporas por g/cm² a los 70 días

La primera evaluación se realizó a los 70 días obteniendo el siguiente número de esporas por 100 gramos de suelo seco: 50 esporas/100gr de suelo seco de la especie *Glomus sp., 70* esporas/100gr de suelo seco de la especie *Scutellospora sp.* y 90 esporas/100g de suelo seco en el tratamiento que contenía tanto *Scutellospora sp. + Glomus sp., y en* el testigo no hubo presencia de esporas por gramo de suelo seco (Gráfico №1).

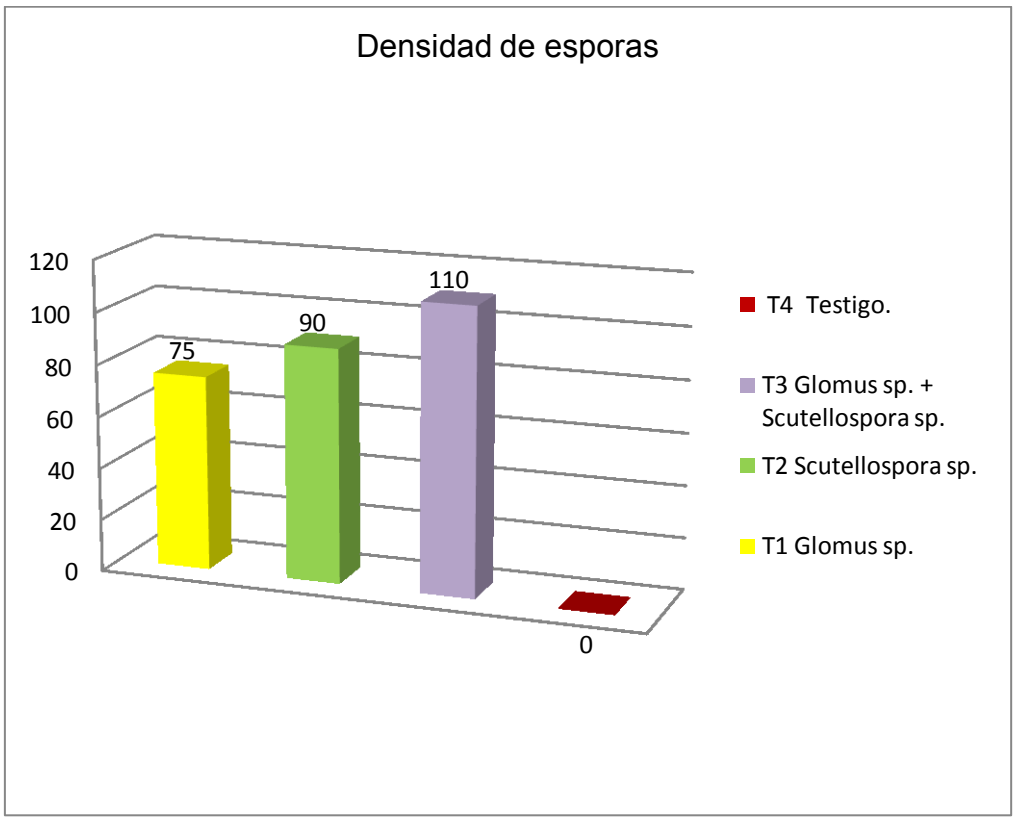


Gráfico № 2. Esporas por g/cm² a los 90 días

A los 90 dias se realizó la segunda evaluación, se obtuvo un notable incremento en los tres tratamientos: de 75 esporas/100g de suelo seco para *Glomus sp.,* 90 esporas/100gr de suelo seco para *Scutellospora sp*., 110 esporas/100gr de suelo seco en el tratamiento combinado de *Scutellospora sp. + Glomus sp.,* y el testigo no presentó esporas de ningún tipo (Gráfico №2).

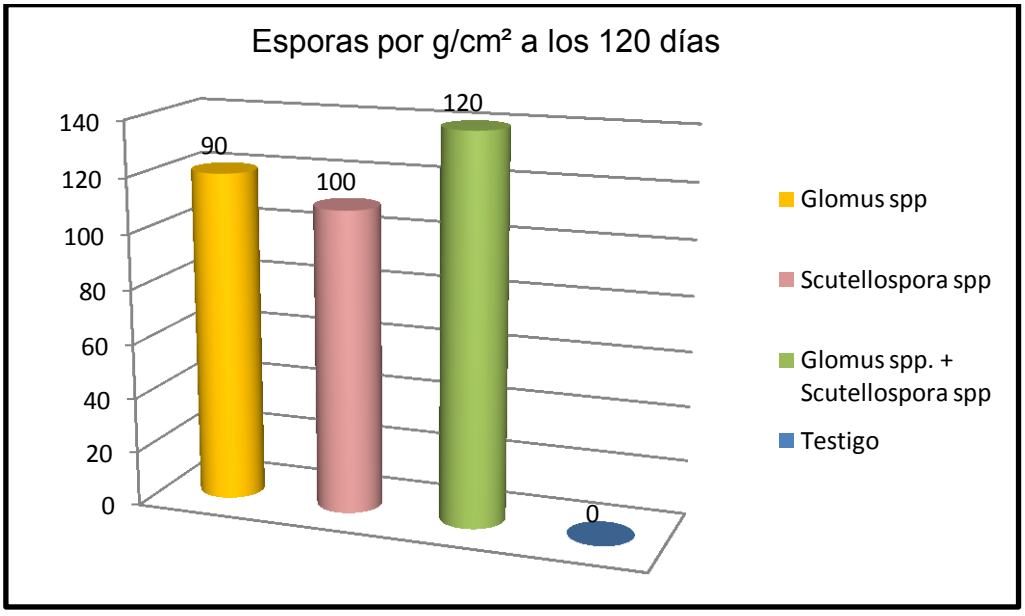


Gráfico № 3. Esporas por g/cm² a los 120 días

A los 120 días luego de someter a estrés hídrico por 2 semanas se realizó la última evaluación, *Glomus sp.* presentó 90 esporas/100g de suelo seco , *Scutellospora sp*. presentó 100 esporas/100g de suelo seco, el tratamiento combinado con *Scutellospora sp* más *Glomus sp.* presentó 120 esporas/100g , y el testigo no presentó ningún tipo de esporas (Gráfico №3).

A los 120 días las plantas que contenían la combinación de esporas de los géneros *Glomus sp.* y *Scutellospora sp.* reportaron la mayor altura llegando a 53 cm, le siguieron el tratamiento *Scutellospora sp*.con una altura de 44 cm , las plantas micorrizadas con *Scutellospora sp* seguido de *Glomus sp*, entre los días 70 y 90 no fue muy evidente su diferencia en altura entre los diferentes tratamientos, no obstante en los 120 días se reportó una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, finalmente las plantas no micorrizadas no presentaron alturas cercanas en comparación a las plantas micorrizadas. Los resultados de este trabajo son similares a los obtenidos (Prieto *et al,* 2011).

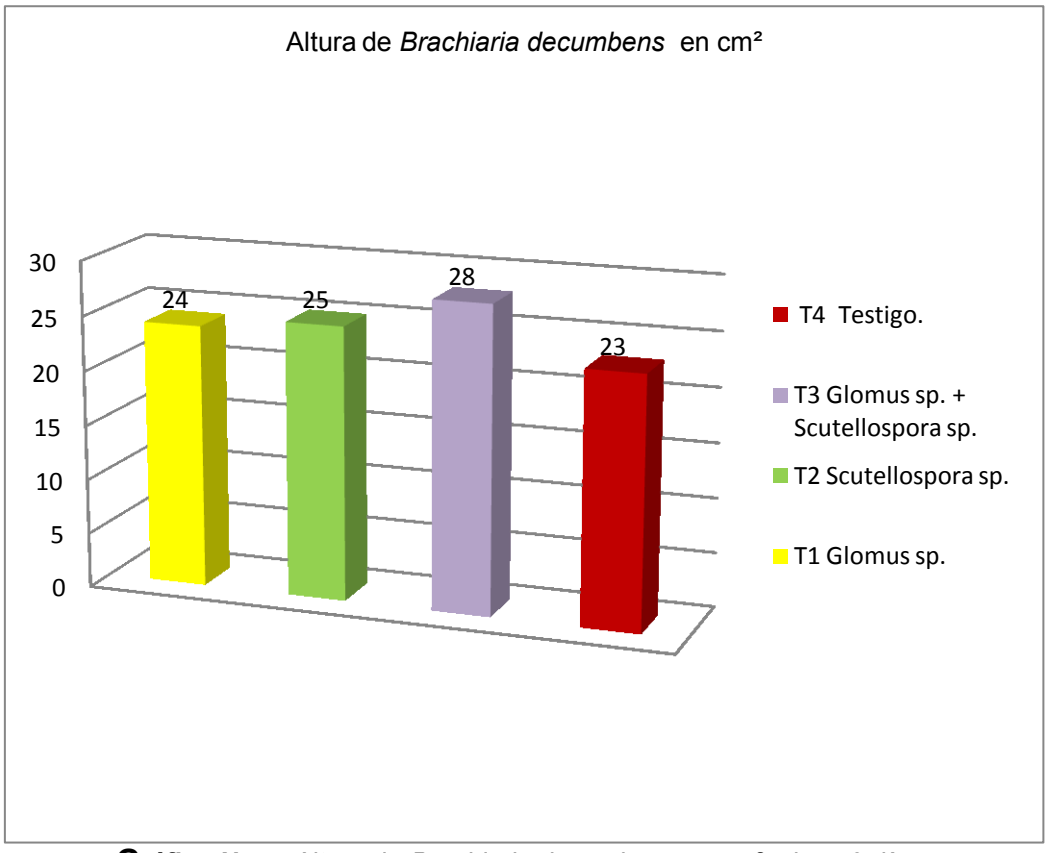


Gráfico № 4. Altura de *Brachiaria decumbens* en cm² a los 70 días.

La primera evaluación de la altura de las plantas de *Brachiaria decumbens* se realizó a los 70 días, encontrandose diferencias significativas de acuerdo al análisis estadístico de ANOVA (Gráfico № 4), en el tratamiento con *Glomus sp* se obtuvo una altura de 24 cm, en el tratamiento realizado con Scutellospora sp con 25 cm de altura en el tratamiento combinado *Glomus sp* más *Scutellospora* alcanzó los 38 cm de altura, mientras que el testigo llegó a los 23 cm de estatura.

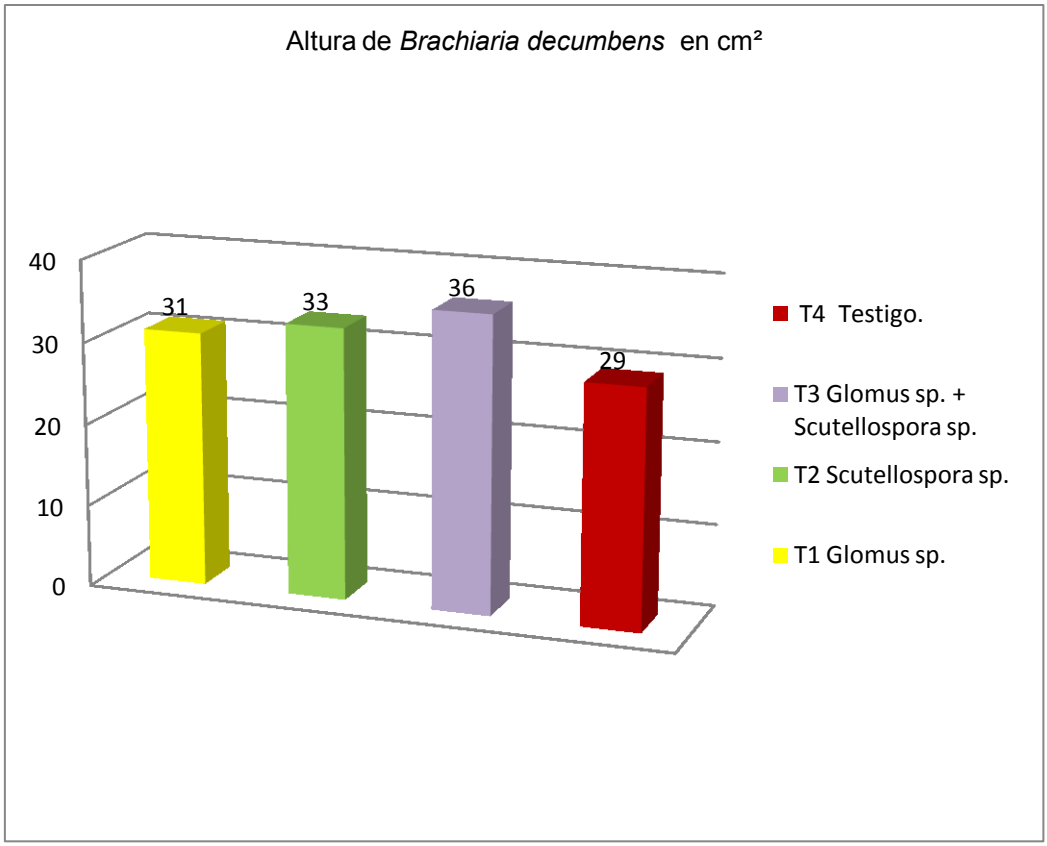


Gráfico № 5. Altura de *Brachiaria decumbens* en cm² a los 90 días

La segunda evaluación de la altura de las plantas de *Brachiaria decumbens* se realizó a los 90 días, encontrándose diferencias significativas de acuerdo al análisis estadístico de ANOVA (Gráfico №5).

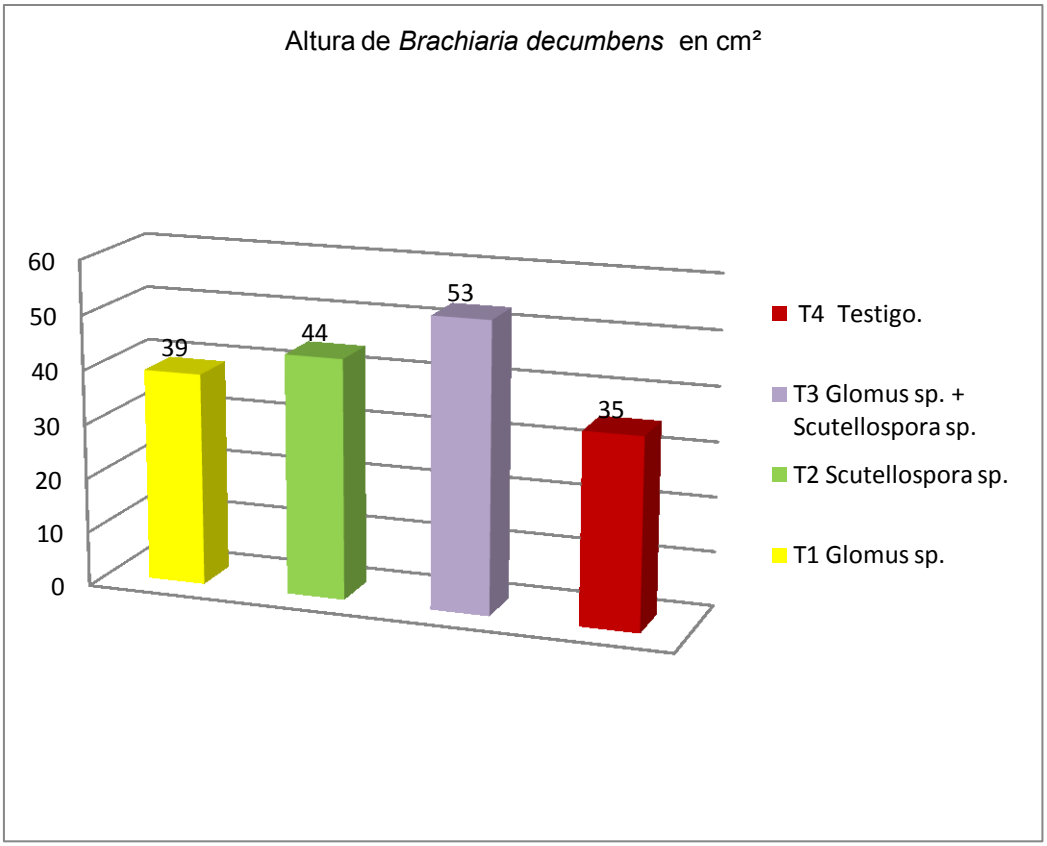


Gráfico № 6. Altura de *Brachiaria decumbens* en cm².a los 120 días

La última evaluación de la altura de las plantas de *Brachiaria decumbens* se realizó a los 120 días (Gráfico №6), previo a esta evaluación se sometió a estres hídrico para estimular la producción de esporas, encontrandose diferencias significativas de acuerdo al análisis estadístico de ANOVA.

6.2. Porcentaje de Colonización

En los resultados del analísis de colonización, el porcentaje de colonización radicular más abundante se encontró en el tratamiento combinado de *Scutellospora sp* con *Glomus sp*, por otra parte el porcentaje más bajo de colonización se encontró en el tratamiento que contenía el género de *Glomus sp*. La estructura de hongos micorrízicos más representativa durante el análisis de colonización fue de micelio en el sistema radicular de *Brachiaria decumbens* seguido de vesículas, e hifas micorrizadas, el porcentaje más bajo se presentó en arbusculos. En comparación con otros trabajos realizados en condiciones similares, se ha reportado mayores indices de colonización en los tratamiento a los cuales se les ha aplicado más de un género de esporas de hongos micorrízicos arbusculares, mostrando estos estudios mucha relación con este, al encontrarse que en tratamiento combinado de *Glomus sp*. y *Scutellospora sp.* la colonización presente los índices más altos (Gráfico № 7).

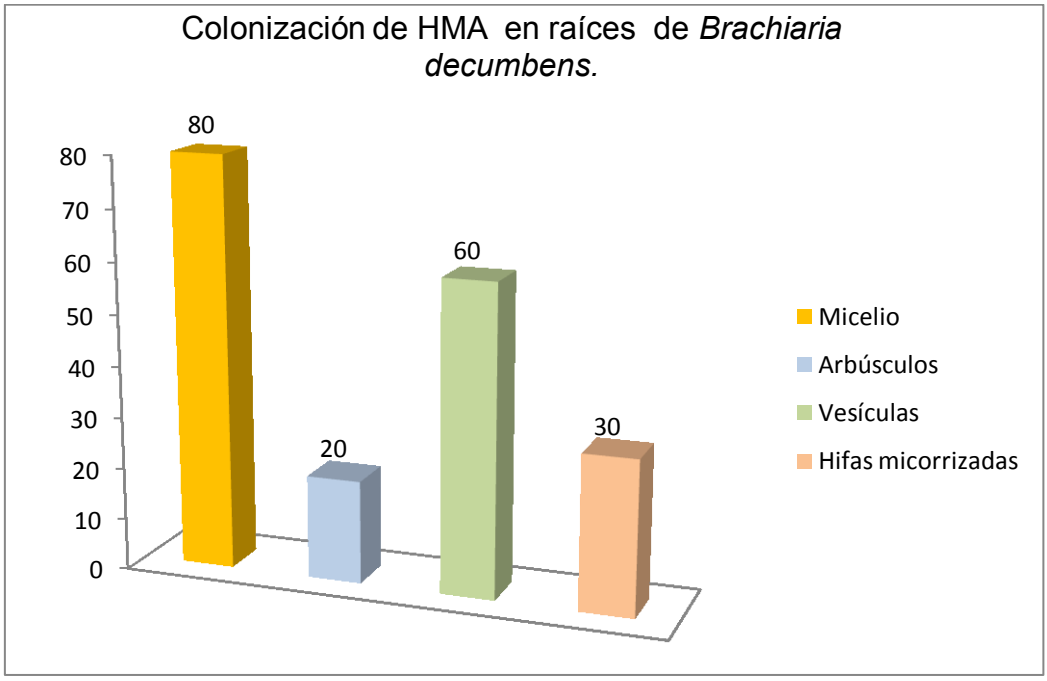


Gráfico № 7. Colonización de HMA en raíces de *Brachiaria decumbens*.

6.3. Peso húmedo del sistema foliar

El análisis estadístico ANOVA no mostró diferencias significativa a los 70 días (Gráfico №8), una ligera diferencia significativa se hizo presente en el análisis realizado a los 90 días (Gráfico №9), no obstante a los 120 días se obtuvo una notable difrencia entre las plantas micorrizadas y el control (Gráfico №10). Los tratamientos que fueron inoculados con hongos micorrízicos arbusculares HMA presentaron valores superiores al tratamiento control, este valor es comparable a los realizados por (Prieto *et al,* 2011) y (Gonzáles et al 2008). No así el trabajo realizado por (Sosa et al, 2006) inoculó en *Brachiaria decumbens* 20 esporas, 10 de *Acaulospora sp.* y 10 de *Glomus sp*. alcanzando promedios de peso seco del sistema foliar de 0.054 gr y 0.013gr por planta, para plantas micorrizadas y no micorrizadas respectivamente, las plantas control demostraron diferencias en su peso luego de los 70 días de inoculación. Plana *et al,* (2008) inocularon esporas de varios géneros en *Brachiaria decumbens* obteniendo resultados por encima de los alcanzados en este trabajo, cabe mencionar que las condiciones, el inóculo así como el sustrato, empleados en esta investigación fueron diferentes a los que utilizaron los investigadores del trabajo antes mencionado, factores a los cuales se pueden atribuir los resultados obtenidos, aunque es evidente y en concordancia con otros trabajos de investigación en esta área, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) influyen en el aumento de masa foliar tanto en peso húmedo como seco.

En este trabajo se realizó el peso húmedo en tres periodos, para obtener los valores se pesó 10 plantas por tratamiento, promediando las 10 plantas, se obtuvo los valores que se detallan a continuación:

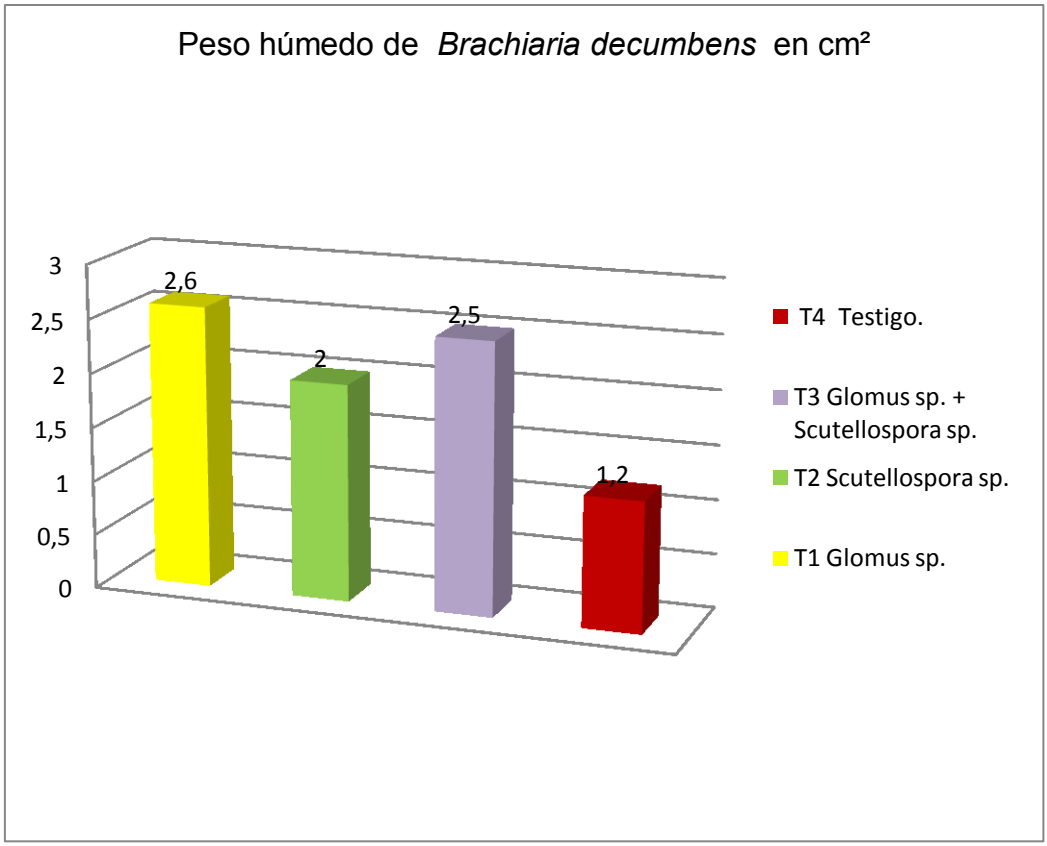


Gráfico № 8. Peso húmedo de *Brachiaria decumbens* a los 70 días.

El peso húmedo del sistema foliar se realizó a la par de la avaluación de las otras variables anteriormente descritas esto es tres veces la primera a los 70 días en los cuales se procedió a pesar 10 plantas por tratamiento y luego promediar, cuyo valor esta detallado en el gráfico (Nº8) en el cual se muestra a *Glomus sp* con 2.6 g, *Scutellospora sp* con 2 g, *Glomus sp* y *Scutellospora sp* llegaron un promedio de 2 g mientras el testigo llegó a 1.2 g.

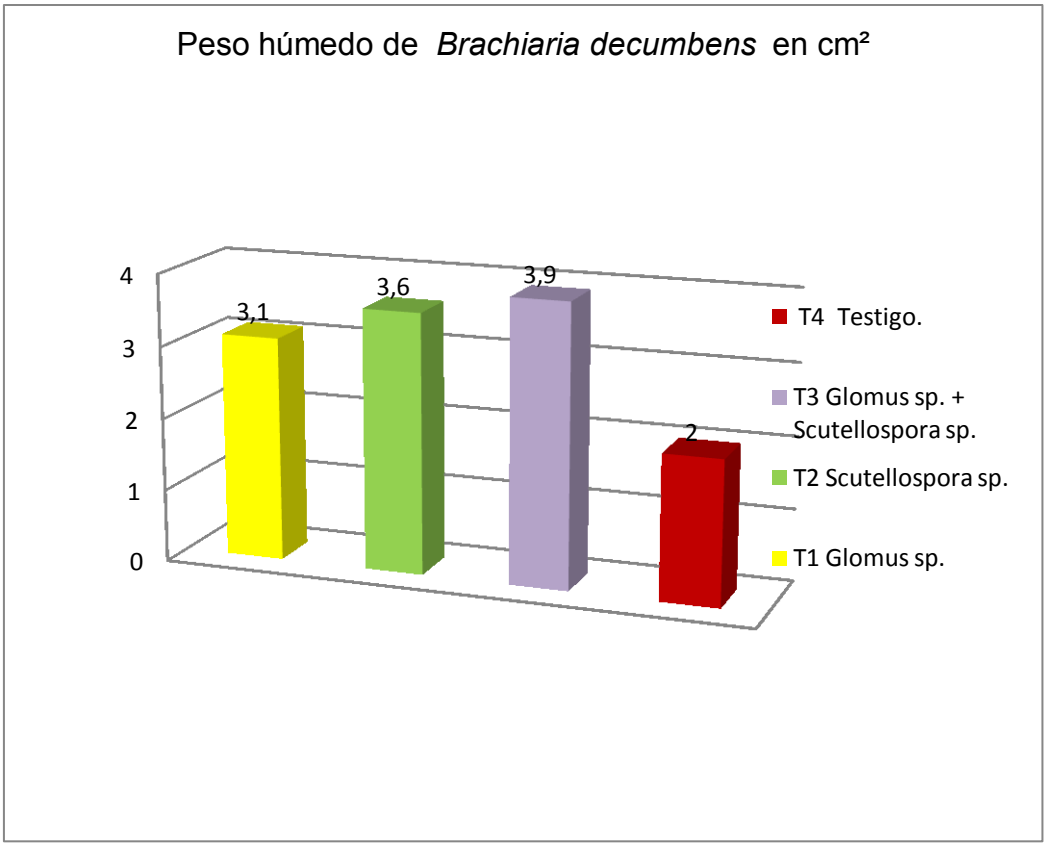


Gráfico № 9. Peso húmedo de *Brachiaria decumbens* a los 90 días.

La segunda evaluación del peso húmedo del sistema foliar se realizó a los 90 días en los cuales se procedió a pesar 10 plantas por tratamiento y luego promediar, cuyo valor está detallado en el gráfico en el cual se muestra al género *Glomus sp* con 3.1 g, *Scutellospora sp* con 3.6 g, *Glomus sp* mas *Scutellospora sp* llegaron un promedio de 3.9 g mientras el testigo llegó a 2.0 g.

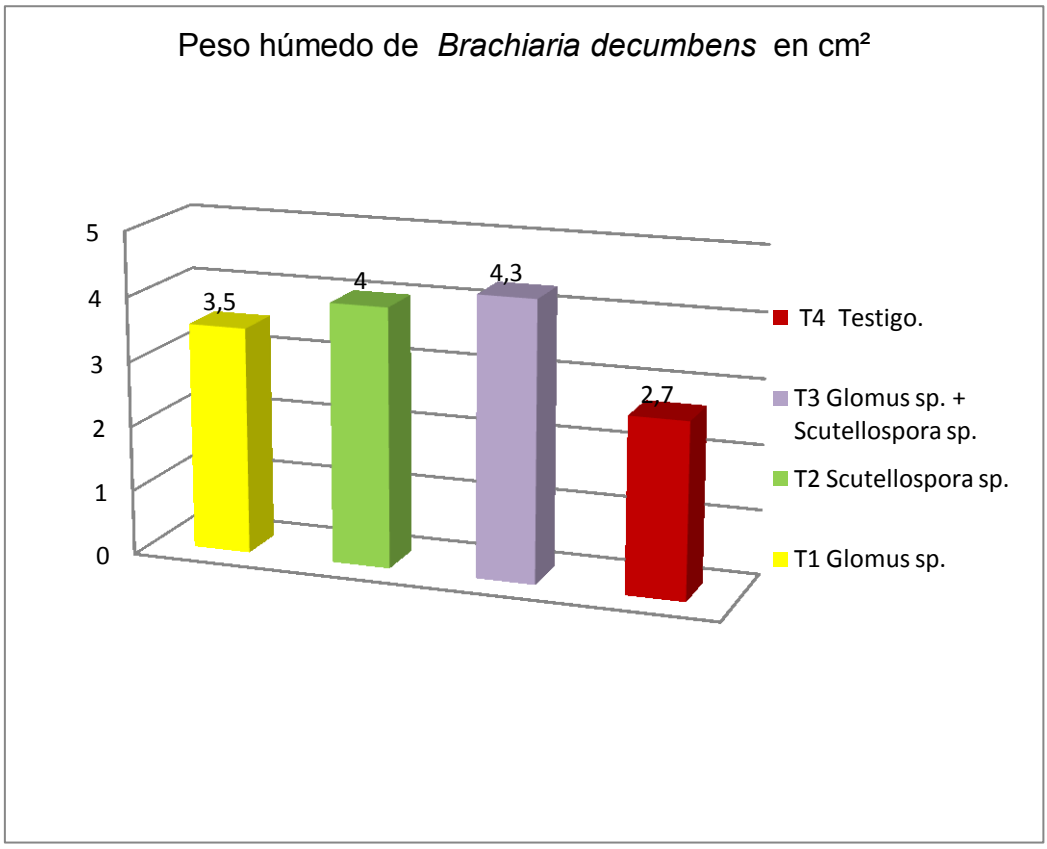


Gráfico № 10. Peso húmedo de *Brachiaria decumbens* a los 120 días

La última evaluación del peso húmedo del sistema foliar se realizó a los 120 días en los cuales se procedió a pesar 10 plantas por tratamiento y luego promediar, cuyo valor esta detallado en el gráfico en el cual se muestra a *Glomus sp* con 3.5 g, *Scutellospora sp* con 4 g, *Glomus sp* y *Scutellospora sp* llegaron un promedio de 4.3 siendo este valor el más elevado en los 4 g tratamientos mientras el testigo llegó a 2.7 g.

6.4. Descripción de *Scutellospora sp*

Estas esporas poseen un color café con variantes en su tonalidad que va de oscuro cobre a pálido, llegando a tener una tonalidad café crema en algunos casos tiene una forma globosa o subglobosa su tamaño oscila entre 240 a 360 µm, posee 2 capas, una externa que suele estar permanentemente rígida de color amarillo marrón oscuro y la capa interna naranja-marrón. Con PVLC la espora toma un color amarillo marrón, con el reactivo de Melzer la espora se torna de un color rojo al marrón (Gráfico №11). Poseen un escudo de germinación con apariencia rugosa, la cual es visible cuando la espora se encuentra intacta (Tejena, 2012).

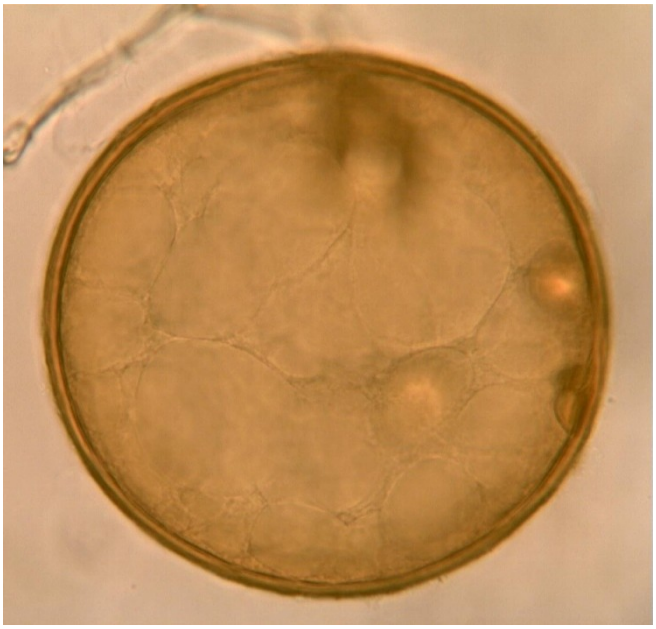


Figura № 27. Espora del género *Scutellospora sp.*

6.5. Descripción *Glomus sp*

Las esporas van de amarillo hialino a naranja: Son de gran tamaño, pueden ser globosas, subglobosas y a veces ovoide, su tamaño oscila entre los 100 y 240 µm de diámetro. Posee cuatro capas naranjas, amarillas y oscuras con una pared membranosa o laminada, con la capa más interna ligeramente oscura de donde nace un tubo germinativo. Con PVLC la espora mantiene su color amarillo hialino, con el reactivo de Melzer se torna de un color hialino naranja-oscuro (Gráfico №12). El tubo germinativo nace de la capa más interna de la espora (Tejena, 2012)

Figura № 28. Espora del género *Glomus sp*

7. DISCUSIÓN

En la naturaleza se da una fascinante simbiosis micorrízica entre la mayoría de las especies de importancia económica y algunos hongos edáficos. En un conteo previo a la inoculación de las esporas que se encontraron en las muestras de suelo extraídas de la rizósfera de los cultivos soya, maíz, banano, piñón y plantas nativas, se obtuvo mayor cantidad de esporas pertenecientes al género *Glomus sp.*las cuales en simbiosis con *Brachiaria decumbens* han tenido el menor porcentaje tanto en reproducción como en efectividad en las plantas inoculadas así como menor número de esporas con un promedio de 0.9 esporas por gramo de suelo. Este resultado difiere de los obtenidos por Harley & Smith (1983); Gianinazzi & Gianinazzi (1983) y Sieverding (1991). Sin embargo aún siendo una cepa de alta efectividad la misma actuará eficientemente solo en un grupo de suelos que puede ser amplio o no, dependiendo de la cepa en cuestión (Rivera *et al,* 2003).

Los hongos micorrízico arbusculares estimulan el crecimiento del sistema radical y densidad radical en especial el género *Glomus sp.* este género se reproduce con mayor rapidez que *Scutellospora sp* desarrolla mayor cantidad de hifas, incrementando su capacidad de infección (Irrazabal *et al,* 2005); el sistema extrarradical ha demostrado ser capaz de captar eficientemente todos los nutrientes (George *et al,* 1995) en especial del fósforo (Jakobsen, 1995) nitrógeno (Johansen *et al*, 1993) y (Tobar *et al,* 1994) y algunos micronutrientes esenciales para la planta (George *et al,* 1995). Lo especificado anteriormente explicaría el notable incremento de infección, efectividad y número de esporas por gramo de suelo, con un número de 120 esporas por 100 gramos de suelo en la combinación de *Glomus sp* más *Scutellospora sp.* además la efectividad de dichos hongos también es estimulada cuando se combinan varias cepas de hongos micorrízico arbusculares es la regla y no la excepción. Los hongos micorrízicos son tan antiguos como las plantas (400 millones de años) y ambos han ido evolucionando de forma conjunta hasta nuestros días. Lo que se pretende es definir un lineamiento para poseer a futuro un

manejo efectivo, así como las vías para su inserción con las prácticas agrícolas en los diferentes sistemas productivos; sistemas que se basan en el modelo biológico de las plantas micorrizadas correctamente, donde la simbiosis actúe sobre los beneficios de los nutrientes, el agua, el crecimiento y vigor de las plantas, hasta el propio rendimiento sea un elemento constitutivo en la sostenibilidad agrícola.

8. CONCLUSIONES.

En este estudio se logró aislar 2 géneros provenientes de 4 diferentes cultivos; maíz, soya, piñon, banano y de flora nativa, no encontrándose diferencias en cuanto a número de esporas por gramo de suelo, así como de géneros, con un valor de 40 y 30 esporas por cada 100 gramos de suelo húmedo, sin embargo en condiciones de invernadero se incrementó el número de esporas. No fue posible aislar más géneros de hongos micorrízico arbusculares por la baja cantidad de esporas, teniendo en consideración que el número mínimo de esporas por maceta fue de 10, además muchas esporas encontradas en el análisis de suelo no eran viables para realizar la inoculación. Quizá esto se deba a una particularidad del suelo, típico de los ambientes desérticos, en concordancia con algunos autores, poseen un potencial de inóculo de hongos micorrízicos arbusculares bajo y constituido la mayor parte por fragmentos hifales de esporas, las cuales están localizados en las capas más superficiales: *Glomus sp.* fue el género más observado dentro de los análisis de suelo 40 esporas por 100 g de suelo.

La estacionalidad ambiental es un factor determinante en la composición y variación de la población de hongos micorrízico arbusculares. Es este aspecto, la respuesta a la variabilidad de la colonización radical y la esporulación de los hongos micorrízico arbusculares.

En cuanto al análisis de los datos, con el objetivo de verificar el grado de influencia del consorcio de inóculo de hongos micorrízico arbusculares con el método estadístico de ANOVA, para probar la hipótesis nula en las plantas de *Brachiaria decumbens* inoculadas, obtuvieron mayor altura y peso tanto en materia seca como húmeda en relación con las no micorrizadas con *Glomus sp Scutellospora sp., y Glomus sp.* con *Scutellospora sp., el* valor obtenido (F=6.696,p=2,92) de esto podemos observar que 2,92 es menor que 6,696 por lo tanto se acepta la hipótesis nula, se concluye que el consorcio de hongos micorrízicos arbusculares influyó significativamente en las plantas de *Bra-*

chiaria decumbens debido a que se obtuvieron mayores valores en altura y peso de materia húmeda.

La eficiencia de hongos micorrízicos arbusculares en la infección radicular y su contribución para mejorara la calidad de las plantas de *Brachiaria decumbens* demuestran los beneficios fisiológicos y ecológicos ejercidos por microorganismos.

9. RECOMENDACIONES

Es importante realizar más estudios en la microbiota del suelo, hay géneros de hongos micorrízicos arbusculares que realizan simbiosis con un solo género de plantas las cuales están desapareciendo por efectos de deforestación. Debido a que son organismos vivos simbióticos para reproducirse necesitan realizar simbiosis con un organismo vegetal, para continuar con su ciclo de vida, se corre el riesgo de perder un potencial de inóculo muy importante para la salud de los ecosistemas.

Multiplicar los hongos micorrízicos arbusculares usando suelo que provenga del lugar a realizarse la inoculación del cultivo. Ecuador al ser un país con numerosas variables en cuanto al tipo y estructura de suelos, es más imperativo la necesidad de poseer un banco de germoplasma para multiplicar hongos micorrízicos arbusculares procedentes de diversas zonas.

Usar algunas plantas trampas para garantizar la mayor multiplicación posible de HMA debido a que estos no poseen una alta afinidad al momento de infectar a una planta, pero al tener algunas especies se tiene más probabilidades de obtener una buena infección.

Establecer cultivos monoespóricos con el fin de evaluar la multiplicación, inefectividad y efectividad de cada uno de los géneros individualmente. Mediante este procedimiento se garantiza que el HMA aislado e inoculado posteriormente en nuevas plantas, será de un mismo género y especie.

Evaluar los diversos factores que pueden interferir en el proceso de micorrización en condiciones naturales, estableciendo la habilidad competitiva y estudiando su efectividad en las plantas comerciales.

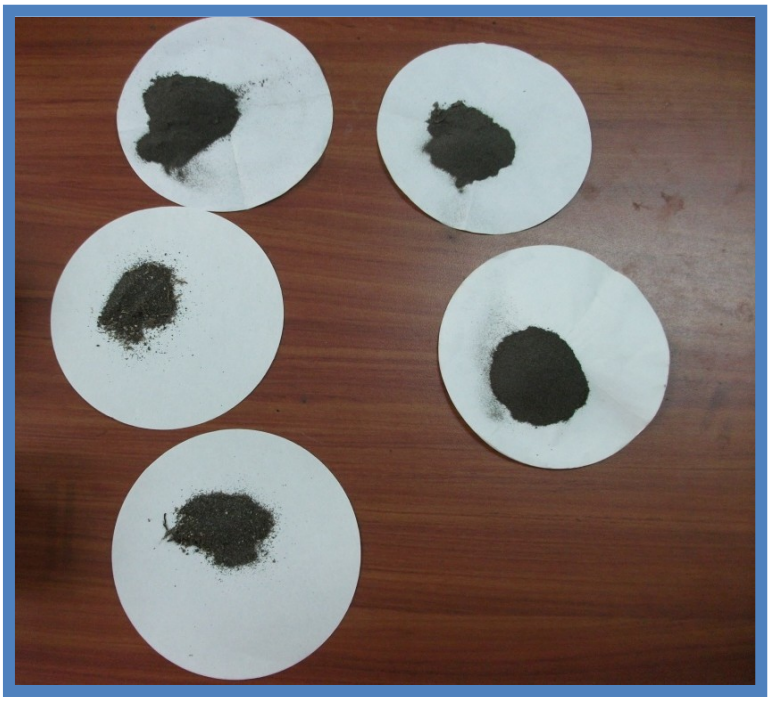
Divulgar este potencial y hacerla accesible para los pequeños y medianos agricultores, un limitante en la actualidad a más de la falta de estudios consensuados en HMA es el costo elevado de producir un inóculo comercial.

10. ANEXOS

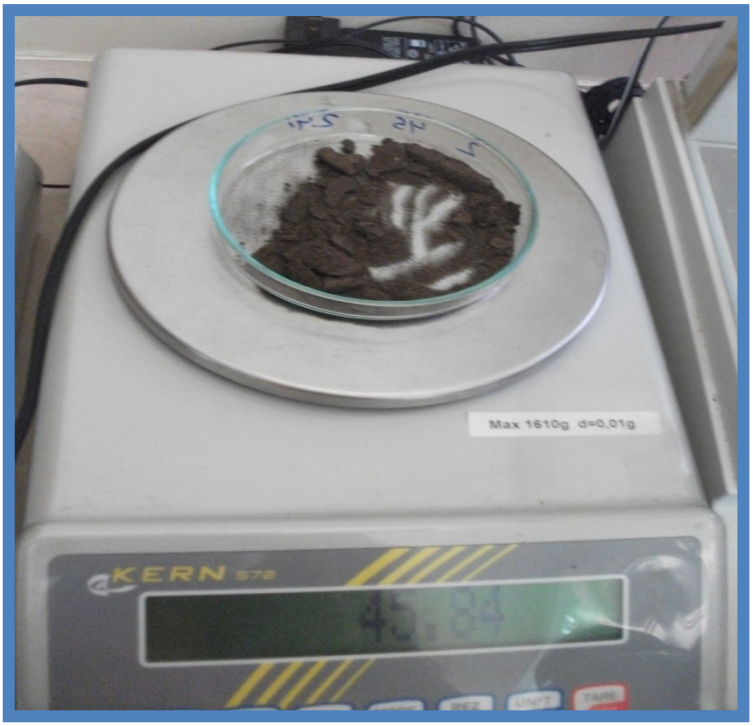
***Brachiaria decumbens* inoculadas con HMA**

***Brachiaria decumbens* inoculadas con HMA**

Plantas de *Brachiaria decumbens.*



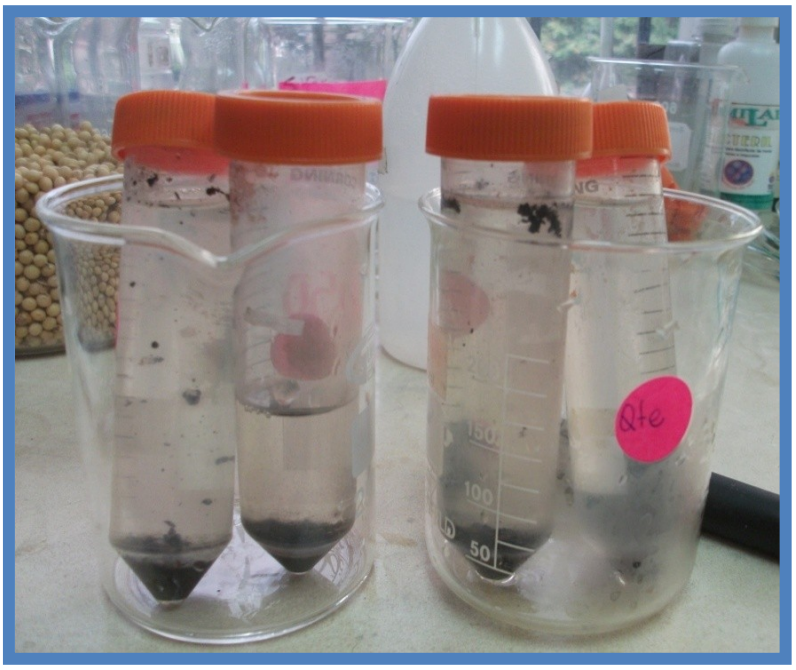
Secado del suelo micorrizado y tamizado



Pesaje del suelo en seco

Centrifugación de las muestras de suelo

Centrifuga



Muestra de suelo luego de la centrifugación

Laminas con raicillas de *Brachiaria decumbens*

11. BIBLIOGRAFÍA

Abbott, L. & Robson, A. 1982. The role of vesicular-arbuscular micorrizal fungi in agriculture and selection of fungi for inoculation. Aust. J. Bot. 30: 585-499.

Abbott, L. & Robson, A.1985. The effect of soil pH on the formation of VA micorrhizas by two species of Glomus. Australian Journal of Soil. Research. 23: 253-261.

Alexander, T. 1988. Dinamics of arbuscule, development and dege-neration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. New Phytol. 110, 351- 355.

Alvarado, A.; Arriojas, L.; Chacón, E.; Rodriguez, S. & Chacin, F.1990. Estudios sobre henificación de pasto barrera *Brachiaria decumbens* en condiciones de sabana del piedemonte Barinas; producción y valor nutritivo de la materia seca. Zootecnia tropical. 8: 17-36.

Allen, M. 1991. The ecology of mycorrhizae. Cambridge University Press, Cambridge UK. 196 p.

Azcón, G. & Barea, J. 1980. Micorrizas. Investigacion y Ciencia 47: 8- 16.
Azcón, C.; Jaizme, M. & Calvet, C. 2002. The contribution of arbúscular mycorrhizal fungi to the control of soil borne plant pathogens. Mycorrhiza technology in agriculture: from genes to bioproducts. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag, p.187–198.

Bago, B.; Pferfer, P. & Shachar-Hill, Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. Plant Physiology 124: 949-958.

Bago, B.; Azcon, C.; Goulet, A. & Piche, Y. 1998. Branched absorbing structures (BAS): A feature of the extra radical mycelium of symbiotic arbuscular fungi. New Phytology 139: 375-388.

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

Becard, G. & Fortin J. 1988. Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri –DNA transformed roots. New Phytol. 108:211-218.

Barea, J. 1998. Biología de la rizósfera. Investigación y Ciencia. Scientific American 256: 74-81.

Barea, J.; Azcón, R. & Azcón, C. 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. Antonie van Leeuwenhoek 81: 343–351.

Bethlenfalvay, G. J. & Linderman J. 1992. Mycorrhizae and crop productivity. Horticultural Crops Research Laboratory. USDA – ARS. pp:1 – 27.

Bolan, N. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. En: Plant and Soil. Vol. 134 p: 189 – 293.

P. Bonfante-Fasolo, & Fontana, P. 1985. VAM fungi in *Ginkgo biloba* roots-thier association at the cellular level. Symbiosis 1:53-67.

Bonfante - Fasolo.1988. The role of the cell wall as a signal in mycorrhizal associations. Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. p. 219-235.

Bonfante –Fasolo, P. & Perotto, S.1995. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. New Phytol. 130:3–21.

Combatt, E.; Martínez, Z. & Palencia, M. 2008. Generación de acidez por oxidación de pirita en suelos sulfatados ácidos interiores de clima cálido. Temas agrarios. 13(1):32-39.

Cuenca, G.; Andrade, Z.; Lovera, M.; Fajardo, L.; Meneses, E. Marques, M. & Machuca, R. 2003. Preselección de plantas nativas y producción de inóculos de hongos micorrízico arbusculares (HMA) de relevancia en la rehabilitación de áreas degradadas de la Gran Sabana, estado Bolívar, Venezuela. Ecotrópicos (Venezuela) 16: 27-40.

Dávila, L., Ramos, C. & Rosales, C. 2009. Multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares MA nativos de cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) en maíz (*Zea mays*) bajo distintos tratamientos agronómicos. pp 97; Universidad Popular del Cesar. Facultad de Ciencias Básicas Naturales y Educación. Licenciatura en Ciencias Naturales y Educación Ambiental. Valledupar.

Deaft, M. & Nicolson,T. 1966. Efect and endogone mycorrhiza on plant growth. New Pythol. 65:343 -350.

Dodd, J.C. & Thompson, B. D. 1994. The screening and selection of inoculant arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. pages 149-158, In: Robson, A.D., Abott, L.K. and Malajczuk, N. (Editors).

Duchicela, J. & González, M. 2003. La micorriza arbuscular en el contexto de la agricultura sustentable. Monografía CEINCI-02-03.19p.

Elliot, E.T. & Coleman, D.C. 1988. Let the soil work for us. Ecology Bulletin, 39: 23-32.

Escobar, C.; Zuluaga, J.; Colorado, G. & Páez, D. 1998. Micorriza Vesí-culo Arbúscular (MVA) Recurso microbiológico para desarrollar una agricultura sostenible. Corpoica-Tibaitatá – Pronata. Bogotá. pp: 49-60.

Fernández, F.1999. Manejo de las asociaciones micorrízicoarbusculares (MA) sobre la producción de posturas de cafetos (*C.arabica*L.) en algunos tipos de suelos. Tesis de Doctorado, INCA, La Habana, 118 pp.

Fergunson, J. & Woodhead, H.1982. Production of endomycorrhizal inoculum. A increase and maintenance of vesicular arbúscular mycorrhiza fungi. In Methods and principles of mycorrhizal research Ed. By N.C. Schench USA American Phytopathological Society. Vol; 2: pp: 47-53.

Fitter, A. H. & Garbaye, Y. 1994. Interactions between micorrhizal fungi and others soil organism. Plant and Soil. 159: 123 - 132.

Friese, C. & Allen, M. 1991. The spread of VA mycorrhizal fungal hy-phae in the soil: Inoculum types and external hyphal architecture. Mycologia 83:409-418.

Garrido, N. 1988. Mykorrhizen in den Nothofagus-Waldern Mittelchiles. Bibliotheca Mycologica, ,vol. 120, p. 1-258.

García-Garrido, J. & Ocampo, J. 2002. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. J. Exp. Bot. 53:1377–1386.

George, E.; Marchner, H. & Jakobsen, I. 1995. Role of AM fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. Crit. Rev. Biotechnol. 15: 270 pp.

Gerdeman, J. & Trappe, M. 1974. The endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycologia Memoir. The New York Botanical Garden 5: 1-76

Giovannetti, M.; Sbrana, C.; Avio, L.; Citernesi, A. & Logi, C.1993. Diffe-rential hyphal morphogenesis in arbúscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. New Phytol.vol 12, pp: 587–593.

Gianinazzi- Pearson,V. & Gianinazzi, S. 1983. The physiology of vesicular-arbúscular rmycorrhizal roots. Plant and Soil, 7: 19-29.

Guerrero, E.; Rivillas, C. & Rivera, E. 1996. Perspectivas de manejo de la micorriza arbuscular en ecosistemas tropicales. En Guerrero E. (Ed.), Micorrizas. Recurso Biológico del suelo. Fondo FEN Colombia, Bogotá; p.181-201.

Harley, J. &. Smith, S.1983. Mycorrhizal simbiosis. Academic Press, London. pp. 438-443.

Hamel, C. 1996. Prospects and problems pertaining to the management of arbuscular mycorrhizae in agriculture. Agric. Ecos. Env. 60: 197-210.

Harrier, L. 2001. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: a molecular review of the fungal dimension. Journal of Experimental Botany. Vol. 52; p. 469-478.

Habte, M. & Manjunath, A.1987. Soil solution phosphorus status and mycorrhizal dependency in *Leucaena leucocephala.* Applied and Environmental Microbiology 53: 797-801.

Habte, M. & Osorio, N. 2001. Arbuscular mycorrhizas: producing and applying arbúscular mycorrhizal inoculum. CTAHR, College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii. P: 2-47.

Irrazabal, G.; Schalamuk, S.; Velázquez, M. & Cabello, M. 2005. Espe-cies de hongos formadores de Micorrizas Arbusculares: nuevas citas para la República Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. vol. 40, pp: 17-22.

Jakobsen, I. 1995. Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotech-nology. Springer-Verlag, Berlín, Alemania.pp:297–324.

Jeffries, P. S.; Gianinazzi, S.; Perotto, K.; Turnau, K. & Barea, J. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable main-tenance of plant health and soil fertility. Biology and Fertility of Soils 37:1-16.

Jeffries, P. & Barea, J. 2001. Arbuscular micorrhiza, a key component of sustainable plant soil ecosystems. The Mycota IX. Fungal associa-tions. Hock Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp 95-113.

Johansen, A.; Jakobsen, I. & Jensen, E 1993. Hyphal transport by a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate. Biol. Fertil. Soil.16: 66-70.

Jolicoeur, M.; Germenette*, S.;* Gaudette, M.; Perrier, M.; Bécard, G.1998. Intracellular pH in arbuscular mycorrhizal.Plant Physiol.116: 1279-1288.

Koide, R. & Mosse, B. 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. Mycorrhiza 14, p. 145–163.

Lorelí, M. & Ortega, E. 2008. Comunidad microbiana asociada a los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA). Cultivos Tropicales, vol. 29, Nº. 4, p. 13-20.

Montaño, N.; Camargo-Ricalde, S.; García-Sánchez, R.; Moroy, A. 2007. Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos Instituto Nacional de Ecología-Semarnat, Mundi-Prensa SA de CV, UAM, Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM. Distrito Federal, México. 460 pp.

Molina, L.; Mahecha, M. & Medina, M. 2005. Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. Rev. Col. Cienc. Pec. 18: 162-175.

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

Mosse, B. 1959. Observations on the extramatrical mycelium of a vesicular arbúscular endophyte. Trans Br Mycol Soc 42:439–448.

Mosse, B. & Bowen, G. 1968. The distribution of Endogone spores in some Australian and New Zeland soils, and in an experimental field soil at rot hamsted. Trans. Br. Mycol. Soc. 51: 485-492.

Nishimura, R.; Hayashi, M.; Wu, G.; Kouchi, H.; Imaizumi, H.; Murai, Y.; Kawasaki, S.; Akao, S.; Ohmori, M.; Nagasawa, M.; Harada, K.; Kawaguchi, M. 2002. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. Nature 420:426-429.

Olivera, Y. 2006. Caracterización y selección de accesiones en una colección de *Brachiaria.* Pasturas Tropicales. 29(3):55

Peterson, R. & Bonfante, P. 1994. Comparable structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. Plant Soil 159:79-88.

Pearson, V. & Read, D. 1975. The physiology of the mycorrhizal endo-phyte of *Calluna vulgaris*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 64: 1-7.

Phillips, J. & Hayman, D.1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbúscular mycorrhizal fungi for rapid as-

sessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55: 158-161.

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

Rivera, R.; Fernández, F.; Hernández, A.; Martín, J. & Fernández, K. 2003. Bases científico - técnicas para el manejo de los sistemas agrícolas micorrizados eficientemente. In: Rivera, R. y Fernández, K. Eds. Manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: el Caribe. INCA. La Habana. 166 p.75-90.

Ruiz-Lozano, J. 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress: new perspectives for molecular studies. Mycorrhiza.13: 309–317.

Sánchez, M. 1999. Endomicorrizas y Agroecosistemas. En: XVII Con-greso de Fitopatología y Ciencias afines. ASCOLFI. Pineda, L.B. ed. CIAT. Palmira. p.81-92

Sanchez, M. 2007. Las Micorrizas: Estrategia Compartida para Colonizar el Suelo. En Sanchez, M. editores. Las endomicorrizas: Expresión bioedáfica de Importancia en el Trópico. Palmira. Universidad Nacional de Colombia; p. 115-175.

Sanchez, C.; Caballero, D.; Rivera, R. & Cupull, R. 2006. Respuesta de cepas de hongos micorrizógenos HMA sobre el desarrollo de posturas de cafeto. I parte. Suelo pardo gleyzoso. Centro Agrícola. vol.33, Nº.1:p 33-38.

Schachtman, D.; Reid, R. & Ayling, S.M. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. Plant Physiology. Vol. 116; p. 447-453.

Schenck, N. & Perez, Y. 1990. Manual for Identificacion of VA Micorrhi-zal fungi. INVAM University of Florida, Gaisville. USA, 241 pp.

Shüßler, A. & Walker, Ch. 2010. The Glomeromycota: species list with new familie and new genera. http: // www. lz. De /~ schuessler / amphylo /species_infos/higher/funneliformis_claroideoglomus_rhizophagus_redecker a.pdf.

Smith, E. & Read, J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London. 605 pp.

St. John, T.; Coleman, D. & Reid, C. 1983. Association of vesicular-arbuscular mycorrhizal hyphae with soil organic particles. Ecology 64: 957-959.

Strullo, D. 1978. Cytologie des endomycorrhizes. Physiologie Vegétale 16: 657-669.

Sieverding, E. 1984. Aspectos básicos de la investigación de la micorriza vesiculo arbuscular (MVA). Primer Curso Nacional sobre Micorrizas. Facultad de Ciencias Agropecuarias-Palmira. Memórias. p. 86-87.

Sieverding, E. 1991. Vesicular–Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. Technical Cooperation.Federal Republic of Germany.Eschborn. Scriftenreihe der GTZ. No. 224: 371.

Sosa, T; J. Sánchez, Morales, E. & Cruz, J. 2006. Interacción Micorrizas Arbusculares *Trichoderma harzianum* (Moniliaceae) y efectos sobre el crecimiento de *Brachiaria decumbens* (Poaceae). Acta Biológica Colombiana 11(1): 43-54.

Solaiman,M. & Hirata, H .1995. Effects of indigenous arbuscular myco-rrizal fungi on rice growth and N,P,K nutrition under different water regimes. Soil Sci. Plant Nutr.vol. 41, Nº. 3, p. 505-514.

Tejeda, T.; Soto, F. & Guerrero, G. 1998. Utilización de algunas va-riantes de infección micorrízica como alternativas nutricionales en la obtención de posturas de cafeto mediante vías orgánicas. Cultivos Tropicales, vol. 19, Nº. 1, p.115.

Tejena, J. 2012. Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en la Finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, cantón Santa Elena. (Tesis de grado). Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales, Guayaquil. 90 pp.

Tobar, R.; Azcón, R. & Barea, J. 1994. Improved nitrogen uptake and trans-port from 15N-labelled nitrate by external hyphae of arbúscular mycorrhizal under water-stressed conditions. New Phytologist, 126: 119-122.

Trappe, M. 1987. Phylogenetic and ecological aspects of mycotrophy in the angiosperm from an evolutionary standpoint. Safir, G. R. Ecophy-siology of VA Mycorrhizal plants. CRC, Boca Raton, Florida. Pp. 5-25.

Van der Heijden, M. & Sanders, I. 2002. Mycorrhizal Ecology. Ecologycal Studies, Vol. 157. pp. 441-456 Springer – Verlag Berlin - Heidelberg, Ger-many.

Van der Heijden, M. & Sanders, I. 2002. Mycorrhizal ecology: synthesis and perspectives. pp. 441-456 in van der Heijden M.G.A., Sanders I.R. (eds.) Mycorrhizal ecology. Ecological Studies 157. Springer-Verlag, Heidelberg

Van Tichelen, K.; Colpaert, J. & Vangronsveld, J. 2001. Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* agains copper toxity. New Phytologist 150, (1): 203-213.

Walker, C.1992. Systematic and taxonomy of the arbúscular endomycorrhizal fungi *Glomales* a possible way forward. Agronomie12: 887-897.

Paginas webs consultadas

INVAM (International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi). 2009. Identification to Genus http://invam-.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/genuskey.htm.

www.revista.unal.e.du.co/index.php/.../24803
http://www.lrrd.org/lrrd18/2/moli18026.htm
http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_Inoculaci%C3%B3n%20Brachiaria.pdf
http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3503/1/T-ESPE-031212.pdf
http://www.ecured.cu/index.php/Brachiaria_decumbens
http://payfo.ihatuey.cu/Revista/v29n1/pdf/pyf01106.pdf
http://payfo.ihatuey.cu/Revista/v29n1/pdf/pyf01106.pdf