



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE PLANTAS DE AVENA
(*Avena sativa*) Y DE LA MICROBIOTA DEL SUELO TRATADO
CON HONGOS MICORRÍDICOS Y AJO (*Allium sativum*), EN
LOS PRIMEROS MESES DE CULTIVO.**

AUTORA: HERNÁNDEZ ENDARA, NATHALY KATHERINE

DIRECTORA: DRA. MEDINA COCINERO, MARÍA EMILIA

SANGOLQUÍ

2017



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “Evaluación del desarrollo de plantas de avena (*Avena sativa*) y de la microbiota del suelo tratado con hongos micorrízicos y ajo (*Allium sativum*), en los primeros meses de cultivo” realizado por la señorita Nathaly Katherine Hernández Endara, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita Nathaly Katherine Hernández Endara para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 03 de marzo de 2017

Atentamente,



Dra. María Emilia Medina

DIRECTORA DEL PROYECTO DE TESIS



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Nathaly Katherine Hernández Endara, con cédula de identidad N° 1721496816, declaro que este trabajo de titulación “Evaluación del desarrollo de plantas de avena (*Avena sativa*) y de la microbiota del suelo tratado con hongos micorrícicos y ajo (*Allium sativum*), en los primeros meses de cultivo” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 03 de marzo de 2017

Atentamente,

Nathaly Hernández Endara

AUTORA DEL PROYECTO

C.C. 1721496816

ID: L 00340755




DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, Nathaly Katherine Hernández Endara, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas, ESPE, publicar en la biblioteca Virtual de la institución, el presente trabajo de titulación “Evaluación del desarrollo de plantas de avena (*Avena sativa*) y de la microbiota del suelo tratado con hongos micorrícicos y ajo (*Allium sativum*), en los primeros meses de cultivo” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 03 de marzo de 2017


Nathaly Hernández Endara
AUTORA DEL PROYECTO
C.C. 1721496816

DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a los dos motores que impulsan
mi vida y a quienes debo todo lo que soy y todo lo
que tengo: Mi madre y mi hermano*

AGRADECIMIENTO

Al concluir este trabajo, siento la necesidad de expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que directa o indirectamente, fueron partícipes de éste proyecto.

Para empezar, quisiera dar gracias a Dios por haberme concedido la vida, la salud y la fortaleza para culminar mi carrera y esta investigación.

Quisiera agradecer a mi madre y a mi hermano, por ser los pilares que me han apoyado desde siempre, apoyándome en las buenas y en las malas y tendiéndome la mano para levantarme después de cada caída, que han sabido comprenderme y ayudarme a no decaer. Ellos han sido los principales protagonistas de mi vida.

También quisiera expresar mi agradecimiento a todos los profesores que fueron parte de éste trabajo, Ingeniero Pedro Romero, Ingeniera Karina Ponce, Licenciada Jessica Maisincho y todos aquellos docentes que con sus enseñanzas y su apoyo, me supieron guiar a lo largo de mi carrera, hasta alcanzar la meta propuesta.

Un agradecimiento especial a mi directora de tesis, Doctora María Emilia Medina, quién a más de ejercer sus funciones como docente ha sido una amiga incondicional, que con sus sabios consejos y enseñanzas me ha ayudado a enfrentar los obstáculos que se me presentaron durante la realización de este proyecto.

Y por último, deseo agradecer a todos mis compañeros y amigos que fueron parte de ésta investigación: Moni, Andre, Dennis, Bere, Geova, Jimmy, Christian, Isa, Adri y todos aquellos que me brindaron su apoyo y su amistad en éste tiempo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
NOMENCLATURA	xvii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.3. OBJETIVOS	6
1.1.1. Objetivo general del proyecto.....	6
1.1.2. Objetivos específicos	6
1.4. MARCO REFERENCIAL.....	7
1.4.1. Microbiota del Suelo.....	7
1.4.2. Bacterias del suelo	9
1.4.3. Bacterias solubilizadoras de fósforo.....	10
1.4.4. Microorganismos fijadores de nitrógeno	12
1.4.5. Actinomicetos	14

1.4.6.	Hongos del suelo.....	16
1.4.7.	Hongos micorrícicos	19
1.4.7.1.	Tipos de micorrizas	20
1.4.7.2.	Estructuras de los Hongos Micorrícicos Arbusculares	24
1.4.7.3.	Ciclo de vida	28
1.4.7.4.	Beneficio de las micorrizas en las plantas.....	29
1.4.7.5.	Factores que afectan la simbiosis.....	30
1.4.8.	Ajo	31
1.5.	HIPÓTESIS	33
CAPÍTULO II		34
MATERIALES Y MÉTODOS		34
2.1.	PARTICIPANTES.....	34
2.2.	ZONA DE ESTUDIO	34
2.3.	PERIODO DE INVESTIGACIÓN.....	34
2.4.	DISEÑO EXPERIMENTAL	34
2.4.1.	Variables de Respuesta:	37
2.4.2.	Operatividad de las variables.....	37
2.5.	METODOLOGÍA.....	38
2.5.1.	Elección del inóculo micorrícico adecuado y toma de la muestra.....	38
2.5.2.	Tratamiento de la muestra de suelo	38
2.5.3.	Observación y conteo de esporas de hongos micorrícicos	39
2.5.4.	Sustrato de propagación.....	40
2.5.5.	Montaje del ensayo	41
2.5.6.	Mantenimiento nutricional del ensayo.....	42
2.5.7.	Control de plagas	43
2.5.8.	Extracto hidroalcohólico de ajo, dilución y aplicaciones	44

2.5.9. Levantamiento de ensayo.....	44
2.5.10. Análisis microbiológico del suelo.....	46
CAPÍTULO III.....	48
RESULTADOS.....	48
3.1. Elección del inóculo micorrícico.....	48
3.2. Cuantificación de las esporas de HMA	48
3.3. Longitud radicular de las plantas.....	49
3.4. Medición del peso fresco de las plantas	50
3.4.1. Peso fresco radicular.....	50
3.4.2. Peso fresco aéreo	51
3.4.3. Peso fresco total.....	52
3.5. Medición del peso seco de las plantas.....	53
3.5.1. Peso seco radicular.....	53
3.5.2. Peso seco aéreo	54
3.5.3. Peso seco total.....	55
3.6. Evaluación del porcentaje de micorrización de las raíces de las plantas	56
3.7. Número de esporas micorrícicas obtenidas al final del ensayo.....	57
3.8. Recuento general de bacterias en cada uno de los tratamientos.....	60
3.9. Recuento general de hongos en cada uno de los tratamientos.....	61
3.10. Identificación y recuento de bacterias solubilizadoras de fósforo.....	62
3.11. Identificación y recuento de bacterias fijadoras de nitrógeno	63
3.12. Análisis de la correlación de los parámetros de crecimiento de las plantas de avena (<i>Avena sativa</i>), el porcentaje de micorrización y el número de esporas micorrícicas en los tratamientos.....	64
CAPITULO IV.....	67
DISCUSIÓN	67
4.1. Selección del inóculo micorrícico y montaje del ensayo	67

4.2. Evaluación de las variables de crecimiento de las plantas.....	69
4.3. Evaluación del porcentaje de micorrización radicular en las plantas y el número de esporas micorrícicas.....	71
4.4. Evaluación de la microbiota del suelo.....	72
CAPÍTULO V	75
CONCLUSIONES	75
CAPÍTULO VI.....	76
RECOMENDACIONES	76
CAPITULO VII	77
BIBLIOGRAFÍA.....	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Interacción de las composiciones del sustrato y concentraciones del extracto de ajo, según cada tratamiento.....	...35
Tabla 2:	Descripción de los tratamientos empleados en el ensayo.....	...36
Tabla 3:	VARIABLES Y FACTORES A DETERMINAR DEL ENSAYO.....	...37
Tabla 4	Composición volumétrica del sustrato de propagación.....	...41
Tabla 5	Composición en g/L de las soluciones stock.....	...42
Tabla 6	Volumen en ml de cada solución stock para preparar un determinado número de litros de solución final.....	...43
Tabla 7	Medios de cultivo a emplear para el análisis microbiológico del suelo.....	...46
Tabla 8	Resultados del número de esporas de micorrizas obtenidas en los muestreos realizados, previo al montaje del ensayo.....	...48
Tabla 9	Número de esporas de micorrizas del suelo inicial.....	...49
Tabla 10	Coeficientes de correlación entre las variables de longitud y pesos de las plantas y la población de esporas micorrícicas en los tratamientos que incluían siembra.....	...66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Micorriza Arbuscular – estructura de un arbusculo.....	21
Figura 2	Micorrizas Arbusculares – estructura de una vesícula.....	22
Figura 3	Micorrizas Arbusculares – estructura del micelio externo.....	24
Figura 4	Micorrizas Arbusculares – estructura de una espora.....	25
Figura 5	Micorriza arbuscular - hifas intracelulares.....	25
Figura 6	Micorriza Arbuscular – estructura de un arbusculo.....	26
Figura 7	Micorrizas Arbusculares – estructura de una vesícula.....	26
Figura 8	Micorrizas Arbusculares – estructura del micelio externo.....	27
Figura 9	Micorrizas Arbusculares – estructura de una espora.....	28
Figura 10	Procesamiento de la tierra en peróxido de Hidrógeno.....	39
Figura 11	Esporas de hongos micorrícicos vistos bajo el estéreo microscopio..	40
Figura 12	Montaje de los tratamientos del ensayo, en macetas desechables de 1 litro de capacidad.....	42
Figura 13	Plantas de avena (<i>Avena sativa</i>), cubiertas por una lámina plástica, a fin de controlar el contagio por plagas.....	44
Figura 14	Comparación del crecimiento de las plantas de avena (<i>Avena sativa</i>).....	46
Figura 15:	Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, para evaluar el desarrollo de la longitud radicular de plantas de avena (<i>Avena sativa</i>).....	50
Figura 16:	Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el desarrollo del peso fresco radicular de plantas de avena (<i>Avena sativa</i>).....	51
Figura 17:	Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el desarrollo del peso fresco aéreo de plantas de avena (<i>Avena sativa</i>).....	52
Figura 18:	Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el desarrollo del peso fresco total de plantas de avena (<i>Avena sativa</i>).....	53

Figura 19: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el desarrollo del peso seco radicular de plantas de avena (<i>Avena sativa</i>).....	54
Figura 20: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el desarrollo del peso seco aéreo de plantas de avena (<i>Avena sativa</i>).....	55
Figura 21: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el desarrollo del peso seco total de plantas de avena (<i>Avena sativa</i>).....	56
Figura 22: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el porcentaje de micorrización radicular de plantas de avena (<i>Avena sativa</i>).....	57
Figura 23: Fotografías tomadas con el microscopio óptico, de la tinción de raíces micorrizadas de los tratamientos que incluían plantas, micorrizas y ajo.....	57
Figura 24: Efecto del extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en la variación del número de esporas micorrícicas.....	59
Figura 25: Variación del número de esporas micorrícicas al inicio y al final del ensayo.....	60
Figura 26: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el recuento de bacterias totales del suelo.....	61
Figura 27: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el recuento de hongos totales del suelo.....	62
Figura 28: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el recuento de bacterias solubilizadoras de fósforo.....	63
Figura 29: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el recuento de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	64
Figura 30: Correlación de las variables de crecimiento de las plantas de avena	65

(*Avena sativa*), el porcentaje de micorrización y el número de esporas micorrícicas obtenidas al final del ensayo.....

RESUMEN

La gran contaminación existente a nivel agrícola y ambiental, se traduce en una gran necesidad de la ciencia en buscar nuevas técnicas que permitan el mejoramiento agrícola, el control de plagas y el crecimiento vegetal sin contaminar el medio ambiente. En cuanto a esto, se sabe que los microorganismos benéficos del suelo, juegan un papel indispensable en el desarrollo vegetal y la calidad de los suelos. El presente estudio, pretende evaluar el crecimiento y desarrollo de plantas de avena (*Avena sativa*) y la microbiota general del suelo, tratados con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y un extracto hidroalcohólico de ajo (*Allium sativum*). Se realizó un ensayo en el que se empleó un sustrato de suelo compuesto por tierra negra (35%), turba (30%) y un inóculo micorrícico, el cuál inicialmente, contó con una población de 15.1 esporas de HMA por gramo de suelo. Los tratamientos difirieron unos de otros, en la viabilidad y esterilidad del inóculo empleado. El ensayo se mantuvo durante 90 días y posteriormente, se evaluó las variables de crecimiento de las plantas, el número de esporas de HMA finales en cada uno de los tratamientos, el porcentaje de micorrización radicular de las plantas y se realizó un análisis microbiológico para determinar el recuento general de las bacterias, hongos, bacterias fijadoras de nitrógeno y bacterias solubilizadoras de fósforo presentes al final del ensayo.

PALABRAS CLAVE

- MICROBIOTA
- HONGOS MICORRÍCICOS ARBUSCULARES (HMA)
- VIABILIDAD
- EXTRACTO ETANÓLICO
- PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN

ABSTRACT

The great contamination existing at agricultural and environmental level, translates into a great need of science in search of new techniques that allow agricultural improvement, pest control and plant growth without environmental contamination. In this regard, it is known that soil beneficial microorganisms have an indispensable role in plant development and soil quality. The present study aims to evaluate the growth and development of oat plants (*Avena sativa*) and the general soil microbiota, treated with arbuscular mycorrhizal fungi (HMA) and a hydroalcoholic extract of garlic (*Allium sativum*). A soil substrate composed of black soil (35%), peat (30%) and a mycorrhizal inoculum, which initially had a population of 15.1 AMF spores per gram of soil, was used. The treatments differed from each other, in the viability and sterility of the inoculum used. The assay was maintained for 90 days and thereafter, the plant growth variables, the number of final AMF spores in each treatment, the percentage of colonization of the AMF in the roots of the plants and a microbiological analysis were determined the general count of bacteria, fungi, nitrogen fixing bacteria and phosphorus solubilizing bacteria present at the end of the test.

KEYWORDS

- MICROBIOTA
- ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI (HMA)
- VIABILITY
- ETHANOLIC EXTRACT
- PERCENTAGE OF MYCORRHIZATION

NOMENCLATURA

cm	Centímetro
g	Gramo
ml	Mililitro
l	Litro
h	Hora
Ha	Hectárea
Kg	Kilogramo
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
μ	Micras
°C	Grado centígrado
PSI	Pounds-force per square inch (libra por pulgada cuadrada)
HMA	Hongos Micorrícicos Arbusculares
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal)
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
HCl	Ácido Clorhídrico
KOH	Hidróxido de Potasio
PDA	Agar papa dextrosa
INVAM mycorrhizal	International Culture Collection of Vesicular Arbuscular
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
IPES	Instituto para la Economía Social

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE PLANTAS DE AVENA (*Avena sativa*) Y DE LA MICROBIOTA DEL SUELO TRATADO CON HONGOS MICORRÍDICOS Y AJO (*Allium sativum*), EN LOS PRIMEROS MESES DE CULTIVO.

1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

A lo largo de los últimos años, la agricultura se ha ido revolucionando, gracias al empleo de técnicas que han ido mejorando progresivamente y a su vez han permitido un avance sorprendente en la producción agrícola (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 2002). Debido al empleo de cultivos intensivos con fertilizantes, abonos y demás productos químicos se logra controlar las plagas que afectaban a los cultivos y así, poder incrementar la producción, todo esto, en busca de satisfacer las necesidades del hombre (Acuña, 2003; Ramos C. , 2010).

Del mismo modo, los productos químicos fitosanitarios contribuyeron al control de plagas y las enfermedades que éstas propagaban, por lo que en un principio tuvieron una gran acogida, gracias a las ventajas proporcionadas, tanto a nivel económico como productivo, debido a los nutrientes que los productos fertilizantes aportaban (Acuña, 2003; Proyecto Live Sinergia, 2006; Yepis, *et al.*, 2000). No obstante, el uso excesivo de estos productos generaron consecuencias negativas a nivel ambiental, puesto que produjeron problemas de resistencia y aparecieron nuevas plagas ocasionando contaminación de suelos y aguas, sobre todo subterráneas, desapareciendo fauna, flora y microorganismos e insectos benéficos (Proyecto Live Sinergia, 2006; Ramos C. , 2010).

Por su parte, el suelo está constituido por partículas inorgánicas, las cuales permiten la acumulación y dispersión de todos los productos químicos, todo esto se traduce en la pérdida de fertilidad de los suelos debido a la modificación y desaparición de los microorganismos benéficos propios de la rizósfera y la difusión de los contaminantes en los medios acuáticos y por ende de los organismos

habitantes (García & Rodríguez, 2012; Consejería del Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, 2003)

A consecuencia de la contaminación ambiental ocasionada, en los últimos años se han buscado opciones saludables tanto para la recuperación de los suelos como para la mejora de los cultivos, evitando el uso de productos químicos (Acuña, 2003; Grageda-Cabrera, *et al.*, 2012). Si bien, a lo largo del tiempo, la contaminación ambiental por el uso de fertilizantes no ha podido ser mejorada en gran medida, actualmente se están empleando alternativas ecológicas que permiten el mejoramiento de los cultivos, basado en un aporte de nutrientes y sin contaminación ambiental (García & Rodríguez, 2012; Proyecto Live Sinergia, 2006).

Entre estas alternativas está el uso de “enemigos naturales de las plagas” o también conocidos como biofertilizantes (Acuña, 2003; García & Rodríguez, 2012), que son técnicas que incluyen el empleo de insectos y agentes biológicos, como virus, bacterias, hongos y nematodos que, o bien causan la muerte de los insectos plaga o favorecen la nutrición y resistencia de la planta al ataque de plagas (Armenta, *et al.*, 2010; García & Rodríguez, 2012).

En este contexto, los biofertilizantes son insumos elaborados de microorganismos que buscan reemplazar de forma total o parcial el uso de compuestos fertilizantes químicos y por consiguiente, disminuir el impacto ambiental que estos últimos producen (Acuña, 2003; Armenta, *et al.*, 2010; Grageda-Cabrera, *et al.*, 2012). Entre los beneficios que proporcionan los biofertilizantes, se puede citar (Acuña, 2003):

- Producción a bajo costo
- Protección del medio ambiente
- Conservación de la biodiversidad y fertilidad del suelo
- Mejora de la resistencia y nutrición de la planta

Por su parte, entre los microorganismos empleados como biofertilizantes, existen una amplia gama de clasificaciones, debido al tipo de beneficios que aportan, pudiendo ser mejoradores, fitoestimulantes, biorremediadores, biofertilizantes, etc. (Grageda-Cabrera, *et al.*, 2012; Morte, *et al.*, 2010). Así por ejemplo, entre los microorganismos que tienen una acción fertilizante, se encuentran ciertos hongos benéficos capaces de mejorar la calidad de los cultivos (Bucchese, *et al.*, 2012) esto

gracias a la relación simbiótica que se establece entre la planta y el hongo originando una cooperación mutualista entre ambos organismos (Barrer, 2009).

Dentro de estas poblaciones de hongos benéficos, se encuentran los hongos micorrícicos arbusculares (Terjena, 2012), los cuales se caracterizan por establecer con el organismo huésped, es decir la planta, una relación bidireccional benéfica, por la cual se da el paso de nutrientes, que favorece a los dos organismos (Pérez, *et al.*, 2011; Peña, *et al.*, 2007). De hecho, gran parte del ciclo de los nutrientes que la planta requiere para su desarrollo, intervienen considerablemente en la relación hongo – planta (Barrer, 2009). Según Roldán 1985, la mayoría de las plantas requiere cierto grado de micorrización para su adecuado desarrollo y a su vez, no se conoce que las micorrizas puedan desarrollarse sin la presencia de una planta, por lo que son organismos caracterizados como simbioses obligados (Roldán, 1985).

Existen varios tipos de micorrizas, pero se conoce que un 96% de las plantas vasculares, están colonizadas por micorrizas del tipo vesículo – arbusculares (Roldán, 1985; Barrer, 2009). La relación simbiótica originada por la colonización de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y las raíces de las plantas, promueve un mayor crecimiento y nutrición mineral de las mismas, así como la tolerancia a patógenos (Pérez, *et al.*, 2011; Roldán, 1985).

Si bien las investigaciones llevadas a cabo con micorrizas no han sido muy ahondadas por la dificultad de la elaboración del inóculo, es bastante conocido, que la relación hongo – planta, requiere de ciertos factores, que pueden llegar a ser críticos para la infección, de ahí la necesidad de llegar a establecer de forma más precisa, las condiciones adecuadas para que la simbiosis entre ambos organismos, sea óptima (Armenta, *et al.*, 2010; Olivares & Barea, 2007).

1.2. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Es bien conocido que la microbiota del suelo juega un papel fundamental en la actividad y fertilidad del mismo, además del aporte nutricional que proporcionan a las plantas (Pérez, *et al.*, 2011; Morte, *et al.*, 2010). Debido a esto y a causa de la excesiva contaminación por el uso de fertilizantes, en los últimos años se ha generado un especial interés en el estudio y la búsqueda de microorganismos

benéficos del suelo, tanto hongos como bacterias, que provean un efecto fertilizante (Cuenca, *et al.*, 2007; Proyecto Live Sinergia, 2006; Armenta, *et al.*, 2010).

Entre los microorganismos benéficos del suelo, que contribuyen a la mejora del desarrollo y nutrición de la planta, se pueden citar tanto los hongos formadores de micorrizas, especialmente los que forman micorrizas arbusculares, así como también a las bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento (Morte, *et al.*, 2010; Alarcón & Ferrera, 2000). La interacción de estos microorganismos con las raíces de las plantas, modifican las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y por consiguiente, facilitan la captación de nutrientes y estimulan el crecimiento de la planta (Richardson, *et al.*, 2009; Armenta, *et al.*, 2010; Rodríguez V. , 2002).

Los hongos micorrícicos en general, ayudan a la planta a la obtención de nutrientes del suelo, debido al aumento de la cantidad de hifas radicales lo que a su vez, permite cubrir un mayor volumen de suelo. Además, proporcionan a la planta, una mayor tolerancia al estrés hídrico y salino, a patógenos, nematodos y metales pesados (Alarcón & Ferrera, 2000; Morte, *et al.*, 1982). Del mismo modo, el hongo se ve beneficiado por la planta, recibiendo los compuestos carbonatados del metabolismo vegetal, lo que permite la supervivencia del hongo (Roldán, 1985; Bagyaraj, *et al.*, 1979).

Por su parte, también están las bacterias rizosféricas, entre las cuales se pueden citar bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias promotoras del crecimiento y ciertos hongos. Estos microorganismos, se caracterizan principalmente por su capacidad de propagación y supervivencia en la superficie radical y de promover un efecto benéfico para la planta (Jaizme & Rodríguez, 2008). Así por ejemplo, se pueden citar ciertos géneros bacterianos como *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pausteria*, *Azospirillum* y especies de hongos como *Cylindrocarpon*, *Dactylella*, *Hirsutella*, *Myrothecium*, *Penicillium*, entre otros (Flor, 2013; García I. , 2011).

Debido a lo anteriormente expuesto y con el fin de mejorar los aspectos referentes al empleo de biofertilizantes como una técnica sustentable para la agricultura, se hace necesaria la búsqueda de todos los factores que influyen en la infección y colonización de estos microorganismos benéficos. Numerosos estudios, señalan la importancia de las condiciones edáficas del suelo, así como también la

“dependencia de la planta” a ser colonizada por micorrizas y la “especificidad” de las micorrizas con respecto a la planta huésped (Roldán, 1985; Olivares & Barea, 2007).

Entre las condiciones edáficas del suelo, se puede mencionar ciertas propiedades químicas y físicas que pueden favorecer o afectar el desarrollo de una microbiota adecuada. Entre los más importantes, se puede mencionar la concentración de ciertos compuestos como Nitrógeno, Fósforo y Potasio, los cuales son capaces de influir en la infectividad de las micorrizas, de hecho, numerosas investigaciones, señalan que cuanto mayor es la concentración de fosfatos en el suelo, menor es el grado de infección de las micorrizas (Olivares & Barea, 2007). Asimismo, la temperatura, el pH, la humedad y la disponibilidad de nutrientes, son factores directamente relacionados con el nivel de infección de las micorrizas (Barrer, 2009; Estrada, 2011).

Por los motivos antes expuestos, es importante llegar a determinar cuáles son los factores a tener en cuenta, para que el beneficio planta – micorriza sea óptimo a fin de examinar los posibles compuestos o sustancias que favorezcan o alteren la simbiosis de estos microorganismos y el desarrollo de la planta. En esta investigación se realizará un ensayo para evaluar el desarrollo de plantas de avena (*Avena sativa*) bajo el efecto de un extracto hidroalcohólico del ajo (*Allium sativum*) y el empleo de un inóculo micorrícico. Además se valorará, de forma general, las diferencias o variaciones de la microbiota del suelo, en lo que se refiere al número de bacterias y hongos totales y la presencia de bacterias solubilizadoras de fósforo y fijadoras de nitrógeno.

Este estudio utilizó el ajo, puesto que diversas fuentes bibliográficas aseguran que tiene una acción fertilizante natural, que se ha venido empleando en las últimas décadas como una técnica rentable y efectiva que brinda una acción insecticida y a su vez no resulta tóxico para el medio ambiente (Romani, 2008). Además de ello, el ajo presenta una gran cantidad de compuestos azufrados, como la alicina (López T. , 2007), los cuales se cree que pueden tener cierta injerencia en el desarrollo de los hongos micorrícicos (Gahan & Schmalenberger, 2014).

Por su parte, se emplea la avena (*Avena sativa*) como planta trampa, puesto que es un cultivo forrajero bastante apto para el crecimiento y propagación de los hongos micorrícicos (Jaizme & Rodríguez, 2008; Olivares & Barea, 2007).

Con esta investigación, se pretende conocer, de forma superficial, el efecto de los compuestos del ajo, no sólo en el desarrollo de la planta, sino también la influencia que tiene éste, sobre ciertos microorganismos benéficos del suelo y así poder abrir nuevos campos de investigación en cuanto a estos microorganismos y los efectos que estos compuestos pueden ocasionar sobre ellos.

1.3. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general del proyecto

Evaluar el desarrollo de plantas de avena (*Avena sativa*) y de la microbiota del suelo tratado con hongos micorrícicos y ajo (*Allium sativum*), en los primeros meses de cultivo.

1.1.2. Objetivos específicos

- Analizar diferentes suelos de cultivos, que posean una población apropiada de esporas de micorrizas, para la selección de un inóculo adecuado del ensayo a realizar.
- Montar un ensayo de propagación de esporas de hongos micorrícicos (HMA) en plantas huésped de avena, según el diseño experimental.
- Obtener un extracto hidroalcohólico de bulbos de ajo (*Allium sativum*) y aplicarlo en diferentes concentraciones (según el diseño experimental) durante 2 meses.
- Evaluar las variables de crecimiento de todas las plantas del ensayo experimental, que incluyen biomasa total, aérea y radical, peso fresco y peso seco (radical y aéreo).
- Cuantificar el número total de esporas de hongos micorrícicos al final del ensayo (3 meses), así como también, el porcentaje de micorrización final, mediante la tinción de raíces.
- Determinar, de manera general, las diferencias poblacionales de bacterias y hongos, existentes entre cada uno de los tratamientos.

1.4. MARCO REFERENCIAL

1.4.1. Microbiota del Suelo

El suelo puede definirse como una entidad independiente y organizada, formada por una serie de constituyentes, organizados en horizontes o capas de materiales orgánicos e inorgánicos, sobre los cuales han tenido influencia una serie de factores como el clima, los macro y microorganismos y la topografía del mismo (Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 2004; López A. , 2006; USDA, 1998). Por su parte, las fracciones orgánicas e inorgánicas que componen el suelo, forman una mezcla compleja que almacena agua y organismos vivos (Pfenning & Magalhães, 2012).

Las fracciones orgánicas están constituidas por plantas en descomposición, raíces, exudados radicales, compuestos orgánicos y una amplia variedad de microorganismos, los cuales son los encargados de la regulación de los ecosistemas terrestres, puesto que representan la fuerza de conducción de la mayoría de los componentes y nutrientes del suelo (Ramos J. , 2009; García I. , 2011). Gracias a la actividad de las diferentes bacterias y hongos, la materia orgánica se descompone y se liberan al suelo nutrientes, dejándolos así, disponibles para que sean nuevamente absorbidos por las plantas (Pérez, *et al.*, 2011; García I. , 2011; Ramos J. , 2009). Por ello, el suelo es considerado uno de los ambientes más complejos en lo que concierne a los microorganismos que alberga, puesto que un gramo de suelo puede llegar a contener hasta 10^9 células microbianas y hasta 10^4 especies diferentes (Franco, 2008).

La absorción de nutrientes por parte de la planta puede ser de dos maneras: de forma directa por el sistema radical de la misma planta y las estructuras especializadas de ésta, o también de forma indirecta, donde interviene una gran cantidad de microorganismos propios del suelo, que establecen una relación simbiótica con la planta o también influenciar en los bioprocesos del suelo y la productividad incorporando residuos orgánicos y en algunos casos mejorando la relación Carbono - Nitrógeno (Grant & Long, 2008; Pérez, *et al.*, 2011).

La microbiota del suelo es una mezcla microscópica compuesta de millones de bacterias, actinomicetos, hongos, protozoos, etc. (Higa & Parr, 2013), los cuales,

no sólo están involucrados en el ciclo de los procesos biogeoquímicos de la materia (Rodríguez V. , 2004), sino que también ejercen una gran influencia en el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Ramos J. , 2009; García I. , 2011), protección de la planta frente a patógenos y degradación de compuestos xenobióticos (Franco, 2008).

No obstante, muchos de los suelos no siempre tienen una microbiota favorable, sino que por el contrario, presentan un ambiente nutricionalmente pobre, tanto a nivel de nutrientes como de microorganismos, por lo que éstos últimos no se encuentran distribuidos en todas las capas del suelo, localizándose únicamente en ciertas partes como la rizósfera (Ramos J. , 2009), de forma que es donde existe mayor concentración de microorganismos y por consiguiente, es fisiológicamente más activa, especialmente si se compara con la microbiota de un suelo sin raíces (Rodríguez V. , 2002). De hecho, recientes investigaciones determinan que la gran cantidad de población microbiana heterotrófica en la rizósfera, es la responsable de mantener y brindar equilibrio y protección a la planta, del ataque de patógenos (García I. , 2011; Ramos J. , 2009).

A los microorganismos y más específicamente a las bacterias colonizadoras de la rizósfera y superficies del suelo se les asigna el nombre de “rizobacterias”, término que hace referencia a la capacidad de ciertos microorganismos para colonizar mayoritariamente las interfaces suelo-raíz (Franco, 2008; Higa & Parr, 2013). Las rizobacterias benéficas que ejercen una acción positiva en el desarrollo de las plantas y que mejoran la calidad del suelo, son conocidas como *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* o también por sus siglas de PGPR, que significa Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (Rico, 2009).

Si bien, el porcentaje de bacterias capaces de colonizar la rizósfera abarca tan sólo 1 a 2% del total de los géneros, generalmente se caracterizan por aumentar el crecimiento de las plantas, tener una alta capacidad competitiva contra otro tipo de bacterias, colonizar las superficies radiculares de la planta, no ser nocivas para el hombre y brindar un control efectivo contra agentes patógenos, tanto del suelo como del ambiente, que pueden perjudicar a la planta, (Ramos J. , 2009; Martín, 2011; Beneduzi, *et al.*, 2012).

Según el tipo de relación que los microorganismos establezcan con la planta, se pueden destacar tres grupos (Franco, 2008):

- Saprófitos, los cuales obtienen sus nutrientes de los residuos orgánicos que provienen de animales y plantas
- Simbiontes parásitos, que establecen una relación perjudicial para la planta, es decir son patógenos.
- Simbiontes mutualistas, los cuales aportan nutrientes a las plantas a la vez que se ven beneficiados de ellas.

Entre los simbiontes mutualistas más destacados, se pueden citar a bacterias promotoras de crecimiento, hongos micorrícicos, bacterias fijadoras de nitrógeno, etc., aunque existen muchos microorganismos del suelo capaces de beneficiar al desarrollo de la planta, ya sea estableciendo cierto tipo de relación bidireccional con ella, o bien producir metabolitos biológicamente activos (Rodríguez V. , 2004; García I. , 2011). Entre estos organismos, se encuentran los hongos basidiomicetos, cierto tipo bacterias y algunos actinomicetos, de los cuales, tanto su metabolismo como su capacidad de producción no ha sido muy profundizada (Franco, 2008). Por su parte, en lo concerniente a los hongos micorrícicos de tipo arbusculares, se conoce que estos representan entre el 5 al 50% de la biomasa de los microorganismos del suelo y, en los últimos años, se les ha atribuido un papel fundamental en el incremento de la sostenibilidad de los agro-ecosistemas (Pérez, *et al.*, 2011).

Cabe mencionar que, si bien algunos de los hongos benéficos que se encuentran en el suelo tienen gran importancia en la agronomía, asimismo existen una gran variedad de especies que pueden llegar a ser perjudiciales, ya que son consideradas como fitopatógenos que atacan a plantas de interés económico, a través de la raíz o a nivel del suelo (Rodríguez V. , 2004).

1.4.2. Bacterias del suelo

La extensa diversidad bacteriana de los suelos no ha sido muy profundizado puesto que bacterias en cuestión, no permiten su cultivo (Escalante, *et al.*, 2001). Aun así, se sabe que la mayoría de las bacterias propias del suelo, brindan una serie de funciones benéficas para la planta, por ejemplo, la descomposición de animales,

plantas y residuos microbianos, exudados de raíces, los cuales son convertidos en materia orgánica (Ramos J. , 2009).

De las investigaciones llevadas a cabo, principalmente con técnicas moleculares, se ha llegado a establecer que las bacterias heterótrofas, es decir, las que toman sus nutrimentos de su entorno, son las mayormente predominantes en la rizósfera y existe una amplia diversidad de géneros y subgéneros, la selectividad de los quimioautótrofas presentes en el suelo, aunque no son tan numerosas, juegan un papel de gran importancia ecológica, llevando a cabo funciones específicas, como las bacterias quimioautótrofas nitrificantes, entre las cuales se encuentran géneros como *Azotobacter* y *Clostridium* (Ramos J. , 2009; Guerrero, 2012).

Usualmente las bacterias se distribuyen en el suelo, formando pequeñas colonias de pocas células pero del mismo morfotipo; esta distribución, está estrechamente relacionada con la presencia de agregados del suelo, raíces, exudados y concentración de nutrientes, factores que interfieren en gran medida la formación de estos “microhábitats” (Nogales, 2005; Ramos J. , 2009).

1.4.3. Bacterias solubilizadoras de fósforo

Si bien, los microorganismos solubilizadores de fosfato son un grupo funcional de organismos promotores del crecimiento vegetal, que abarcan no sólo bacterias, sino también otros organismos como hongos y actinomicetos (Beltrán, 2014), la literatura basada en ensayos experimentales, asegura que las bacterias, son más eficaces en la solubilización del fosfato, en comparación con los hongos y actinomicetos (Vargas, 2012).

La solubilización de fosfato por parte de los microorganismos ocurre en la rizósfera (Vargas, 2012), los cuales solubilizan el fosfato mineral insoluble que ha sido fijado en el suelo y no puede ser asimilado por las plantas y producen ácidos orgánicos, fosfatasa, quelatos y compuestos aptos para la nutrición vegetal (Bobadilla & Rincón, 2008; Vargas, 2012). La mayoría de las bacterias a las que se les atribuye esta capacidad, se caracterizan por ser aerobias, aunque también existen algunos microorganismos mesófilos, heterótrofos y facultativos con esta capacidad (Bobadilla & Rincón, 2008).

Existe una gran variedad de géneros de bacterias que han sido reportados e intervienen en la obtención de fósforo, entre los más destacados se puede mencionar a *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Grobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Esorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Erwinia*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Proteolyticus*, *Streptomyces*, *Vibrio* entre otras, y a los hongos como *Penicillium* y *Aspergillus* (Vargas, 2012; Corrales, *et al.*, 2014).

Estos microorganismos se desarrollan en medios de cultivos que incorporan compuestos insolubles, como fosfato tricálcico, los cuales son utilizados como única fuente de carbono (Restrepo, *et al.*, 2015). De las especies antes mencionadas, algunas de ellas han sido empleadas en la agricultura, como biofertilizantes, debido a su potencial de solubilización de fosfato (Bobadilla & Rincón, 2008).

La importancia de la presencia de estos organismos en el suelo, radica en que el fósforo es un elemento esencial para la nutrición y el desarrollo vegetal, constituyendo más de 0,2% del peso seco de la planta (Corrales, *et al.*, 2014). Para que las plantas puedan adquirir el fósforo, este debe encontrarse en forma inorgánica y en estado soluble (Beltrán, 2014; Rubio, 2002), así como también a un rango óptimo del pH, el cual será de 6.5, grado donde los ortofosfatos son asimilables por las plantas y los elementos como el aluminio y calcio se precipitan, evitando así las elevadas concentraciones de compuestos posiblemente tóxicos para las plantas (Corrales, *et al.*, 2014).

Desafortunadamente, como resultado de las actuales técnicas existentes de cultivo provocan la insuficiencia de fuentes naturales de fósforo junto con el hecho de que es un elemento de poca capacidad de desplazamiento y con facilidad se queda inmovilizado en el suelo, su disponibilidad se hace cada vez más reducida (Restrepo, *et al.*, 2015; Corrales, *et al.*, 2014). Por tanto, la presencia de bacterias solubilizadoras de fósforo en el suelo, aumentan la cantidad del mismo, al emplear enzimas hidrolizantes que permiten la movilidad de este elemento y lo transforman en un nutriente de fácil adquisición para las plantas (Bobadilla & Rincón, 2008).

1.4.4. Microorganismos fijadores de nitrógeno

En la naturaleza, para que el nitrógeno pueda ser utilizado y asimilado por los seres vivos, debe ser fijado, usualmente en esta forma se lo puede encontrar siendo parte de iones amonio y nitrato, así pues, la fijación de este elemento, consiste en la reducción del Nitrógeno molecular en amonio (Rojas, 2008; Baca, *et al.*, 2000).

El nitrógeno puede ser fijado en la naturaleza mediante dos procedimientos: el primero es mediante la luz solar, en el cual el nitrógeno se ioniza por acción de la energía lumínica, se combina con la lluvia y llega al suelo en forma de nitritos y nitratos y, el segundo método, en el cual intervienen los microorganismos, los cuales tienen la capacidad de absorber el nitrógeno atmosférico y convertirlo en amonio, el cual es una de las formas asimilables de Nitrógeno para los seres vivos (Baca, *et al.*, 2000; Peña & Reyes, 2007). A este tipo de fijación, se le atribuye el 65% de la fijación total del nitrógeno, de ahí, la importancia de la colonización de estos organismos en el suelo y el hecho de que sean considerados como un componente esencial en los ecosistemas terrestres (Baca, *et al.*, 2000; Ramos J. , 2009; Cecilia, *et al.*, 2007)

Las bacterias con esta capacidad, presentan una muy amplia variedad taxonómica, y cada uno de los géneros involucrados, distintos estilos de vida, tipos de asociación con los vegetales (Rojas, 2008). Sin embargo, todas las especies involucradas en la fijación del nitrógeno, comparten la característica de poseer un sistema enzimático especializado, denominado Nitrogenasa, que interviene de forma directa en la reducción de este elemento (Baca, *et al.*, 2000; Cecilia, *et al.*, 2007).

Dentro de los organismos involucrados en la Fijación Biológica del Nitrógeno, se pueden citar a las bacterias, algas verde-azules o cianobacterias y actinomicetes, los cuales fijan el nitrógeno viviendo libremente o formando asociaciones (Paredes, 2013). En cuanto a las bacterias de vida libre presentes en el suelo, éstas se alimentan de materia orgánica muerta y se clasifican según sus necesidades fisiológicas, entre ellas están las bacterias anaeróbicas obligadas o facultativas, las bacterias aeróbicas obligadas y las fotosintéticas (Mayz-Figueroa, 2004).

En este contexto, se puede citar a las bacterias que son capaces de desarrollarse en asociación con las plantas, se debe a requerimientos de simbiosis para la supervivencia de ambos, puesto que la planta les suministra los nutrientes y la energía necesaria para crecer, a la vez que la bacteria fija el nitrógeno para el suplemento de la planta (Ibarra, 2010; Paredes, 2013). Éste tipo de bacterias, no sólo son capaces de usar el nitrógeno atmosférico, sino que también pueden revertir o reducir la degradación del suelo (Calvo, 2011; Rojas, 2008).

No obstante, si bien cada una de las especies bacterianas presentes en el suelo e involucradas en este proceso, cumplen un rol indispensable, las investigaciones llevadas a cabo, aseguran que son las bacterias simbióticas, las más eficaces (Mayz-Figueroa, 2004; Cecilia, *et al.*, 2007), puesto que emplean estructuras especializadas llamadas “nódulos radicales”, los cuales permiten una mejor asimilación de Nitrógeno por parte de la planta, contribuyendo así a la mejora en la productividad de los cultivos (Baca, *et al.*, 2000; Durán, *et al.*, 2010).

Entre las especies capaces de establecer relaciones simbióticas con la planta y que tienen la facultad de fijar el nitrógeno, se pueden citar a *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*, las mismas que también se las considera dentro del grupo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal debido al efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas (Ibarra, 2010; Mayz-Figueroa, 2004). De hecho, las recientes investigaciones relacionadas con este tema, han logrado determinar que el número de este tipo de bacterias es mayor en la rizósfera, a consecuencia de que la raíz de la planta excreta exudados, los cuales constituyen un medio óptimo y un ambiente nutricional enriquecido, que favorece el crecimiento bacteriano (Calvo, 2011; Rojas, 2008).

De estos mismos ensayos experimentales, se ha logrado esclarecer cuales son los mecanismos fisiológicos adicionales que aportan las bacterias simbióticas, hoy se conoce que si bien el efecto benéfico que aportan estos organismos, es en parte debido al nitrógeno asimilable que proveen a las plantas, también tienen la capacidad de producir fitohormonas, como auxinas, giberelinas y citocianinas, que son compuestos que promueven en gran medida, el desarrollo radicular (Mayz-Figueroa, 2004; Yepis, *et al.*, 2000; Ibarra, 2010). Adicionalmente, la colonización de este tipo

de bacterias, permite una mejor absorción de nitratos por parte de la planta, debido a la prolongación del crecimiento de la raíz (Paredes, 2013; Cecilia, *et al.*, 2007).

1.4.5. Actinomicetos

Los actinomicetos son bacterias filamentosas Gram positivas, que se encuentran colonizando casi la mayoría de ecosistemas: terrestres, acuáticos y aéreos. En un principio, se catalogaba los actinomicetos como hongos, esto debido a las características macroscópicas de su crecimiento, como la presencia de un micelio y la formación de tejidos en forma de filamentos o masas esponjosas (Franco, 2008; Quiñones-Aguilar, 2016).

No obstante, hoy en día, gracias al empleo de técnicas biológicas y moleculares avanzadas y estudios realizados, se ha logrado determinar que son bacterias, principalmente por su naturaleza procariótica (González Y. , 2010), a la cual se le suman otras características peculiares, como la producción de antibióticos y concentración de las bases de Guanina y Citocina en su DNA, que permiten a los actinomicetos considerarse como un grupo bacteriano independiente (Quiñones-Aguilar, 2016).

La mayoría de los actinomicetos presentes en el suelo, son saprófitos de vida libre y pueden llegar formar parte del 10 – 50% de la microbiota rizosférica (Ramos J. , 2009). Este porcentaje, depende en gran medida de las condiciones físico – químicas del suelo, (pH, textura, humedad, temperatura y presencia de materia orgánica), para su supervivencia (González Y. , 2010; Franco, 2008). Hasta la fecha, se ha determinado que estos organismos son indirectamente proporcionales a la concentración de contaminantes en el suelo, así, a mayor contaminación del suelo, menor será la concentración de actinomicetos presentes (Coyne, 2000).

Generalmente, los actinomicetos son organismos aerobios sin embargo existen especies anaerobias, son ubicuos y heterótrofos (Ramírez, 2000). Principalmente pueden encontrarse la rizósfera de suelos húmedos, aunque las esporas de actinomicetos pueden llegar a tolerar condiciones extremas de sequedad (Quiñones-Aguilar, 2016). En cuanto al pH, prefieren ambientes alcalinos, aunque existen excepciones de especies de actinomicetos presentes en tierras volcánicas así

como también actinomicetos acidófilos que pueden subsistir en un rango de pH de 3.5 a 4.5 (Moreira, *et al*, 2012; Franco, 2008).

Una de las particularidades de estos organismos, es la producción de un metabolito denominado ‘geosmina’, al cual deben la propiedad de su olor a tierra mojada (González Y. , 2010). Además de ello, otra característica propia es su elevada actividad metabólica, gracias a la cual son capaces de degradar una gran cantidad de substratos carbonados provenientes de materia orgánica de origen vegetal y animal, debido a sus propiedades quitinolíticas y a que son grandes productores de terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares (Coyne, 2000; Moreira, *et al.*, 2012; Quiñones-Aguilar, 2016).

Si bien los actinomicetos, cuentan con una gran variedad de géneros y especies, los más representativos son *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Micromonosporas*, *Streptosporangium*, *Chainia*, *Agromyces*, *Rhosococcus*, *Thermo-actinomyces*, *Frankia*, los cuales tienen la capacidad de fijar nitrógeno y *Streptomyces*, que se caracterizan por producir antibióticos. Estos últimos, pueden llegar a representar hasta un 90% de la población de actinomicetos en la rizósfera (Coyne, 2000; Franco, 2008).

Entre las principales funciones llevadas a cabo por los actinomicetos, se pueden mencionar que (Coyne, 2000):

- Descomponen la materia orgánica, en cierto casos incluso, pueden degradar contaminantes y pesticidas
- Retienen nutrientes del suelo
- Evitan la erosión gracias a la formación de agregados del suelo
- Representan un eslabón importante en la cadena alimenticia, puesto que otros organismos se alimentan de éstos
- Tienen la capacidad de producir antibióticos, lo que impide la proliferación de organismos patógenos
- Algunas especies, están involucradas en la fijación biológica de nitrógeno.

1.4.6. Hongos del suelo

El equilibrio de la diversidad de la microbiota de los suelos centra su importancia en que es debido a éste, que se puede catalogar la calidad de un suelo para el cultivo, además que cuando se cuenta con una mayor diversidad microbiológica, mejor va a ser la capacidad del suelo a enfrentarse a condiciones de estrés (Burgos, 2014; Pfenning & Magalhães, 2012).

De los organismos presentes en el suelo, los hongos cumplen con importantes funciones de mineralización y reciclaje de nutrientes, así como también, intervienen en la descomposición de compuestos en moléculas simples, las cuales emplean para su nutrición, favoreciendo así la fertilidad del suelo (Moreira, Huisisng, & Bignell, 2012; Burgos, 2014). Asimismo, juegan un papel indispensable en la cadena alimenticia, puesto que sirven de alimento para otros organismos superiores y como dato importante, se puede mencionar que la diversidad de hongos no patógenos en los suelos, reduce el riesgo de las plantas de padecer enfermedades, al incrementar las defensas de la planta y favorecen la producción de sustancias antagónicas por parte de la misma, de ahí, que los hongos son catalogados como agentes de control biológico (García & Bello, 2004).

Los hongos son organismos pluricelulares eucarióticos y heterótrofos que se distribuyen en casi la totalidad de ecosistemas del mundo (Ramos J. , 2009). El reino Fungi, abarca una amplia variedad taxonómica de grupos, géneros y especies, que pueden llegar a diferir enormemente, entre una especie y otra. En general, los hongos presentan ciertas características como la presencia de filamentos denominados hifas, las cuales en ciertos casos, se encuentran divididas o canalizadas por una estructura de tabiques, conocidos como septos (Burgos, 2014). La unión y el entrelazado de las hifas forman los micelios, los cuales pueden variar según la especie (Morales, 2009). En cuanto a su reproducción, ésta puede ser sexual o asexual, pero en cualquier caso será mediante esporas (Grant & Long, 2008).

Al igual que todos los organismos de la biósfera, los hongos requieren de ciertas propiedades y condiciones ambientales para su óptimo crecimiento, entre estos factores, se puede mencionar el tipo de materia orgánica predominante en el suelo, lo que se puede entender como la especie o especies de plantas presentes,

puesto que van a ser éstas las que alberguen el ambiente adecuado para la colonización de los hongos y constituyan las fuentes energéticas de la supervivencia de los mismos (Burgos, 2014; Morales, 2009).

Otro de los factores a tomar en cuenta para la colonización fúngica es el pH y la temperatura. Si bien los hongos presentan una mejor adaptación a las variaciones del pH, el rango óptimo para su subsistencia, oscila entre 4 y 6. Por su parte, la temperatura ambiental óptima para el desarrollo de los hongos puede variar entre 15 a 35°C, aunque se han reportado especies fúngicas que pueden tolerar temperaturas de hasta 0°C y otras que pueden adaptarse en ambientes de hasta 60°C (García & Bello, 2004; Burgos, 2014).

Del mismo modo, el porcentaje de humedad del suelo, representa un factor crítico en el hábitat de los hongos, puesto que, si bien éste es vital para la proliferación de estos organismos, en condiciones excesivas, se dificulta la difusión del oxígeno, evitando así la colonización de hongos aerobios y por consiguiente la supervivencia de otros organismos que dependen de éste tipo de hongos (Pfenning & Magalhães, 2012).

Adicionalmente, es importante citar que en ciertos casos, la presencia de los mismos hongos puede resultar desfavorable para la colonización de otros hongos, si bien no de su misma especie, sí de otros organismos benéficos; esto se da principalmente, porque ciertas especies fúngicas, como los Ascomicetos, pueden producir compuestos inhibitorios para otras especies, como son los antibióticos, el etileno u otros compuestos, que impiden la proliferación de la biota normal (Burgos, 2014).

El suelo puede llegar a contener una importante cantidad de hongos de diferentes géneros y especies, de hecho, en ciertos casos, estos organismos debido a su tamaño, constituyen un amplio porcentaje de la biomasa microbiana en el volumen del suelo (Pfenning & Magalhães, 2012).

Según la forma de alimentación que tienen los hongos, es decir el medio por el cual estos organismos obtienen la energía necesaria para su supervivencia, se ha podido distinguir tres grupos principales (Grant & Long, 2008; Morales, 2009):

Hongos saprófitos. Los cuales obtienen su energía de la degradación de la materia orgánica muerta, como tejidos vegetales en descomposición, madera, humus, etc., convirtiéndola en moléculas pequeñas, dióxido de carbono y biomasa fungal, es decir una fuente de energía apta para este tipo de hongos (Coayne, 2000; Rodríguez M. , 2001). La importancia de estos hongos, radica en que muchos de ellos degradan sustratos complejos de la madera y compuestos orgánicos de ciertos contaminantes, lo que favorece a la inmovilización y retención de nutrientes en el suelo (Burgos, 2014).

Hongos parásitos o patógenos.- que se caracterizan por desarrollarse en los tejidos de los organismos vivos y por consiguiente, desencadenan enfermedades e incluso ocasionar la muerte en el individuo (Ramos J. , 2009; Pfenning & Magalhães, 2012). Los hongos de este tipo que afectan a las plantas son conocidos como fitopatógenos y pueden llegar a ser la causa principal de las pérdidas de los cultivos vegetales (Arias & Piñeros, 2008).

De este grupo, algunas de las especies tienen una amplia adaptación a varios ambientes, otros sin embargo, son bastante selectivos en cuanto a los organismos que infectan, por lo que su propagación se ve limitada (Rodríguez M. , 2001). En este aspecto, los hongos pueden dividirse en parásitos obligados, parásitos facultativos o saprófitos facultativos (García I. , 2011).

Hongos simbiotes.- Son los que tienen una estrecha relación con el organismo al que infectan pero además de ello generan un beneficio en el individuo, de forma que tanto el hongo como el organismo infectado, se ven beneficiados por esta relación (Barrer, 2009). Ciertos hongos pueden colonizar al organismo, conservando su estructura inicial, otros sin embargo, dan orígenes a otras morfologías (Burgos, 2014; Moreira, *et al.*, 2012). En cuanto a los hongos simbiotes que infectan a las plantas (micorrizas), éstos colonizan las raíces de la planta mientras obtienen los exudados radicales, los cuales emplean para su nutrición. Las plantas por su parte, se ven beneficiadas, ya que estos hongos intervienen en la solubilización del fósforo, la captación de nutrientes, que posteriormente serán asimilados por las plantas y la producción de fitohormonas como auxinas y giberelinas. Adicionalmente, estos hongos descomponen sustancias tóxicas para la

planta y su colonización mejora la calidad del suelo (Pérez, *et al.*, 2011; Alarcón & Ferrera, 2000).

En cuanto a los géneros predominantes que se encuentran en el suelo se pueden citar a (Giri, Huong, Kumari, Prasad, & Varma, 2005; Arias & Piñeros, 2008): *Aspergillus*, *Acrostalagmus*, *Acremonium*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Gliocladium*, *Monilia*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Spicaria*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Verticillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Pillularia*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Zygorynchus*, *Pythium*, *Chaetomium* y *Rhizoctonia*.

1.4.7. Hongos micorrícicos

El término micorriza fue empleado por primera vez por el botánico alemán Albert Bernhard Frank, en 1885, viene de la voz griega ‘*miko*’ que significa hongo y ‘*rhiza*’ que significa raíz (Sánchez, 2009).

Los hongos micorrícicos son organismos pertenecientes al reino Fungi que se caracterizan principalmente por establecer asociaciones simbióticas mutualistas con una amplia variedad de plantas terrestres (Noda, 2009; Roldán, 1985). La infección de los hongos provee importantes beneficios a la planta huésped, a la vez que ésta, le proporciona al hongo los sustratos energéticos, nutrientes orgánicos y un nicho ecológico apropiado para la subsistencia de éste (Noda, 2009; Olivares & Barea, 2007)

Las micorrizas son tan antiguas como las plantas, de hecho, los registros fósiles datan su existencia desde aproximadamente 460 millones de años (González M. , 2005; Honrubia, 2009), tiempo en el que la relación hongo – planta se ha visto reforzada, principalmente por la evolución de cada organismo involucrado (Martín, 2011; Pérez, *et al.*, 2011; Roldán, 1985).

A pesar de ello, hasta la fecha, todavía son desconocidos ciertos aspectos de la relación simbiótica que se establece entre ambos individuos involucrados, principalmente en lo que se refiere al mecanismo de infección del hongo (Grant & Long, 2008; Pérez, *et al.*, 2011).

Los hongos micorrícicos presentan una ubicuidad bastante elevada, por lo que se distribuyen en casi la totalidad de ecosistemas acuáticos y terrestres (Morte, *et al.*, 2010). La mayoría de las plantas terrestres tienen la facultad de establecer por lo menos un tipo de relación simbiótica con hongos micorrícicos (Noda, 2009), aunque cerca del 96% de las plantas, forman las del tipo llamado Versículo-Arbuscular (Roldán, 1985).

Son numerosos los beneficios que otorga la colonización de hongos micorrícicos en la planta, aunque algunos de ellos, no se han logrado comprobar experimentalmente, debido a la poca facilidad que se tiene de cultivar estos hongos a nivel de laboratorio (Alarcón & Ferrera, 2000). Aun así, los beneficios generales y claramente conocidos que proporcionan las micorrizas son el incremento del volumen radicular de la planta, lo que permite una mayor extensión de las raíces en la rizósfera y facilita la captación de nutrientes (Pérez, Rojas, & Montes, 2011; Higa & Parr, 2013).

1.4.7.1. Tipos de micorrizas

Existe una amplia diversidad de hongos micorrícicos, los cuales difieren tanto en la morfología y la fisiología de las asociaciones micorrícicas con la planta a la cual infectan, por ello se clasifican en dos grandes grupos: Ectomicorrizas y Endomicorrizas (Fernández, 2008).

Aunque la clasificación más aceptada por varios autores, es la que señala la predominancia de tres principales tipos de micorrizas (Morte, Gutierrez , Dreyer, Torrente, & Honrubia, 2010; Martín, 2011; González M. , 2005):

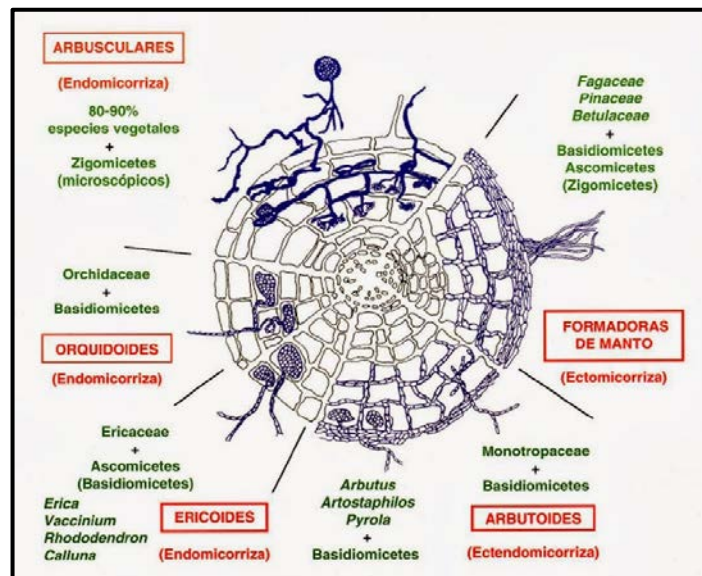


Figura 1. Estructura y desarrollo de los diferentes tipos de hongos micorrícicos

Fuente: (Neyoy, 2012)

Ectomicorrizas: Establecen una relación con la planta que no llega a penetrar las células vegetales de la raíz y las hifas del hongo se desarrollan en los espacios intercelulares, formando una especie de lámina denominada red de Hartig, la cual envuelve las células epidérmicas de la raíz y alrededor de ella, formando un entramado hifal denominado manto (González M. , 2005). Estas estructuras permiten el intercambio de nutrientes entre ambos organismos (González M. , 2007; Barrer, 2009). Este tipo de infección modifica principalmente a la morfología externa de las raíces y a su vez incrementa la cantidad de estructuras radicales, las cuales discurren en mayor extensión por la rizósfera (Martín, 2011).

Este grupo, incluye a los hongos Ascomycetes, Basidiomycetes y Plycomycetes y se ha visto su presencia principalmente en árboles y arbustos (Fernández, 2008)

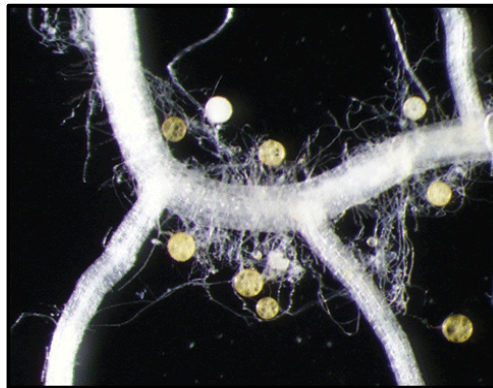


Figura 2: Raíces infectadas con ectomicorrizas

Fuente: (Blanco & Salas, 1997)

Ectendomicorrizas: Su principal particularidad es que comparten características tanto de las ectomicorrizas como de las endomicorrizas, por lo que en ciertos casos, se da la formación de una red de Hartig y en otras ocasiones, las hifas pueden atravesar la pared celular, para permitir el intercambio benéfico de nutrientes entre ambos individuos, pero a diferencia de las endomicorrizas, éstas no dan origen a estructuras vesiculares o de arbuscúlos (Franco, 2008; González M. , 2007). Su distribución en la naturaleza es bastante limitada, pudiéndolas encontrar solamente en ciertos árboles y arbustos (Martín, 2011).

- *Arbutoides:* Fernández, 2008, introduce esta división dentro de las endomicorrizas como un grupo independiente, aunque varios autores la incluyen como una subdivisión del tipo Ectendomicorrizas (Sánchez, 2009; Andrade-Torres, 2010). Su principal característica es que presentan un manto hifal y forman ovillos espirales dentro de las células epidérmicas (Fernández, 2008). Abarca hongos solamente del género Basidiomycetes e infecta a plantas del orden Ericales (Andrade-Torres, 2010; Fernández, 2008).
- *Monotropoides:* usualmente no son consideradas como un grupo independiente, se incluyen dentro de las ectendomicorrizas y se caracterizan por presentar un manto hifal y penetrar la célula con una estructura denominada haustorio, el cual no se ramifica (Fernández, 2008; Andrade-Torres, 2010). Los hongos de este subgrupo pertenecen al género Basidiomycetes e infectan a plantas de la familia Monotropaceae, perteneciente al orden Ericales.

Este tipo de micorrizas, se ha visto que infecta árboles principalmente de los géneros *Pinus* y *Picea* (Andrade-Torres, 2010).

Endomicorrizas: son las micorrizas más extendidas en la biósfera y pueden llegar a infectar a un promedio de 96% de las plantas vasculares (Honrubia, 2009; Roldán, 1985). Su característica principal es que las hifas de estos hongos se introducen en el tejido radicular y penetran en los espacios inter e intracelulares del parénquima subepidérmico de la raíz de la planta (Honrubia, 2009; Gonzáles M. , 2005; Sánchez, 2009). Estas a su vez, se subclasifican en tres tipos: Ericoides, Orquidoides y Arbusculares (Peña, *et. al.*, 2007; Sánchez, 2009)

- *Ericoides:* No tienen un manto hifal y cuando invaden las células radicales, forman ovillos espirales (Fernández, 2008). Se presentan en las plantas de la familia Ericácea, aunque con excepción de ciertos géneros (Sánchez, 2009). Los hongos que desarrollan este tipo de micorrizas pueden pertenecer a los phylo Ascomycota o Basidiomycota y se caracterizan por ser muy inestables en el empleo del nitrógeno y el fósforo (Franco, 2008; Sánchez, 2009).
- *Orquidoides:* Se forman en plantas de la familia *Orquidiaceae* y éstas dependen en gran medida de la simbiosis con el hongo para su germinación y crecimiento (Andrade-Torres, 2010). Los hongos formadores de este tipo de micorrizas pertenecen al phylo Basidiomycota (Fernández, 2008). Una vez que penetran en las células de la raíz, forman ovillos o estructuras denominadas haustorios sin ramificaciones dentro de la célula huésped, para posteriormente generar el intercambio de nutrientes (Andrade-Torres, 2010; Sánchez, 2009; Fernández, 2008).
- *Arbusculares:* este tipo de micorriza se forma en un 85% de las plantas vasculares y los hongos huéspedes pertenecen al phylo a los Zigomicetes, orden de los Glomales (Barrer, 2009). Son también conocidas como micorrizas vesículo arbusculares y se caracterizan por formar estructuras, en el interior de las células radicales, denominadas vesículas y arbusculos, los cuales son ramificaciones dicotómicas repetitivas (Andrade-Torres, 2010; Gonzáles M. , 2005; Roldán, 1985). Son las micorrizas más ampliamente conocidas, puesto que la mayoría de las plantas vasculares son capaces de albergar este tipo de hongos micorrícicos (Grant & Long, 2008; Andrade-

Torres, 2010; Ballesteros, *et al.*, 2004). Una vez que los HMA infectan a la planta, comienzan a elongar sus hifas, estimulando así, el aumento del suministro de nutrientes y minerales, casi insolubles, presentes en el suelo, lo que permite a la planta aumentar su tamaño, biomasa y producción de semillas, además de que la vuelve más resistente a la sequía y a plagas que afectan a la raíz (Betancourt, 2011). Asimismo, la presencia del micelio (conjunto de hifas) micorrícico, el cual produce una proteína denominada Glomalina, ayuda a la formación de agregados por medio de la adhesión de partículas, lo cual contribuye a dar estructura y estabilidad al suelo, mejora la capacidad de retención de agua y reduce la erosión (Ocampo, 2008).

En consecuencia, los HMA son potencialmente útiles para enfrentar problemas ambientales, por lo que en la actualidad son considerados como una excelente alternativa de biofertilizantes, bioprotectores y biorreguladores, (Ballesteros, *et al.*, 2004; Montaña, *et al.*, 2010).



Figura 3: Hongos micorrícicos arbusculares

Fuente: (Brunel, 2015)

1.4.7.2. Estructuras de los Hongos Micorrícicos Arbusculares

Este tipo de hongos presentan ciertas estructuras morfológicas especializadas, gracias a las cuales pueden ejercer los efectos mencionados en las plantas, entre las cuales se encuentran:

- **Hifas**

Son prolongaciones del hongo que en ciertos casos penetran la región meristemática y las células epidérmicas de raíces jóvenes, aunque también pueden difundirse sólo en los espacios intercelulares, o bien crecer sólo de forma intracelular, dependiendo del género del hongo y la planta huésped (Aguilera, *et al.*, 2007). Producen una glicoproteína llamada Glomalina, la cual tiene la función de recubrir a las hifas y protegerlas durante el transporte bidireccional de nutrientes, es decir, de la planta al hongo y del hongo a la planta (Borie, *et al.*, 2000; Grümberg, *et al.*, 2010)

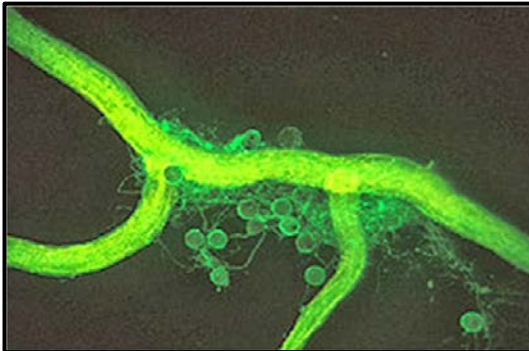


Figura.4: raíz cubierta de Glomalina y esporas de micorrizas (Neyoy, 2012)

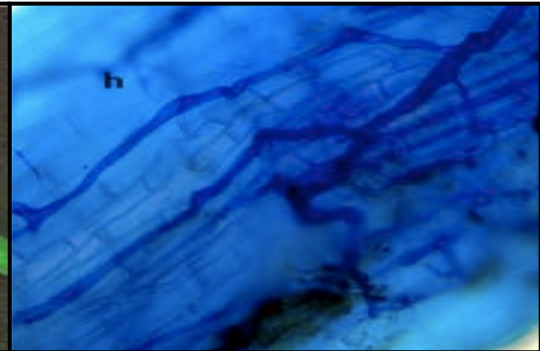


Figura 5: Micorriza arbuscular - hifas intracelulares Fuente: (Camargo-Ricalde, et al., 2012)

- **Arbúsculos**

Son estructuras especializadas que se ramifican y son capaces de penetrar las células corticales de la raíz, en donde va a ocurrir el intercambio nutrimental y de carbono entre ambos individuos (Noda, 2009; Aguilera, *et al.*, 2007). Son del tamaño de una mitocondria y su vida aproximada es muy corta, pudiendo oscilar entre cuatro a quince días, después de lo cual colapsa y se reabsorbe en el citoplasma del hongo o de la célula vegetal (Carling & Brown, 1982; Ballesteros, *et al.*, 2004; INVAM, 2016).

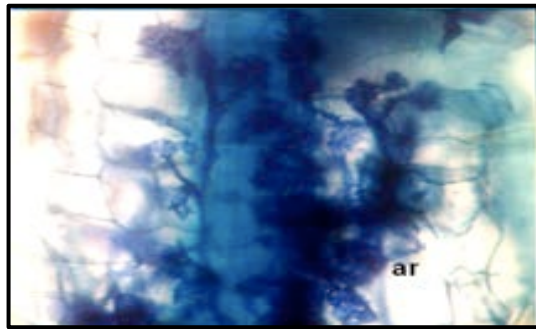


Figura 6: Micorriza Arbuscular – estructura de un arbúsculo

Fuente: (Camargo-Ricalde, et al., 2012)

- **Vesículas**

Son estructuras globulares o esféricas que se forman en la parte terminal de la hifa; solo unos cuantos géneros como el *Glomus* son capaces de formar vesículas, en los cuales, las vesículas son las encargadas del almacenamiento nutricional (aceites y polifosfatos) para condiciones de estrés frente a la deficiencia de fósforo o nutrientes (Barrer, 2009; Roldán, 1985).

En ciertos casos, también cumplen con el papel de estructuras reproductivas de los hongos (Mukerji, 1996).

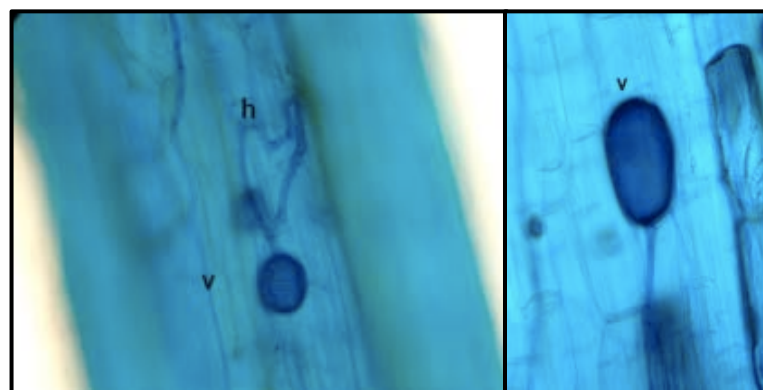


Figura 7: Micorrizas Arbusculares – estructura de una vesícula

Fuente: (Camargo-Ricalde, et al., 2012)

- **Micelio externo**

Está constituido por el conjunto de hifas principales del hongo, que se caracterizan por tener un mayor grosor y a medida que se van alejando de la raíz, se van ramificando dicotómicamente, conforme se va distanciando de la planta y se extienden más allá de la zona de agotamiento de nutrientes (Andrade-Torres, 2010).

Éste tejido es de gran importancia en la simbiosis, puesto que interviene en la absorción de fósforo y nutrientes (Mukerji, 1996; Hernández, 2001).

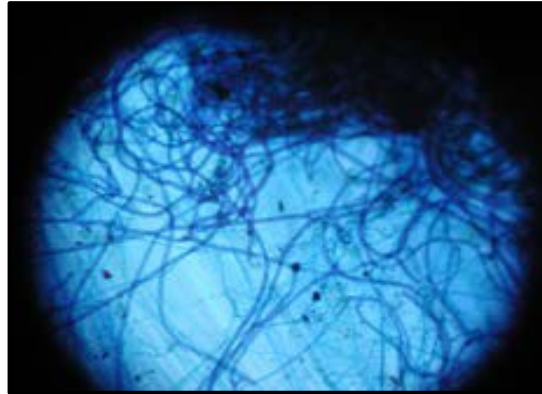


Figura 8: Micorrizas Arbusculares – estructura del micelio externo

Fuente: (Camargo-Ricalde, et al., 2012)

▪ **Esporas**

Son órganos de conservación sexual o asexual de las MVA (Micorrizas Vesículo Arbusculares) y se forman sobre el micelio externo, como un abultamiento de la hifa, siendo las únicas estructuras externas que permiten el reconocimiento del género y especie del hongo (Escobar, *et al.*, 1998).

Estas estructuras pueden ser de color blanco, amarillo o café, dependiendo del género y especie a la cual pertenecen, asimismo, su forma puede oscilar entre esférica u ovalada y su tamaño varía en un rango de 20 a 50 μ m y las más grandes entre 200 a 1000 μ m (Reyes, 2002). Cada espora posee una hifa de sustentación (Aguilera, *et al.*, 2007).

Se reconocen dos grupos principales de esporas micorrícicas: las Clamidosporas que incluyen a los géneros *Glomus* y *Sclerocystis* y se caracterizan por tener un origen asexual y las Azigosporas que son esporas formadas sexualmente y abarcan los géneros *Gigaspora*, *Acaulospora* y *Entrophospora* (Escobar, Zuluaga, Colorado, & Páez, 1998)

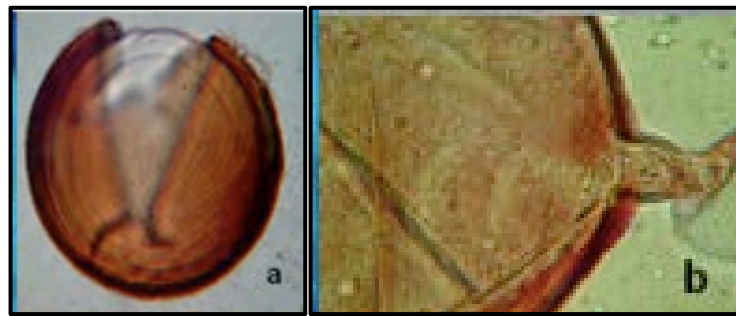


Figura 9: Micorrizas Arbusculares – estructura de una espora

Fuente: (Camargo-Ricalde, et al., 2012)

- **Coils**

Son acumulaciones de hifas intracelulares que se superponen, están encargadas de la absorción de compuestos carbonados desde la planta hacia el hongo (Smith & Smith, 1997; INVAM, 2016).

- **Apresorios**

Son apéndices especializados de las hifas del micelio externo que ejercen presión sobre la pared de la raíz de la planta, de forma que se facilita la penetración y colonización del hongo en el tejido vegetal (Aguilera L. , Olalde, Rubí, & Rogelio, 2007; Mukerji, 1996)

1.4.7.3. Ciclo de vida

El establecimiento general de la simbiosis entre la planta y el hongo incluye tanto el desarrollo de éste último antes de infectar la planta como la posterior colonización del tejido radicular (INVAM, 2016). Este proceso incluye distintas etapas:

- **Pre colonización**

Para que surja la infección del hongo micorrícico en la planta, se requiere la presencia de la estructura infectiva del hongo en el suelo. Una vez localizada la planta susceptible a la colonización, comienza la germinación de las esporas, período en el cual se incrementa la actividad metabólica de las mismas, lo cual permite el aumento de núcleos en la espora y la activación de genes específicos, necesarios en el establecimiento de la simbiosis (Bécard & Pféffer, 1993; García S. , 2006; Aguilera, et al., 2007).

Cuando la hifa del hongo se intercepta con la raíz de la planta huésped, se forma el apresorio que entra en contacto con los pelos absorbentes de las raíces (García S. , 2006). Bajo condiciones favorables la infección puede ocurrir en un tiempo de 2 a 3 días (Barrer, 2009; INVAM, 2016).

- **Colonización**

En esta etapa el hongo atraviesa la epidermis y la corteza de la raíz y se distribuye en ella, creciendo intercelular e intracelularmente, mientras se van formando y ramificando las hifas, el micelio interno, los arbuscúlos y en ciertos géneros, las vesículas (Reyes, 2002; Roldán, 1985).

El progreso de esta etapa depende tanto del ambiente edáfico, la especie vegetal y la infectividad del hongo, por lo que puede tardar entre 10 días e incluso varias semanas (Betancourt, 2011; García S. , 2006; Reyes, 2002).

- **Crecimiento en el suelo**

Simultáneamente a la colonización y crecimiento del hongo dentro de la raíz y formación de estructuras internas, las hifas externas se ramifican en el suelo, formando así el micelio externo del hongo (García S. , 2006; Reyes, 2002).

- **Reproducción**

Después del transcurso de un periodo que oscila entre 1 a 4 meses posterior a la colonización del hongo, éste comienza a reproducirse, mediante la formación de esporas asexuales en el micelio externo (Barrer, 2009). Las esporas son estructuras de resistencia que pueden perdurar latentes en el suelo, cuando no hay plantas huésped cercanas, a las cuales infectar (Reyes, 2002).

1.4.7.4. Beneficio de las micorrizas en las plantas

Gracias a los actuales avances tecnológicos y al progreso que ha demostrado la biotecnología, en las últimas décadas, actualmente se conoce gran cantidad de los beneficios que proporciona la simbiosis existente entre los hongos micorrícicos y las plantas capaces de albergarlos. Entre algunos de los beneficios generados por la colonización de micorrizas, se puede mencionar algunos como:

- Permitir una mayor superficie de contacto entre la tierra y el sistema radicular (infectado por hongos micorrícicos), en vista de que las hifas micorrícicas se prolongan en la tierra, captando más nutrientes para la planta y estimulando a su vez su crecimiento (Blanco & Salas, 1997; Martín, 2011).
- Aumentar el aporte de nutrientes para la planta, puesto que estos hongos tienen la facultad de captar nutrientes, como el nitrógeno y el fósforo, y volverlos asimilables para la planta. Por lo que en el caso de no existir la presencia del hongo, no estarían disponibles para las plantas (Sánchez, 2009).
- Existen referencias de que la colonización de la raíz por hongos micorrícicos, mejora el sistema de defensa de la planta y brinda protección frente a nematodos y hongos parasitarios (Roldán, 1985; Domínguez, 2002).
- La presencia de hongos micorrícicos, modifica las poblaciones microbianas del suelo, lo cual mejora el desarrollo vegetal (Andrade-Torres, 2010).
- Modifican favorablemente la morfología radicular, que incluye el sistema vascular de la planta y por consiguiente mejora el transporte alimenticio (Cuenca, *et al.*, 2007; Martín, 2011).
- Cumplen su papel en la cadena alimenticia, puesto que las hifas de hongos micorrícicos constituyen una fuente de sustento importante para algunos invertebrados del suelo (Domínguez, 2002).
- La prolongación de las hifas de los hongos mejora la estructura y la calidad del suelo, evitando así la erosión (Fernández, 2008).
- Actualmente, la inoculación de hongos formadores de micorrizas, es una técnica biotecnológica ampliamente conocida por incrementar el crecimiento de muchas especies de plantas (Pérez, *et al.*, 2011).

1.4.7.5. Factores que afectan la simbiosis

Lamentablemente hasta la fecha, el intento de propagar e inocular hongos micorrícicos en el laboratorio, empleando medios de cultivo, ha sido infructuoso, por lo que la bibliografía sugiere que estos hongos son simbioses obligados de las plantas (Alarcón & Ferrera, 2000). Por su parte, existen una serie de factores a tomar en cuenta en el momento de evaluar la eficacia de la infección de estos organismos, puesto que una gran cantidad de ensayos experimentales, revelan que tanto el grado de dependencia que tenga una planta por las micorrizas, las propiedades del suelo

(como pH, temperatura y concentración de nutrientes) y la especificidad que tenga el hongo hacia la planta, van a tener una elevada influencia en el éxito de la simbiosis y los beneficios obtenidos (Olivares & Barea, 2007; Ballesteros, *et al.*, 2004; Roldán, 1985). Debido a esto, es necesario que para implementar los HMA como una alternativa de biofertilizar, primero hay que considerar los factores imperantes que pueden dificultar la infección del hongo y causar efectos no deseados en los cultivos, como la colonización de hongos patógenos (Cuenca, *et al.*, 2007).

1.4.8. Ajo

El ajo, *Allium sativum*, es una planta monocotiledónea, perteneciente al orden *Liliflora*, familia *Liliácea*, subfamilia *Allioidea*, género *Allium*, especie *sativum L.* (Guatapi, 2010). Se caracteriza por ser perenne, bulbosa y porque su tallo está cubierto por sus hojas, las cuales tienen forma alargada, plana y delgada. El ajo en gastronomía, es ampliamente conocido y empleado como condimento para una gran cantidad de comidas, a las cuales les da un sabor característico (Romaní, 2008). La parte de la planta de ajo que se emplea, son los bulbos radicales, que contienen un promedio de 8 a 10 bulbillos (Córdova, 2010; Japón, 1984), los cuales en su interior son los que contienen, en mayor concentración, los compuestos activos de interés (Guatapi, 2010; Córdova, 2010).

Desde la antigüedad, esta planta ha sido empleada como un insecticida natural contra una gran cantidad de plagas vegetales como ácaros, babosas, áfidos, pulgones, bacterias, hongos y nematodos (Córdova, 2010). De hecho, ciertas especies de plantas como el ajo (*Allium sativum*), ají (*Capsicum frutescens*), higuera (*Ricinus comunis*), nim (*Azadirachta indica*) y otras, son empleadas como materia prima de varios insecticidas utilizados en la agricultura (Celis, *et al.*, 2008). El mecanismo de acción de los compuestos del ajo es causar trastornos digestivos en el insecto que lo ingiere, de forma que éste deja de alimentarse y muere (Arévalo, 2011).

El empleo de extractos de ajo u otros productos naturales en la agricultura, es una alternativa natural que además de brindar protección a los cultivos y producir alimentos de buena calidad, evitando la contaminación ambiental y la adición de sustancias químicas a los productos, que en cambio pueden resultar dañinas para los consumidores (Arévalo, 2011).

Adicionalmente el extracto de ajo es bastante biodegradable, por lo que no genera cambio de sabor, olor o color en los cultivos (Silva, *et al.*, 2002; Guatapi, 2010).

Las aplicaciones de ajo pueden realizarse mediante la elaboración de extractos, purines o maceraciones, puesto que los metabolitos involucrados en la acción protectora de la planta, son sistémicos y con gran capacidad de difusión, por lo que son absorbidos y transportados por todo el sistema vascular de la planta, brindando una efectiva acción insecticida o fungicida (Romaní, 2008). Otra de las ventajas que brinda el empleo de estos insecticidas es que, nunca un preparado natural, tiene la misma concentración de compuestos e ingredientes activos que otro, por lo que los insectos y plagas no llegan a desarrollar resistencia, a los componentes del bioinsecticida (Silva, Lagunes, Rodríguez, & Rodríguez, 2002).

Particularmente, el ajo es catalogado como un excelente bactericida y antiviral natural, ya que contiene un promedio de veinte componentes con propiedades antivirales y cerca de cuarenta metabolitos con acción antibacteriana (Arévalo, 2011). Entre los principales componentes se pueden citar aminoácidos como el ácido glutámico, arginina, leucina, lisina, valina, ácido aspártico, etc., y ciertos minerales como el potasio, calcio, fósforo, manganeso, entre otros (Martínez & Rivera, 2008).

Por su parte, entre los ingredientes activos principales, destaca la aliína que por acción de la enzima alinasa que se transforma en alicina, que es la responsable del olor característico y penetrante del ajo y cuando ésta se condensa, se transforma en ajoeno (Martínez & Rivera, 2008). Además cuenta con otros compuestos azufrados como disulfuro de alilo, trisulfuro de alilo, tetrasulfuro de alilo, cicloide de alitina y disulfato de dialil (Arévalo, 2011).

Los estudios realizados con extractos de ajo han demostrado la eficacia de este alimento en el tratamiento de ciertas especies de hongos como *Penicillium italicum*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Pythium sp.*, etc (Arévalo, 2011; Hanafy, *et al.*, 2012).

1.5. HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico de ajo (*Allium sativum*) promueve la proliferación de esporas de hongos micorrícicos arbusculares, los cuales a su vez potencian el crecimiento y desarrollo de las plantas y algunas bacterias rizosféricas benéficas.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PARTICIPANTES

La presente investigación fue financiada por el Laboratorio de Microbiología de Suelos del Departamento de Ciencias de la Vida perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Se contó con la colaboración de la Dra. María Emilia Medina como directora, el Ing. Pedro Romero como asesor de la parte estadística y la B. Sc.. Karina Ponce como docente revisora.

Los gastos extras y no presupuestados del proyecto, fueron financiados por la señorita Tesista, Nathaly Katherine Hernández Endara.

2.2. ZONA DE ESTUDIO

El proyecto fue llevado a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la carrera de Ingeniería en Biotecnología perteneciente al Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicada en Sangolquí, cantón Rumiñahui de la provincia de Pichincha.

El muestreo del suelo se realizó en los terrenos de cultivos de papas de la Hacienda El Prado, IASA I, ubicado en Sangolquí.

2.3. PERIODO DE INVESTIGACIÓN

El proyecto tuvo una duración de once meses, contados desde el mes de octubre del año 2015 hasta el mes de agosto de 2016.

2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el análisis de los resultados obtenidos en este proyecto de investigación se estableció un Diseño Completamente al Azar, con un arreglo factorial de $2 \times 2 \times 3$, para lo cual se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA) para conocer la variación e interacciones de los tratamientos establecidos. Del mismo modo, se empleó el test Duncan con un $p \leq 0.05\%$, debido a que esta prueba permite realizar comparaciones entre las medias de cada uno de los tratamientos.

Los factores evaluados fueron:

Factor 1: concentración del extracto de ajo (%)

- M0: 0 % de extracto de ajo.
- M1: 0,1 % de extracto de ajo.
- M2: 0,5 % de extracto de ajo.

Factor 2: sustratos.

- T0: Sustrato (Inóculo micorrícico + Tierra negra estéril + Turba)
- T1: Sustrato (Inóculo micorrícico + Tierra negra estéril + Turba) + Semillas de Avena.
- T2: Sustrato (Inóculo micorrícico estéril + Tierra negra estéril + Turba) + Semillas de Avena.
- T3: Sustrato (Inóculo micorrícico estéril + Tierra negra estéril + Turba)

La Interacción entre cada uno de los dos factores, dio lugar a doce tratamientos, que se muestran en la Tabla 1 y 2.

Tabla 1.-

Interacción de las composiciones del sustrato y concentraciones del extracto de ajo, según cada tratamiento

COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE AJO (%)		
	0	0,1	0,5
Sustrato (Inóculo micorrícico + Tierra negra estéril + Turba)	0	0,1	0,5
Sustrato (Inóculo micorrícico + Tierra negra estéril + Turba) + Semillas de Avena	0	0,1	0,5
Sustrato (Inóculo micorrícico estéril + Tierra negra estéril + Turba) + Semillas de Avena	0	0,1	0,5
Sustrato (Inóculo micorrícico estéril + Tierra negra estéril + Turba)	0	0,1	0,5

Tabla 2:**Descripción de los tratamientos empleados en el ensayo**

N°	TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DE CADA TRATAMIENTO
1	MiSu _e Tu -P ₀ - A ₀	35% Inóculo micorrícico + 35% Suelo negro estéril + 30% Turba
2	MiSu _e Tu -P ₀ - A _{0.1}	35% Inóculo micorrícico + 35% Suelo negro estéril + 30% Turba + Extracto de ajo 0.1%
3	MiSu _e Tu -P ₀ - A _{0.5}	35% Inóculo micorrícico + 35% Suelo negro estéril + 30% Turba + Extracto de ajo 0.5%
4	MiSu _e Tu -P - A ₀	35% Inóculo micorrícico + 35% Suelo negro estéril + 30% Turba + semillas de avena
5	MiSu _e Tu -P - A _{0.1}	35% Inóculo micorrícico + 35% Suelo negro estéril + 30% Turba + semillas de avena + Extracto de ajo 0.1%
6	MiSu _e Tu -P - A _{0.5}	35% Inóculo micorrícico + 35% Suelo negro estéril + 30% Turba + semillas de avena + Extracto de ajo 0.5%
7	Mi _e Su _e Tu - P - A ₀	35% Inóculo micorrícico esterilizado + 35% Suelo negro estéril + 30% Turba + semillas de avena
8	Mi _e Su _e Tu - P - A _{0.1}	35% Inóculo micorrícico esterilizado + 35% Suelo negro estéril + 30% Turba + semillas de avena + Extracto de ajo 0.1%
9	Mi _e Su _e Tu - P - A _{0.5}	35% Inóculo micorrícico esterilizado + 35% Suelo negro estéril + 30% Turba + semillas de avena + Extracto de ajo 0.5%
10	Mi _e Su _e Tu - P ₀ - A ₀	35% Inóculo micorrícico esterilizado + 35% Suelo negro estéril + 30% Turba
11	Mi _e Su _e Tu - P ₀ - A _{0.1}	35% Inóculo micorrícico esterilizado + 35% Suelo negro estéril + 30% Turba + Extracto de ajo 0.1%
12	Mi _e Su _e Tu - P ₀ - A _{0.5}	35% Inóculo micorrícico esterilizado + 35% Suelo negro estéril + 30% Turba + Extracto de ajo 0.5%

2.4.1. Variables de Respuesta:

- Número de esporas micorrícicas por 100 gramos de suelo
- Porcentaje de micorrización de las raíces
- Peso fresco de la raíz
- Peso seco de la raíz
- Peso fresco de la planta
- Peso seco de la planta
- Bacterias totales
- Hongos totales
- Bacterias solubilizadoras de fósforo
- Bacterias fijadoras de nitrógeno

2.4.2. Operatividad de las variables

El análisis de cada una de las variables de respuesta antes mencionadas, se llevó a cabo mediante la determinación y observación de ciertos factores, los cuales se detallan en la Tabla 2.3.

Tabla 3:

Variables y factores a determinar del ensayo

VARIABLES	FATOR A DETERMINAR
Porcentaje de micorrización	Tinción radicular
Biomasa radicular	Peso fresco de la raíz
	Peso seco de la raíz
Biomasa foliar	Peso fresco de la planta
	Peso seco de la planta
Microbiota del suelo	Número de esporas micorrícicas por 100 gramos de suelo
	Número de bacterias totales (UFC)
	Número de hongos totales
	Bacterias solubilizadoras de fósforo
	Bacterias fijadoras de nitrógeno

2.5. METODOLOGÍA

2.5.1. Elección del inóculo micorrízico adecuado y toma de la muestra

Tanto el inóculo inicial de esporas micorrízicas así como la calidad del suelo que se emplea para el establecimiento de un estudio experimental, son de vital importancia, para analizar la eficiencia de los parámetros evaluados y plantear un alcance adecuado de la investigación. Por lo cual, se evaluaron diferentes suelos, con varios muestreos de distintos cultivos (de algunas zonas del valle de los chillos) para obtener un inóculo de micorrizas adecuado para realizar el ensayo (analizando la población de esporas micorrízicas por gramo de suelo).

Una vez seleccionado el inóculo, se llevó a cabo el muestreo definitivo, el mismo que se realizó en los terrenos de La Hacienda El Prado (IASA I), en los que existían cultivos de papa. Las muestras de suelo fueron tomadas en forma aleatoria, en una disposición de zigzag y a lo largo de toda la extensión del terreno. Se tomaron diez muestras de suelo a una profundidad de 10 a 15 cm desde la superficie y de las secciones más próximas a las raíces de las plantas.

2.5.2. Tratamiento de la muestra de suelo

El procesamiento del inóculo para la determinación del número de esporas micorrízicas se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de Suelos de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. Las muestras fueron homogenizadas y tratadas mediante la técnica de tamizado y decantación en húmedo con centrifugación, propuesta por Gerdeman y Nicholson (1993) y modificada por Herrera *et al.*, (2004).

Esta técnica se basa en una serie de pasos que incluyen la toma de una alícuota de 100 gr de suelo, a la cual se la trató con una solución de Peróxido de Hidrógeno al 1%, durante 45 minutos (Figura 2), con el fin de disgregar la muestra del suelo. Posteriormente se realizó un tamizado del suelo mediante el empleo de tres tamices sucesivos, cada uno con diferente tamaño de poro (500 μ , 150 μ y 45 μ), de forma que se obtienen tres fracciones (A, B y C) de la muestra.



Figura 10: Procesamiento de la tierra en peróxido de hidrógeno

La fracción A fue desechada, debido a que, en su mayoría, contenía una gran cantidad de impurezas como piedras diminutas y pequeñas raíces. A las fracciones B y C se licuaron y se filtraron al vacío, a fin de absorber la mayor cantidad de agua retenida. Ambas fracciones se dejaron secar durante 48 horas.

2.5.3. Observación y conteo de esporas de hongos micorrícicos

Una vez secas las dos fracciones, se determinó el peso de cada una y se las almacenó en un sobre de papel sellado. Para la observación de las esporas, se tomaron 3 repeticiones del 10% del peso total de la fracción B y 3 repeticiones del 5% del peso total de la fracción C. Cada una fue depositada en tubos Falcon y se les adicionó agua destilada, hasta alcanzar un volumen de 25 mL y una solución de sacarosa al 45 %, hasta un volumen de 35 mL. Acto seguido, se centrifugó cada fracción a 2500 rpm durante 3 minutos, a fin de poder separar las esporas micorrícicas, presentes en el sobrenadante, del resto del suelo.

Cada sobrenadante se hizo pasar por el tamiz de la fracción correspondiente, se enjuagó con agua destilada, para eliminar los residuos de sacarosa y se colocó en una caja Petri cuadrículada para facilitar el conteo, que se lo realizó mediante el empleo de un estéreo microscopio (Figura 2.2).

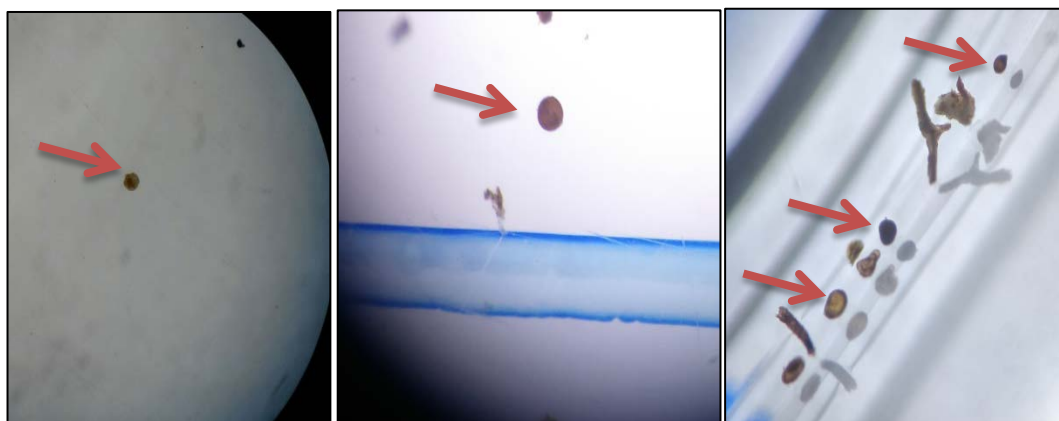


Figura 11: Esporas de hongos micorrícicos observados bajo el estéreo microscopio

Para la determinación del número total de esporas, se multiplicó la cifra de esporas obtenidas en la fracción B por 10 y la cifra de la fracción C por 20, se sumaron los dos valores obtenidos y así se obtuvo el número de esporas de micorrizas por cada 100 gramos de suelo.

2.5.4. Sustrato de propagación

Para el montaje del ensayo, se emplearon dos tipos de sustratos con la misma composición volumétrica (Tabla 2.3), que únicamente se diferenciaban uno del otro, en la esterilización del inóculo micorrícico, es decir uno contenía presencia de microorganismos y el otro no. Los tratamientos que incluyeron micorrizas, fueron del 1 al 6, los cuales variaban entre ellos en la presencia de planta (tratamientos 4, 5 y 6) y la concentración suministrada del extracto de ajo. Por su parte, los tratamientos que no incluyeron un sustrato micorrícico inicial (7 al 12), el inóculo micorrícico, fue sometido a un proceso de autoclavado, a una presión de 15 Psi, durante 30 minutos, puesto que Giampaoli, *et al.*, 2014, afirma que el método más empleado y efectivo de esterilización de tierra es el empleo de vapor húmedo. Del mismo modo, estos últimos tratamientos, diferían entre ellos en la presencia (Tratamientos 7, 8 y 9) o ausencia (Tratamientos 10, 11 y 12) de planta (Giampaoli, *et al.*, 2014). El diseño experimental del ensayo y especificaciones de cada tratamiento, se encuentra detallado en el punto 2.4.

Tabla 4:**Composición volumétrica del sustrato de propagación****Fuente: (Alarcón & Ferrera, 2000).**

Tipo de tierra	Porcentaje volumétrico
Tierra negra esterilizada	35 %
Turba PROMIX PGX	30 %
Inóculo de hongo micorrízico	35 %

2.5.5. Montaje del ensayo

Para el montaje del ensayo se emplearon macetas desechables de un litro de capacidad, en las cuales se colocó el sustrato de propagación mencionado, previamente homogenizado y en base a las diferencias establecidas de cada tratamiento, así, cada maceta contenía 230 g de suelo negro estéril, 50 g de Turba PROMIX PGX y 230 g del inóculo micorrízico, el cual difería en la presencia o ausencia de microorganismos, según el tratamiento correspondiente.

Para la siembra se utilizó la avena (*Avena sativa*), como ‘planta trampa’, que según Ruiz, *et al.*, 2014 y Dagoberto, 2010, han tenido mayor éxito especialmente en cultivos forrajeros, como avena, la cual es una buena planta propagadora de esporas de hongos micorrízicos arbusculares, comparada con algunas hortalizas.

Antes de la siembra, las semillas fueron desinfectadas con alcohol al 70% durante 5 minutos y enjuagadas con agua destilada (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1995). Se sembraron 35 semillas por maceta, a una profundidad promedio de 5 cm por debajo de la superficie del sustrato (Figura 2.3).

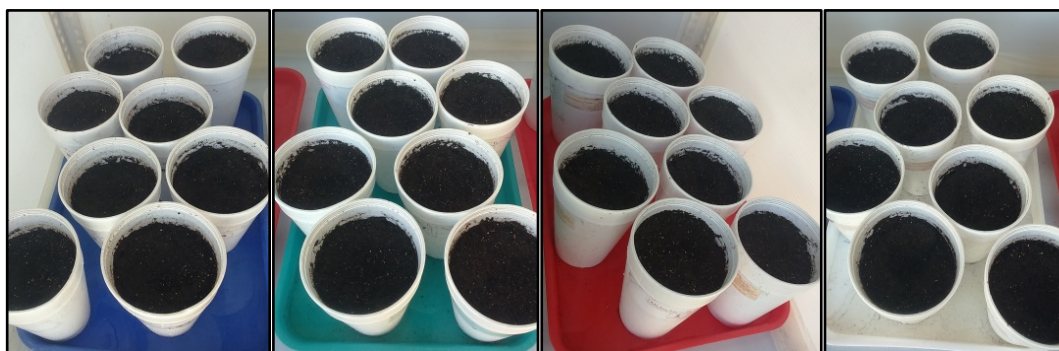


Figura 12: Montaje de los tratamientos del ensayo, en macetas desechables de 1 litro de capacidad

2.5.6. Mantenimiento nutricional del ensayo

El ensayo se mantuvo durante un período de 90 días. El primer mes, el riego se realizó con la aplicación de una solución nutritiva formulada por E. J. Hewitt en 1966 (Hudson, 1967).

La solución madre se compone de 5 soluciones stocks independientes, las cuales a su vez, abarcan una serie de reactivos necesarios para el buen desarrollo de las plantas y facilitar el reconocimiento simbiótico entre la planta y el hongo.

La composición tanto de cada solución Stock como de la solución madre se muestra en la Tabla 2.5 y Tabla 2.6.

Tabla 5:

Composición en g/L de las soluciones stock

SOLUCIÓN NUTRITIVA HEWITT		
Tipo	Composición	Solución madre (g/l)
I	KNO ₃	40,44
II	CaNO ₃ · 4H ₂ O	39
III	SO ₄ Mg · 7 H ₂ O	36,97
IV	Fe ₂ (SO ₄) ₃	2,784
	EDTA Sal disódica	3,724
V	MnSO ₄ · 4H ₂ O	2,23
	BO ₃ H ₃	3,09
	SO ₄ Zn · 2H ₂ O	0,288
	SO ₄ Cu · 5H ₂ O	0,25

Tabla 6:

Volumen en ml de cada solución stock para preparar un determinado número de litros de solución final.

Tipo	Composición	1 litro	5 litros	15 litros	20 litros
I	KNO ₃	10mL	50	150	200
II	CaNO ₃ · 4H ₂ O	20mL	100	300	400
III	MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 mL	50	150	200
IV	Fe ₂ (SO ₄) ₃ EDTA Sal disódica	10 mL	50	150	200
V	MnSO ₄ · 4H ₂ O H ₃ BO ₃ ZnSO ₄ · 2H ₂ O SO ₄ Cu · 5H ₂ O	1 mL	5	15	20

Finalizado este primer mes, el riego restante de las plantas fue realizado solamente con agua destilada, según las necesidades hídricas de las plantas.

El volumen de riego para cada maceta fue de 50 mL con una frecuencia de dos veces por semana, a fin de mantener la humedad apropiada para la planta (Arriaga, *et al.*, 1999).

2.5.7. Control de plagas

A fin de evitar el ataque de plagas e insectos como mosca blanca, áfidos, pulgones, entre otros, se cubrieron los cultivos con una protección plástica transparente con varios cortes longitudinales, por los cuales se suministraba la aireación y luz adecuadas.

Asimismo, de forma periódica, se realizó la limpieza y desinfección del estante en donde estaban ubicados los cultivos, con una solución de Hipoclorito de sodio al 10%.

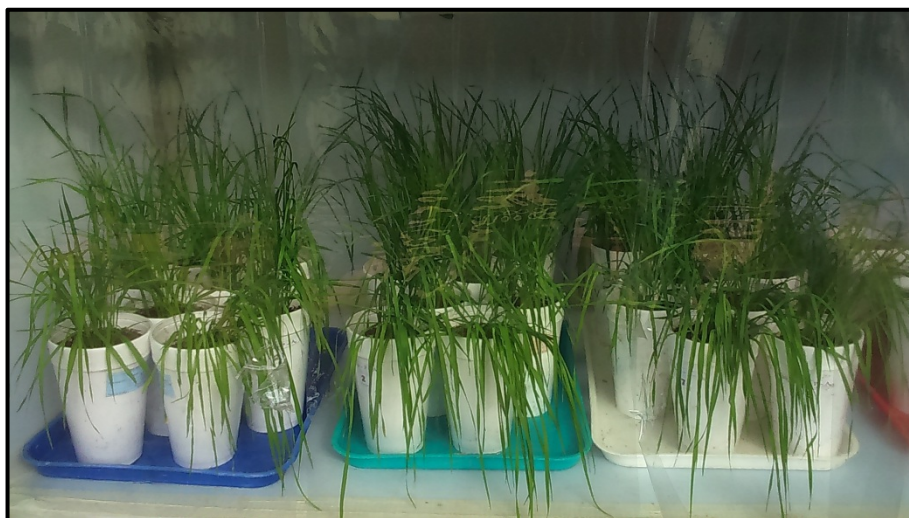


Figura 13: *Plantas de avena (Avena sativa), cubiertas por una lámina plástica, a fin de controlar el contagio por plagas*

2.5.8. Extracto hidroalcohólico de ajo, dilución y aplicaciones

El extracto hidroalcohólico de ajo se preparó utilizando 250 g de bulbillos de ajo los cuales se los trituro en una licuadora junto con un litro de alcohol potable.

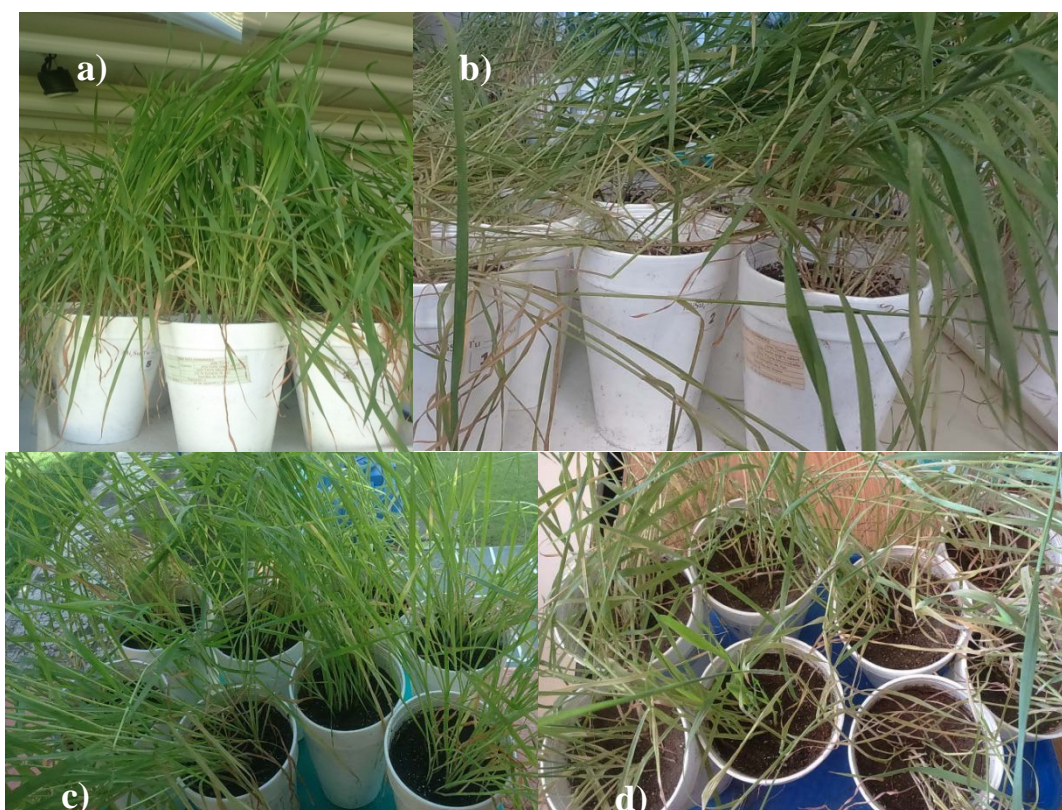
La mezcla se dejó macerar por 15 días, tiempo después del cual se filtró y se concentró en un rota-vapor a 40°C y 500 rpm (Li, Chen, Wang, Tian, & Zhang, 2009).

2.5.9. Levantamiento de ensayo

Transcurrido los 90 días de propagación se levantó el ensayo y se realizó la evaluación:

- Medición de la longitud radicular de las plantas.- se midió la longitud de la parte más larga de las raíces de cada planta.
- Medición del peso fresco total.- se pesó toda la planta inmediatamente después de levantar el ensayo.
- Medición del peso fresco radicular.- se pesó la raíz de la planta.
- Medición del peso fresco aéreo.- se pesó la parte aérea de la planta.
- Medición del peso seco total.- se pesó toda la planta, una vez que ésta estuvo seca.
- Medición del peso seco radicular.- se pesó la raíz de la planta, una vez que ésta estuvo seca.

- Medición del peso seco aéreo.- se pesó toda la parte aérea de la planta, una vez que ésta estuvo seca.
- Conteo de esporas de HMA del suelo.- de cada tratamiento se tomaron, cuatro muestras conjuntas, en las que se homogenizaron dos repeticiones. Cada una de las muestras de tierra, fueron procesadas como se describe en el apartado 2.5.3.
- Evaluación del porcentaje de micorrización.- se empleó el método de clareo y tinción (Phillips & Hayman, 1970) que consistió en:
 - a) Lavar, secar y coleccionar las raíces en casetes.
 - b) Estos casetes con las raíces, fueron sumergidos en agua oxigenada al 1% durante 1 minuto con el fin de disgregar las raíces, posteriormente se lavaron.
 - c) Se sumergieron en KOH al 10% con un calentamiento a Baño María a 90°C, durante 10 minutos, tiempo necesario para que la pared celular esté degradada. Una vez que las raíces se tornaron translúcidas, se desechó el KOH y se enjuagó.
 - d) Posteriormente se sumergieron en HCl 1N (sin calentamiento), durante 5 minutos y se desechó el HCl.
 - e) Se sumergieron los casetes en Azul de Tripiano 0.5%, en Baño María a 90°C, durante 12 minutos. se desechó el colorante y los sumergió en Lactoglicerol, durante 12 horas.
 - f) Finalmente, con la ayuda de una pinza quirúrgica y un bisturí, se colocaron 20 fragmentos de raíz (de 1.5 cm de largo aproximadamente), en un portaobjetos. Se cubrieron las mismas con cubreobjetos y se sellaron con esmalte de uñas transparente, en los bordes.
 - g) Con la ayuda del microscopio óptico ajustado a un campo de visión de 40X, se observó la presencia o ausencia de las hifas, vesículas y arbusculos, productos de la micorrización de las raíces.



a) y c) Tratamiento 5 (MiSueTu –P – A0.1), sustrato con micorrizas y 0.1% del extracto de ajo.
 b) y d) Tratamiento 8 (MieSueTu – P – A0.1), sustrato sin micorrizas y 0.1% del extracto de ajo.

Figura 14: Comparación del crecimiento de las plantas de avena (*Avena sativa*).

2.5.10. Análisis microbiológico del suelo

Para el análisis del número de bacterias y hongos totales presentes en el suelo y la presencia de bacterias nitrificantes y solubilizadoras de fósforo, se emplearon cuatro medios de cultivo diferentes, los cuales se detallan en la Tabla 2.7.

Tabla 7:

Medios de cultivo a emplear para el análisis microbiológico del suelo

PARÁMETRO	MEDIO DE CULTIVO
Número de bacterias totales	Agar nutriente
Número de hongos totales	Agar papa dextrosa con antibiótico Cloranfenicol
Bacterias solubilizadoras de fósforo	Medio de cultivo Ramos – Callao
Bacterias nitrificantes	Medio de cultivo Watanabe

Para el análisis microbiológico de las muestras, se realizó una siembra mediante el método de diluciones seriadas (Ramírez, 2000) en el que se tomaron 10 g de la muestra de suelo y se diluyó en 90 mL de solución salina. De esta solución obtenida (10^{-1}) se tomó 1 mL y se diluyó consecutivamente en tubos de ensayo con 9 mL de solución salina, hasta un total de siete diluciones.

Para el análisis de las bacterias totales, se empleó la técnica de vertido en placa, la misma que consistió en colocar 0.1 mL de las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7} en las cajas Petri vacías y posteriormente se dispensó en ellas 20 mL de agar nutriente. Este paso se realizó por triplicado. Posteriormente, cuando el medio se solidificó, las siembras fueron incubadas a una temperatura de 37 °C. El conteo se realizó a las 48 horas de incubación y los resultados se expresaron en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) (Camacho, *et al.*, 2009).

Del mismo modo, para el análisis de hongos totales, se empleó la técnica de extensión superficial. Se colocó 0.1 mL de las diluciones mencionadas en medio sólido de Agar papa – dextrosa (PDA). Las siembras fueron incubadas a 37 °C y se realizó el conteo y análisis respectivo a los 3 y 5 días, posteriores a la siembra. Del mismo modo, los resultados fueron expresados en UFC (Camacho, *et al.*, 2009).

Para la determinación de presencia de las bacterias solubilizadoras de fósforo y bacterias nitrificantes, se siguió el mismo procedimiento pero empleando los agares mencionados en la Tabla 7. El análisis de las siembras se realizó después de 72 horas y se determinó si el crecimiento bacteriano fue positivo o no.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. Elección del inóculo micorrícico

A fin de conseguir un suelo con una población adecuada de esporas micorrícicas, se llevó a cabo una serie de muestreos de distintos sectores del Valle de los Chillos y se analizó la población micorrícica de cada uno de ellos. Los resultados obtenidos de estos análisis se detallan en la Tabla 3.1.

Tabla 8:

Resultados del número de esporas de micorrizas obtenidas en los muestreos realizados, previo al montaje del ensayo

# Muestreo	Sector	Cultivo	# esporas / 100 g suelo	# esporas / g suelo
1	Santa Teresa	Maíz	460	4.6
		Maíz	390	3.9
		Papa	950	9.5
		Cebolla	1220	12.2
2	Cotogchoa	Cebolla	1260	12.6
		Apio	1180	11.8
		Papa	1350	13.5
3	IASA (Hacienda El Prado)	Papa	1510	15.1
		Quinoa	1100	11
4	Ecuaquímica	Papa	1090	10.9
		Papa	1170	11.7

En base a estos resultados, se seleccionó el suelo del IASA I, que tenía cultivos de papa.

3.2. Cuantificación de las esporas de HMA

En el muestreo de los suelos de papa de la Hacienda El Prado (IASA I), la población alcanzó un valor de 15.1 esporas micorrícicas por gramo de suelo, que es un valor

alto para iniciar el proyecto. Los valores obtenidos en cada una de las fracciones (B y C) del suelo, se muestran en la Tabla 3.2:

Tabla 9:

Número de esporas de micorrizas del suelo inicial

FRACCIÓN	N° de esporas en 100 g de suelo	N° de esporas en 1 g de suelo
B	250	2.5
C	1260	12.6
Total	1510	15.1

Para el montaje del ensayo (realizado como se describe en el punto 2.5.4 del capítulo 2) la población micorrícica inicial, en los tratamientos del 1 al 6, fue de 5.28 esporas por gramo de suelo, mientras que en los tratamientos 7 al 12, que fueron esterilizados, no contenían microorganismos.

Una vez transcurridos los 90 días del ensayo, se evaluaron los parámetros de respuesta, de los cuales se pudo obtener:

3.3. Longitud radicular de las plantas

La longitud radicular de las plantas proporcionó un coeficiente de variación de 8.33% con un p-valor de 0.002 lo que demuestra una diferencia significativa entre los tratamientos.

En la prueba estadística de Duncan al 5%, se determinó que los tratamientos que contenían micorrizas y ajo al 0.1% y 0.5% (T5 Mi-P-A_{0.1} y T6 Mi-P-A_{0.5} respectivamente), presentaron mejor desarrollo radicular en comparación con los demás tratamientos (Ver figura 15). En segundo lugar se puede ver que la diferencia entre las plantas que contenían micorrizas (T4 Mi-P-A₀, T5 Mi-P-A_{0.1} y T6 Mi-P-A_{0.5}) es significativa frente a las plantas no micorrizadas (T7 Mi_e-P-A₀, T8 Mi_e-P-A_{0.1} y T9 Mi_e-P-A_{0.5}), que obtuvieron la menor longitud de las raíces, como se puede ver en la figura 3.1.

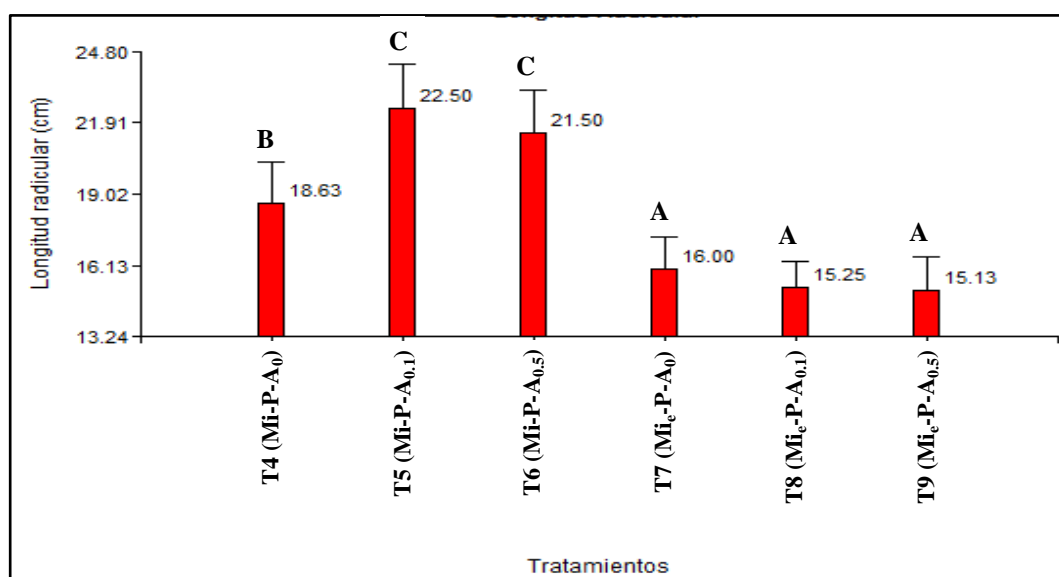


Figura 15: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, para evaluar el desarrollo de la longitud radicular de plantas de avena (Avena sativa).

3.4. Medición del peso fresco de las plantas

El peso fresco obtenido fue analizado de forma total y parcial, es decir, peso fresco de la parte aérea y radical.

3.4.1. Peso fresco radicular

La evaluación estadística de este parámetro, proporcionó un coeficiente de variación de 7.81%. Por su parte, el valor p para el factor sustrato, fue menor a 0.0001, lo cual indica un alto valor de significancia. Por el contrario, el valor p de la variable ajo, fue de 0.9052, que demuestra que no existe una diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de ajo.

La prueba estadística de Duncan al 5%, mostró que las plantas micorrizadas (T4 Mi-P-A₀, T5 Mi-P-A_{0.1} y T6 Mi-P-A_{0.5}) tuvieron un mayor peso fresco radical frente a las plantas no micorrizadas (T7 Mie-P-A₀, T8 Mie-P-A_{0.1} y T9 Mie-P-A_{0.5}) (Ver figura 16). No obstante, las variaciones existentes en las concentraciones de ajo, no fueron significativas entre los tratamientos.

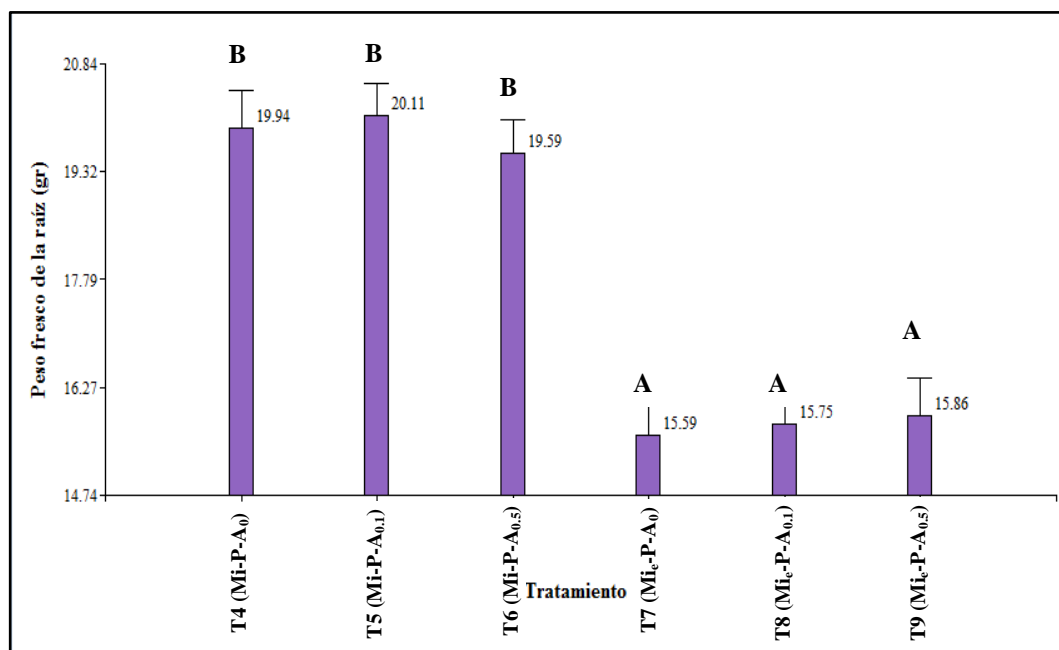


Figura 16: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el desarrollo del peso fresco radicular de plantas de avena (*Avena sativa*).

3.4.2. Peso fresco aéreo

El análisis estadístico de esta variable proporcionó un coeficiente de variación de 8.61%. El valor p para la comparación de presencia o ausencia de micorrizas, fue de 0.0012, mientras que para la concentración de ajo, el valor p fue menor a 0.0001, por lo que se puede asegurar que existen diferencias significativas en los dos factores.

El análisis del test Duncan al 5%, permitió determinar que el tratamiento con micorrizas y una concentración de ajo del 0.1% (T5 Mi-P-A_{0.1}), obtuvo el mejor desarrollo del peso fresco aéreo, con diferencias significativas, respecto a los demás tratamientos (Ver figura 17). Pero al aumentar la concentración de ajo al 0,5% en el tratamiento con micorrizas (T6 Mi-P-A_{0.5}), el peso fresco aéreo disminuyó, mostrando que al aumentar la dosis de ajo, se afecta negativamente el resultado de este parámetro. Además, se observa que en los tratamientos sin micorrizas (T7 Mi_e-P-A₀, T8 Mi_e-P-A_{0.1} y T9 Mi_e-P-A_{0.5}) se puede ver un comportamiento similar al incrementar la dosis de ajo al 0,5%, en los que también se redujeron los valores del peso fresco aéreo, mostrando que según la dosis de ajo que se utilice, se aumenta o se reduce este parámetro.

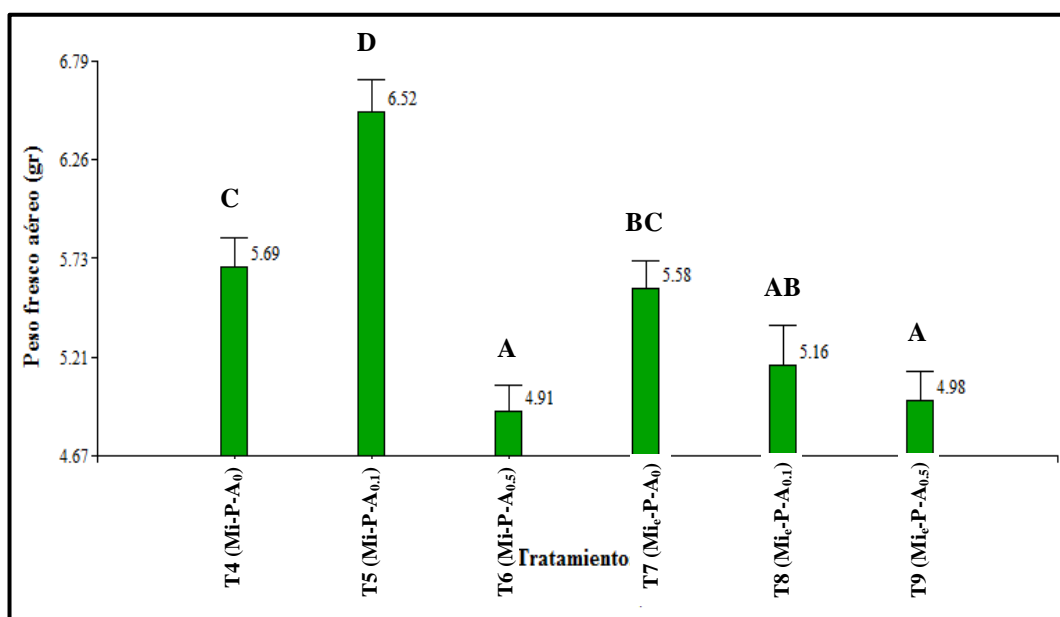


Figura 17: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el desarrollo del peso fresco aéreo de plantas de avena (*Avena sativa*).

3.4.3. Peso fresco total

En el análisis del peso fresco total de las plantas, se obtuvo un coeficiente de variación de 5.71% y para el tipo de sustrato, un valor p menor a 0.0001, lo cual indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos con micorrizas (T4 Mi-P-A₀, T5 Mi-P-A_{0.1} y T6 Mi-P-A_{0.5}) y los tratamientos sin micorrizas (T7 Mi_e-P-A₀, T8 Mi_e-P-A_{0.1} y T9 Mi_e-P-A_{0.5}) (Ver figura 18). Por su parte, el valor p obtenido en el análisis de las concentraciones de ajo, fue de 0.1593, lo cual indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, debido a las concentraciones de extracto de ajo.

Según el test Duncan al 5%, se demostró que los tratamientos con micorrizas tuvieron un mejor desarrollo del peso fresco total frente a los tratamientos que no contenían micorrizas. También se observa que tratamiento que contiene micorrizas y una concentración de ajo al 0.5% (T6 Mi-P-A_{0.5}) tiene un valor del peso fresco total menor que el resto de tratamientos con micorrizas, lo cual sugiere que la concentración de ajo, afecta negativamente cuando se incrementa la dosis.

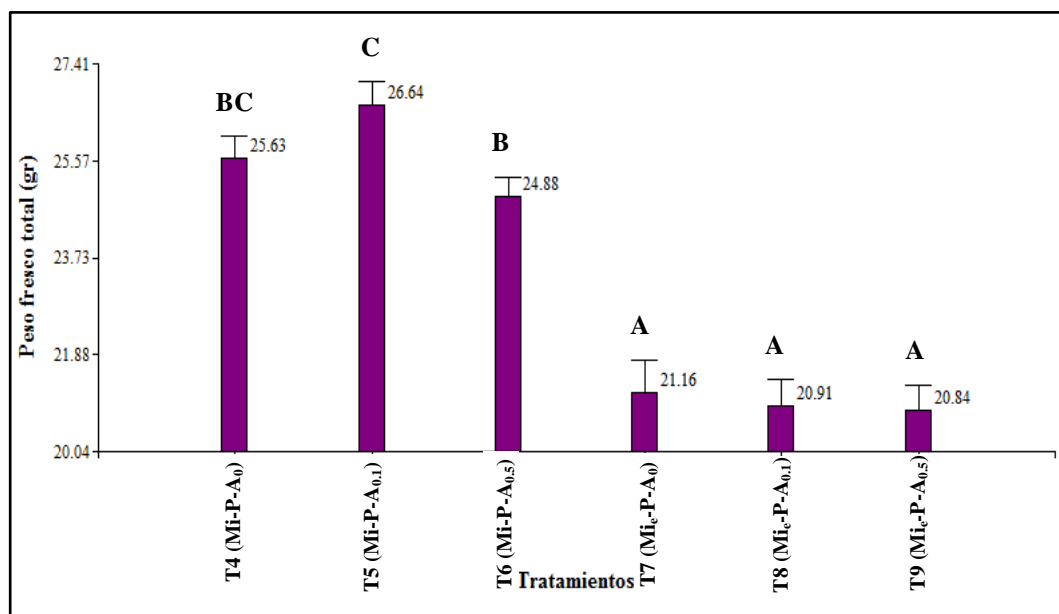


Figura 18: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el desarrollo del peso fresco total de plantas de avena (*Avena sativa*).

3.5. Medición del peso seco de las plantas

Del mismo modo que con el peso fresco, este parámetro también fue medido de forma parcial y total.

3.5.1. Peso seco radicular

El coeficiente de variación de este parámetro fue de 18.38%, con un valor p, para la variable sustrato, menor a 0.0001. Por su parte, el valor p, para la concentración de ajo, fue de 0.7834, de forma que se puede asegurar que las diferencias significativas existentes entre los tratamientos, se basan únicamente en la presencia o ausencia de micorrizas, y no en las concentraciones del extracto de ajo.

Según la prueba estadística de Duncan al 5%, los tratamientos que presentaron mayores valores del peso seco radicular fueron los que contenían micorrizas (T4 Mi-P-A₀, T5 Mi-P-A_{0.1} y T6 Mi-P-A_{0.5}), en comparación con los tratamientos sin micorrizas (T7 Mie-P-A₀, T8 Mie-P-A_{0.1} y T9 Mie-P-A_{0.5}) (Ver figura 19). No obstante, no se observaron diferencias significativas debido a las diferentes concentraciones de ajo.

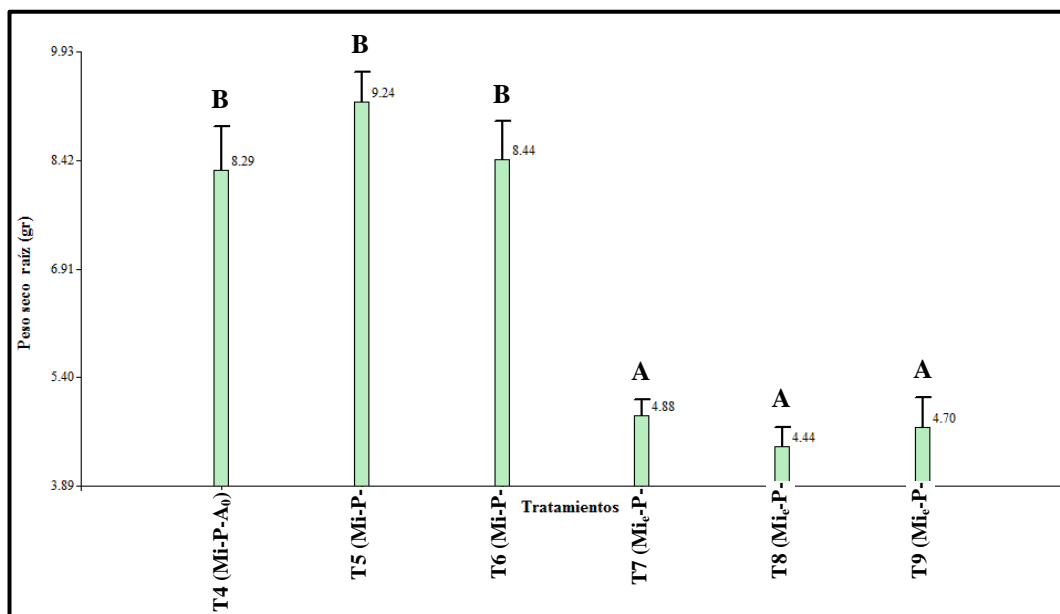


Figura 19: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el desarrollo del peso seco radicular de plantas de avena (*Avena sativa*).

3.5.2. Peso seco aéreo

El análisis estadístico del peso seco aéreo proporcionó un coeficiente de variación de 13.12%. El valor p para el tipo de sustrato, fue menor a 0.0001, lo que demuestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos, debido a la presencia o ausencia de micorrizas. Del mismo modo, para la concentración de ajo, se obtuvo un valor p de 0.0023, lo que sugiere que las concentraciones de ajo, también presenta variaciones significativas entre los tratamientos.

La prueba estadística de Duncan, mostró que los tratamientos que incluían micorrizas y ajo (T5 Mi-P-A_{0.1} y T6 Mi-P-A_{0.5}) tuvieron un mejor desarrollo frente a los demás tratamientos (Figura 20).

Por otra parte, los tratamientos sin micorrizas (T7 Mie-P-A₀, T8 Mie-P-A_{0.1} y T9 Mie-P-A_{0.5}) obtuvieron el menor desarrollo del peso seco aéreo y no fueron significativamente diferentes entre ellos.

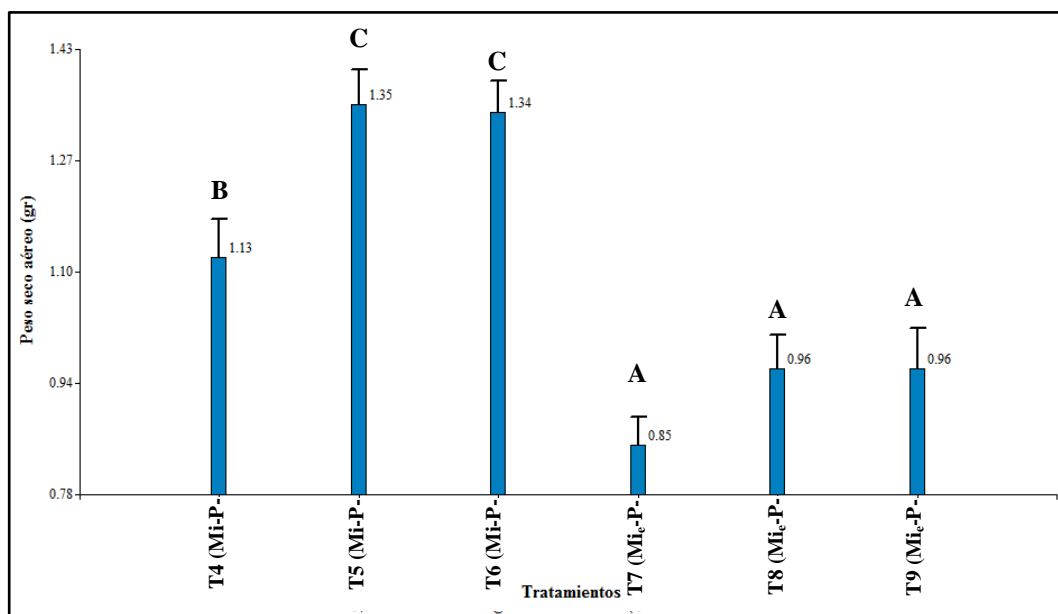


Figura 20: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el desarrollo del peso seco aéreo de plantas de avena (*Avena sativa*).

3.5.3. Peso seco total

La evaluación de este parámetro, proporcionó un coeficiente de variación de 16.08%. El valor p para el tipo de sustrato fue menor a 0.0001 pero para la concentración de ajo, se obtuvo un valor p de 0.6239, lo que demuestra que las diferencias significativas entre los tratamientos están dadas únicamente por la presencia de micorrizas.

Los tratamientos que contenían micorrizas (T4 Mi-P-A₀, T5 Mi-P-A_{0.1} y T6 Mi-P-A_{0.5}) tuvieron valores más elevados de peso seco total en comparación con los tratamientos que no incluían micorrizas (T7 Mi_e-P-A₀, T8 Mi_e-P-A_{0.1} y T9 Mi_e-P-A_{0.5}) en el inóculo inicial (Ver figura 21).

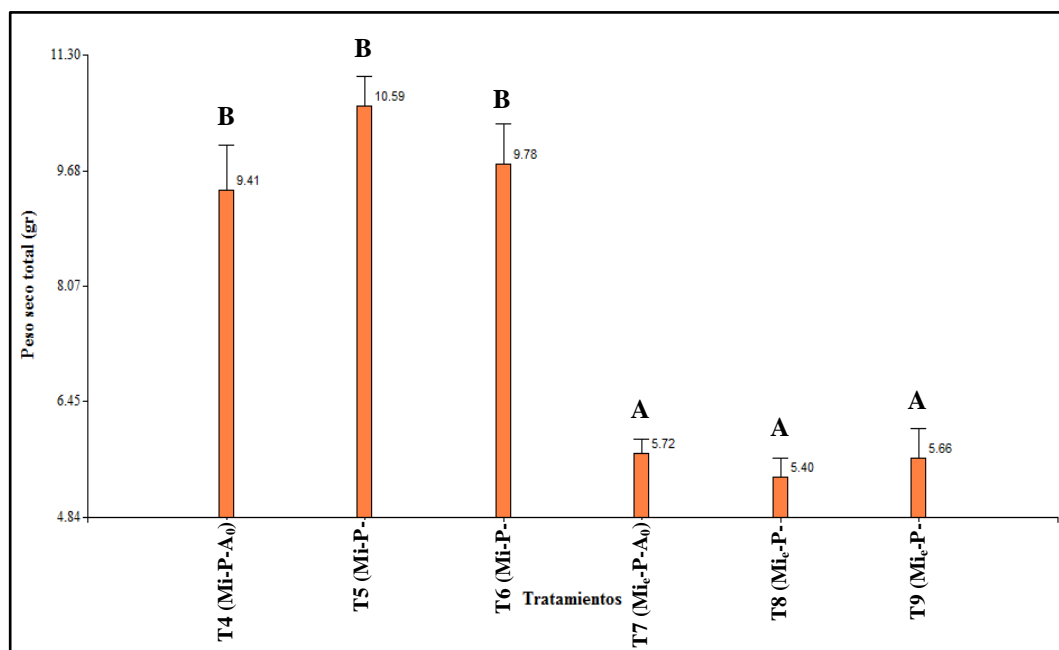


Figura 21: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el desarrollo del peso seco total de plantas de avena (*Avena sativa*).

3.6. Evaluación del porcentaje de micorrización de las raíces de las plantas

El análisis de varianza realizado para evaluar el porcentaje de micorrización de las raíces de las plantas obtuvo un coeficiente de variación de 2.56%. Adicionalmente, tanto para la variable tipo de sustrato como para la variable concentración de ajo, se obtuvo un valor p menor a 0.0001, lo cual indica que en ambos casos, existieron diferencias significativas.

En el test estadístico Duncan al 5%, se obtuvieron medias significativamente diferentes entre cada uno de los tratamientos evaluados. El tratamiento con micorrizas y ajo al 0.1% (T5 Mi-P-A_{0.1}) fue el que presentó un mayor porcentaje de micorrización seguido por el tratamiento con micorrizas y ajo al 0.5% (T6 Mi-P-A_{0.5}) y por último el tratamiento con micorrizas, sin ajo (T4 Mi-P-A₀) (Ver figura 3.8). Del mismo modo, los tratamientos sin micorrizas (T7 Mi_e-P-A₀, T8 Mi_e-P-A_{0.1} y T9 Mi_e-P-A_{0.5}), también presentaron diferencias significativas entre ellos y con el mismo comportamiento que los tratamientos micorrizados presumiendo que existió una contaminación de esporas en estos tratamientos.

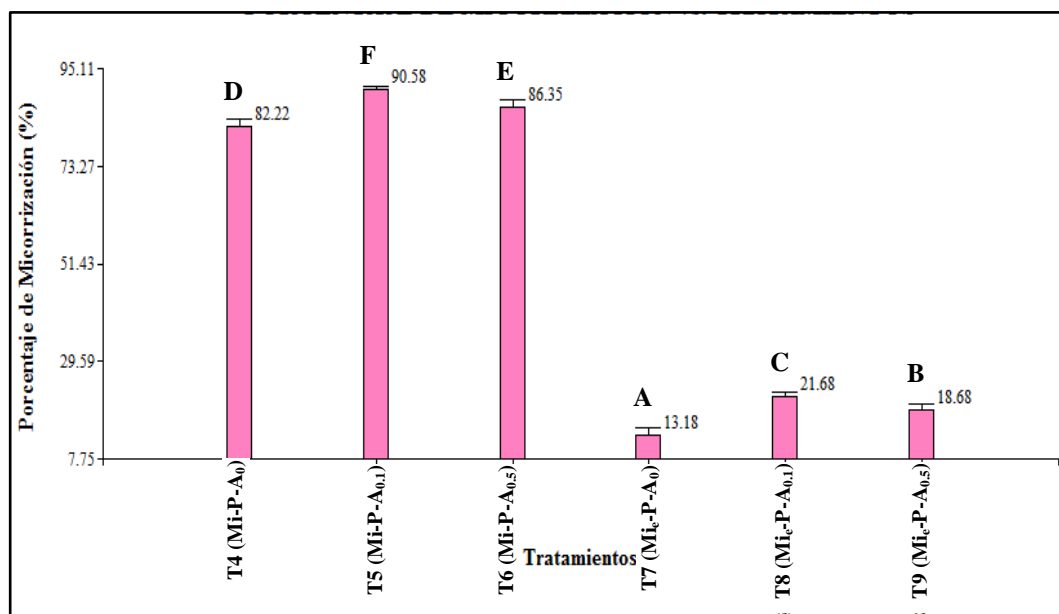


Figura 22: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el porcentaje de micorrización radicular de plantas de avena (Avena sativa).

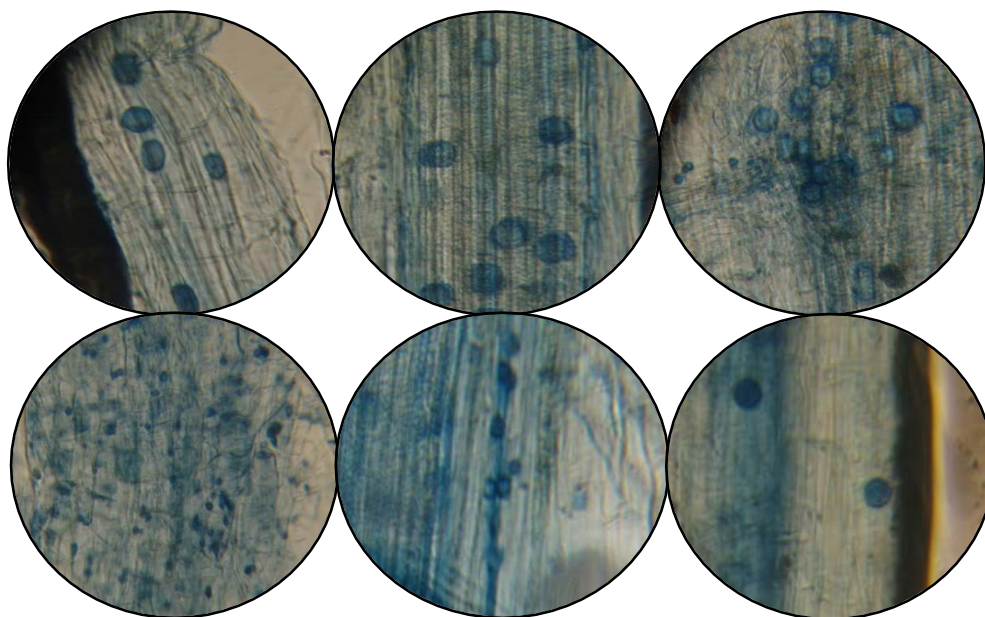


Figura 23: Fotografías tomadas con el microscopio óptico, de la tinción de raíces micorrizadas de los tratamientos que incluían plantas, micorrizas y ajo.

3.7. Número de esporas micorrícicas obtenidas al final del ensayo

En el análisis de esta variable, se tomaron en cuenta todos los tratamientos establecidos inicialmente, y no solamente los que contenían planta. Al realizar el

análisis de varianza, este arrojó un coeficiente de variación de 6.96%. Cada uno de los factores evaluados en el ensayo, como son el tipo de sustrato, la concentración de ajo y la presencia de planta, obtuvieron valores p por debajo del nivel de significancia de 0.05, por lo que se demuestra que existieron diferencias significativas entre los tratamientos, las cuales obedecían a todos los factores evaluados e incluso a la interacción de ellos.

En la figura 24 se puede apreciar que los mejores tratamientos fueron los que contenían plantas, micorrizas y ajo (T5 Mi-P-A_{0.1} y T6 Mi-P-A_{0.5}) frente a los que contenían plantas micorrizadas (T4 Mi-P-A₀). Entre los tratamientos con plantas de avena (*Avena sativa*), micorrizas y ajo, el que presentó la mayor población micorrícica fue al 0.1% (T5 Mi-P-A_{0.1}), seguido por el tratamiento con plantas de avena (*Avena sativa*), micorrizas, ajo al 0.5% (T6 Mi-P-A_{0.5}), mostrando así, que el extracto de ajo influye en el aumento del número de esporas.

En segundo lugar, se determinó que en los tratamientos que contenían plantas sin micorrizas (T7 Mi_e-P-A₀, T8 Mi_e-P-A_{0.1} y T9 Mi_e-P-A_{0.5}) obtuvieron una mayor población micorrícica en comparación con los tratamientos sin planta, esto se presume que se debió probablemente a una contaminación. Finalmente, en los tratamientos control que sólo incluyeron micorrizas sin planta (T1 Mi-P₀-A₀, T2 Mi-P₀-A_{0.1}, T3 Mi-P₀-A_{0.5}) se obtuvo una población micorrícica baja pero superior a los tratamientos control de sólo sustrato, sin micorrizas ni planta (T10 Mi_e-P₀-A₀, T11 Mi_e-P₀-A_{0.1} y T12 Mi_e-P₀-A_{0.5}).

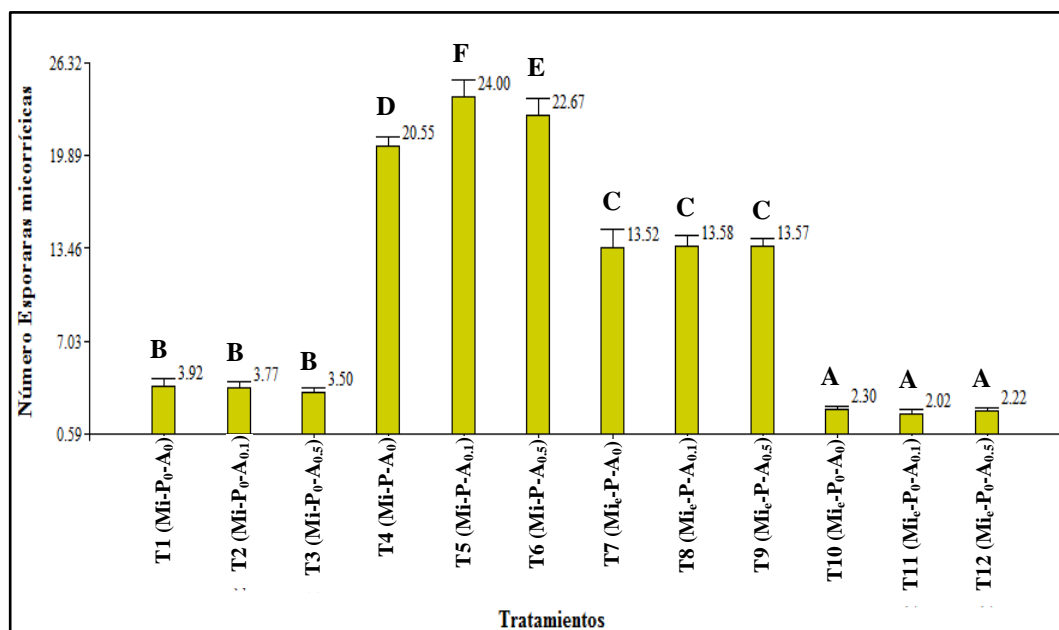


Figura 24: Efecto del extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en la variación del número de esporas micorrízicas.

Del mismo modo, en la figura 24, se muestra el incremento en el número de esporas micorrízicas, durante 90 días. En base a los datos obtenidos, se pudo determinar que en los tratamientos que incluyeron un inóculo micorrízico inicial y que no contenían plantas, el número de esporas disminuyó un promedio de 0.7 veces, mostrando que el ajo no tiene influencia cuando no hay huésped, por lo que se sugiere que sin planta, no hay interacción entre el ajo y las esporas micorrízicas.

Por su parte, en los tratamientos con inóculo micorrízico inicial y que contenían plantas, se registró un pronunciado incremento en la población micorrízica, principalmente en el tratamiento 5, que incluyó una concentración de ajo del 0.1%, en el cual, la población micorrízica tuvo un incremento positivo de 4.5 veces, (de 5.28 esporas iniciales a 24 esporas por gramo de suelo). El segundo tratamiento con mayor incremento fue el tratamiento 6 (0.5% de ajo), que tuvo un incremento de 4.3 veces, partiendo en un inicio con 5.28 esporas por gramo de suelo y finalizando con 22.68 esporas. Finalmente, el tratamiento 4 (sin ajo), registro un incremento en el número de esporas de 3.9 veces (desde 5.28 hasta 20.5 esporas por gramo).

En cuanto a los tratamientos que no incluyeron micorrizas inicialmente, se registró una variación positiva del número de esporas micorrízicas. Los tratamientos 7, 8 y 9 que incluían plantas, tuvieron una población micorrízica promedio final de 13.56

esporas por gramo de suelo. Del mismo modo, en los tratamientos 10, 11 y 12, que no contenían ni plantas ni micorrizas, se registró una población promedio final de micorrizas de 2.1 esporas. En ambos casos, se asume que la población micorrícica obtenida, fue producto de una contaminación por parte del ambiente o de los otros tratamientos.

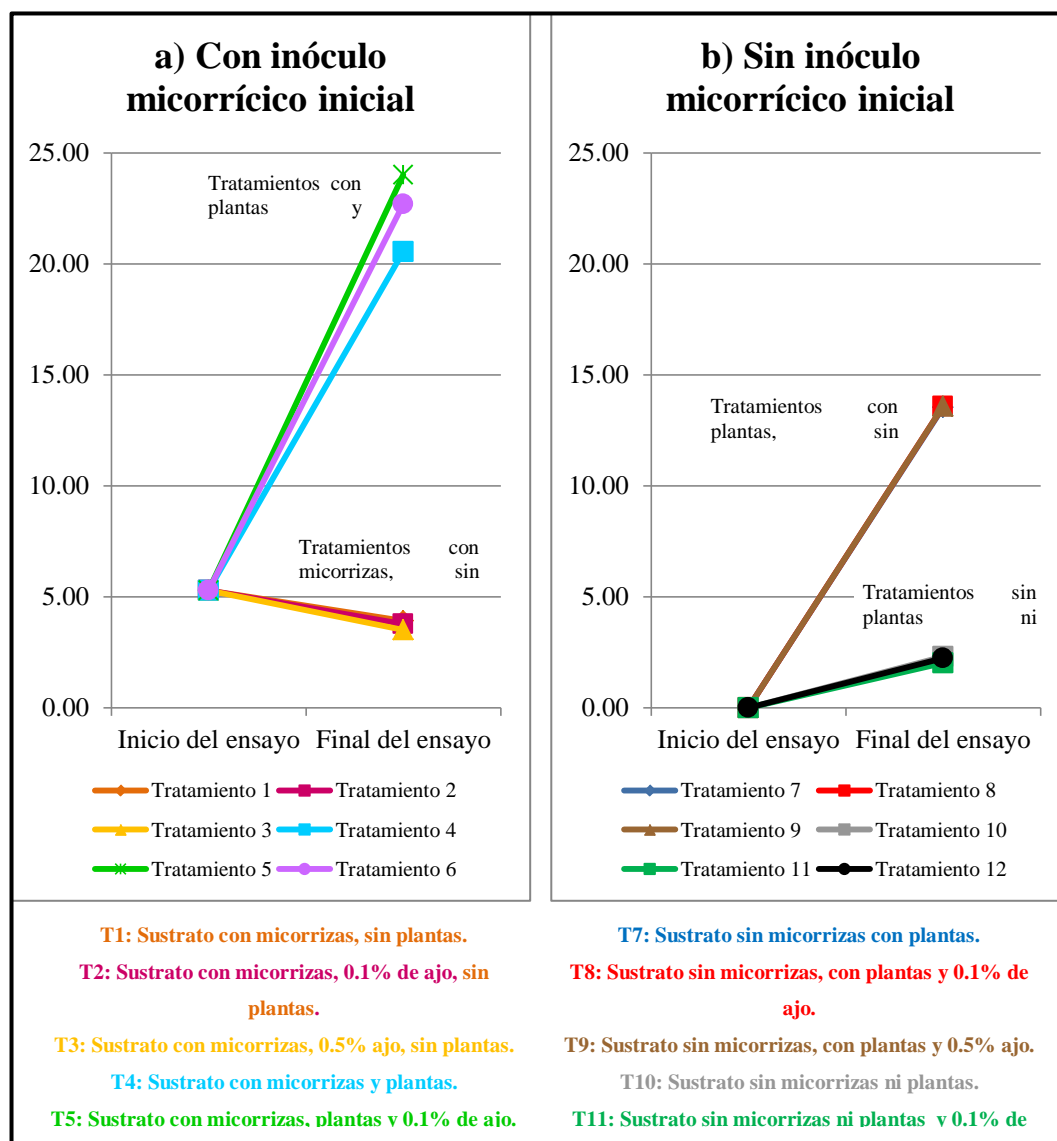


Figura 25: Variación del número de esporas micorrícicas al inicio y al final del ensayo

3.8. Recuento general de bacterias en cada uno de los tratamientos

Para la evaluación estadística del recuento general de bacterias se empleó un análisis de varianza, en el cual se obtuvo un coeficiente de variación de 32.02%. Los valores p obtenidos demostraron que existían diferencias significativas en la evaluación de la

variable planta con un valor p menor a 0.0001 y en la variable de concentración del ajo con un valor p de 0.0485. Por su parte, la presencia o ausencia de micorrizas, no presentó diferencias significativas.

Gracias al test Duncan al 5%, se determinó que los tratamientos con un mayor recuento bacteriano fueron los que incluían plantas de avena (*Avena sativa*) (T4 Mi-P-A₀, T5 Mi-P-A_{0.1}, T6 Mi-P-A_{0.5}, T7 Mi_e-P-A₀, T8 Mi_e-P-A_{0.1} y T9 Mi_e-P-A_{0.5}), frente a los tratamientos que no contenían plantas (T1 Mi-P₀-A₀, T2 Mi-P₀-A_{0.1}, T3 Mi-P₀-A_{0.5}, T10 Mi_e-P₀-A₀, T11 Mi_e-P₀-A_{0.1} y T12 Mi_e-P₀-A_{0.5}) (Ver figura 3.11).

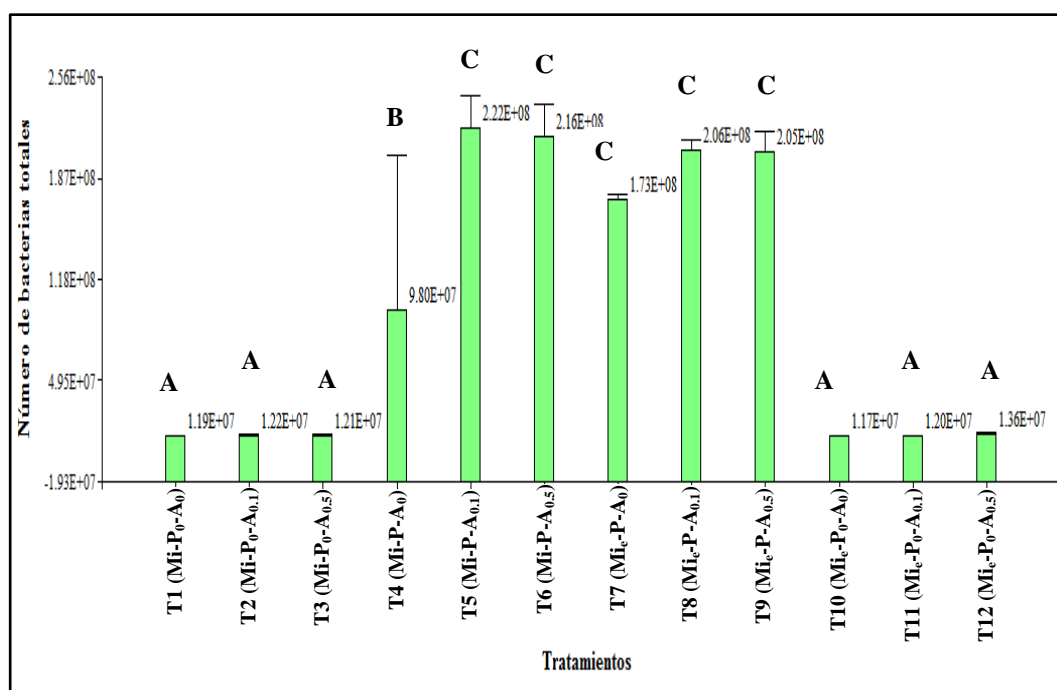


Figura 26: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el recuento de bacterias totales del suelo.

3.9. Recuento general de hongos en cada uno de los tratamientos

El recuento general de hongos totales se realizó 3 días después de la siembra en el medio PDA. En el análisis de varianza de la población de hongos obtenida, el valor p en cada una de las variables de clasificación analizadas y sus interacciones, fue superior al nivel de significancia, por lo que no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Del mismo modo, el test estadístico Duncan al 5%, mostró que ninguno de los tratamientos evaluados presentó alguna diferencia significativa entre ellos (Ver figura 3.12), manifestando que el extracto de ajo no influye en la microbiota fúngica del suelo.

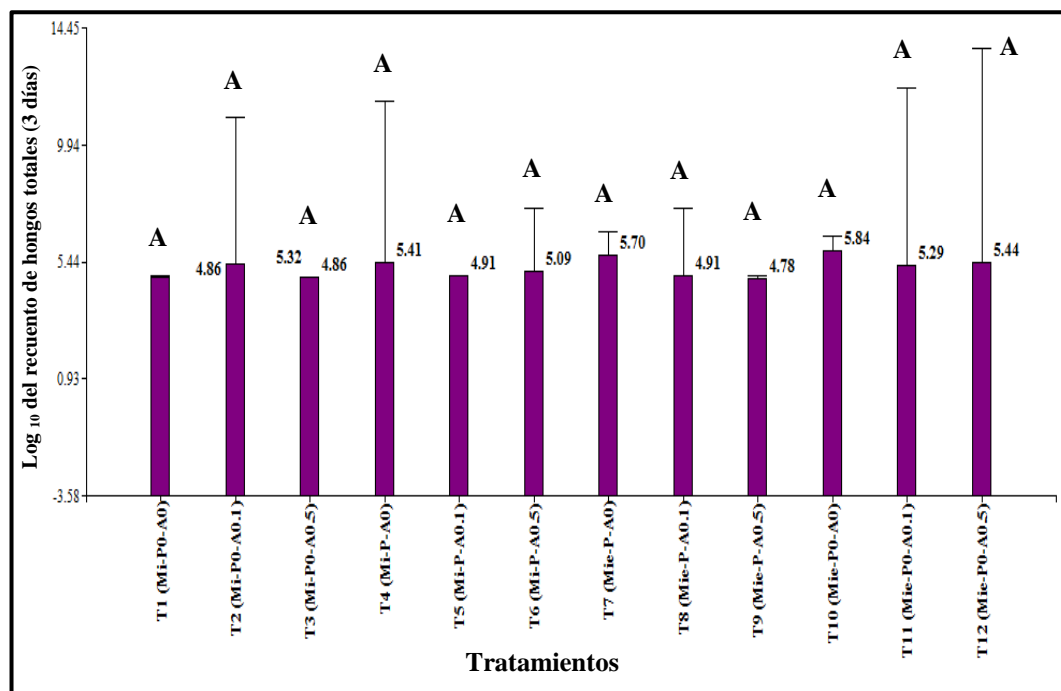


Figura 27: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el recuento de hongos totales del suelo.

3.10. Identificación y recuento de bacterias solubilizadoras de fósforo

El análisis de varianza en la identificación y recuento de bacterias solubilizadoras de fósforo proporcionó un coeficiente de variación del 0.30%, el cual fue medido, tomando en cuenta los logaritmos en base 10 de las UFC obtenidas. Los valores p obtenidos del análisis, fueron superiores al nivel de significancia de 0.05, por lo que no se observó diferencias significativas entre los tratamientos.

Del mismo modo, la prueba estadística de Duncan al 5%, no produjo diferencias significativas, lo cual se refleja en la figura 3.13, en la que todos los tratamientos comparten medias con letras en común. Los tratamientos con mayor recuento de bacterias solubilizadoras de fósforo fueron los que tuvieron presencia de planta y fueron tratados con extracto de ajo al 5% (T6 (Mi-P-A_{0.5}) y T9 (Mie-P-A_{0.5})). La presencia o ausencia de micorrizas, no produjo diferencias.

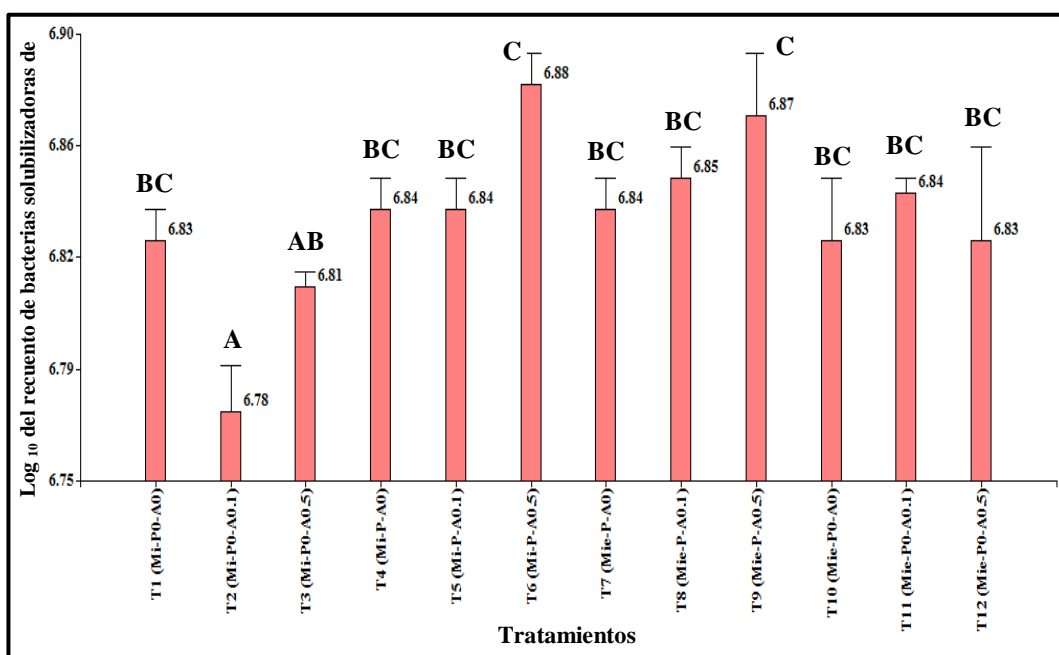


Figura 28: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el recuento de bacterias solubilizadoras de fósforo.

3.11. Identificación y recuento de bacterias fijadoras de nitrógeno

El coeficiente de variación para el análisis de esta variable fue de 0.45%, igualmente medido mediante el logaritmo en base de 10 de las UFC obtenidas en los recuentos. Del mismo modo, los valores p obtenidos, no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos.

La prueba Duncan al 5%, tampoco produjo diferencias entre los tratamientos, como se refleja en la figura 28.

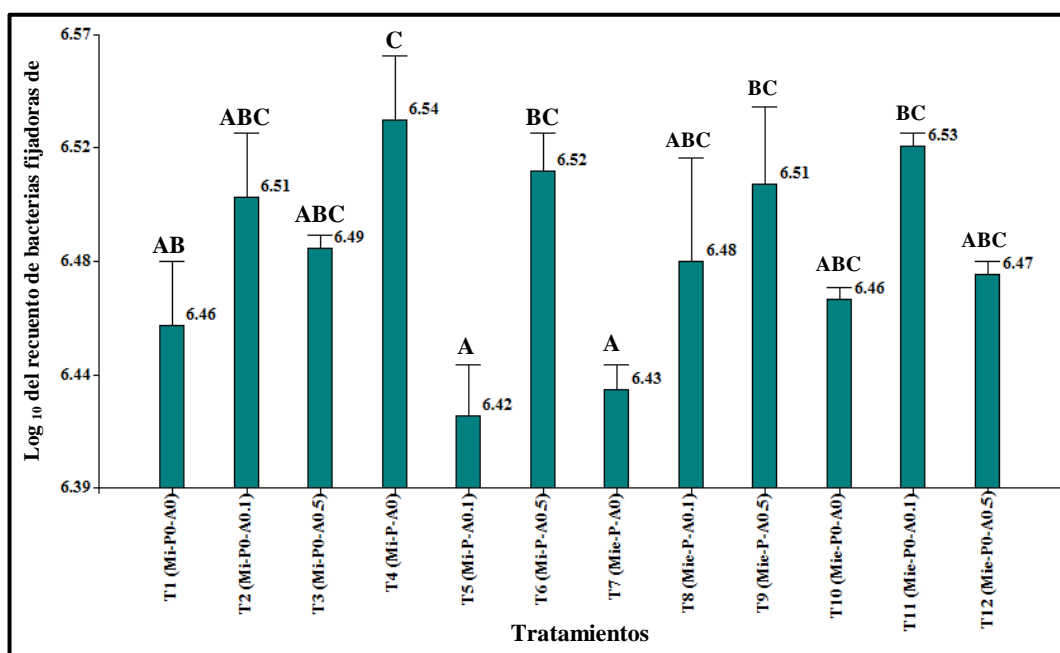


Figura 29: Efecto de la interacción de los hongos micorrícicos y el extracto de ajo, en diferentes concentraciones, en el recuento de bacterias fijadoras de nitrógeno.

3.12. Análisis de la correlación de los parámetros de crecimiento de las plantas de avena (*Avena sativa*), el porcentaje de micorrización y el número de esporas micorrícicas en los tratamientos.

El análisis de la correlación entre el número de esporas micorrícicas obtenidas en cada uno de los tratamientos y las medidas de longitud y peso de las plantas de avena (*Avena sativa*) se muestran en la figura 3.15, en la que se aprecia que todas las curvas que describen el comportamiento de los parámetros analizados, presentan una fuerte correlación entre sí.

En la tabla 10, se muestran los coeficientes de correlación obtenidos entre la interacción de las variables de longitud, pesos y población de micorrizas, mostrando que todos los coeficientes de correlación obtenidos, fueron superiores al 90%, por lo tanto se demuestra que las mediciones realizadas de longitud radicular, porcentaje de micorrización y pesos (fresco total, seco aéreo y seco total) son directamente proporcionales al número de esporas micorrícicas presentes en el suelo.

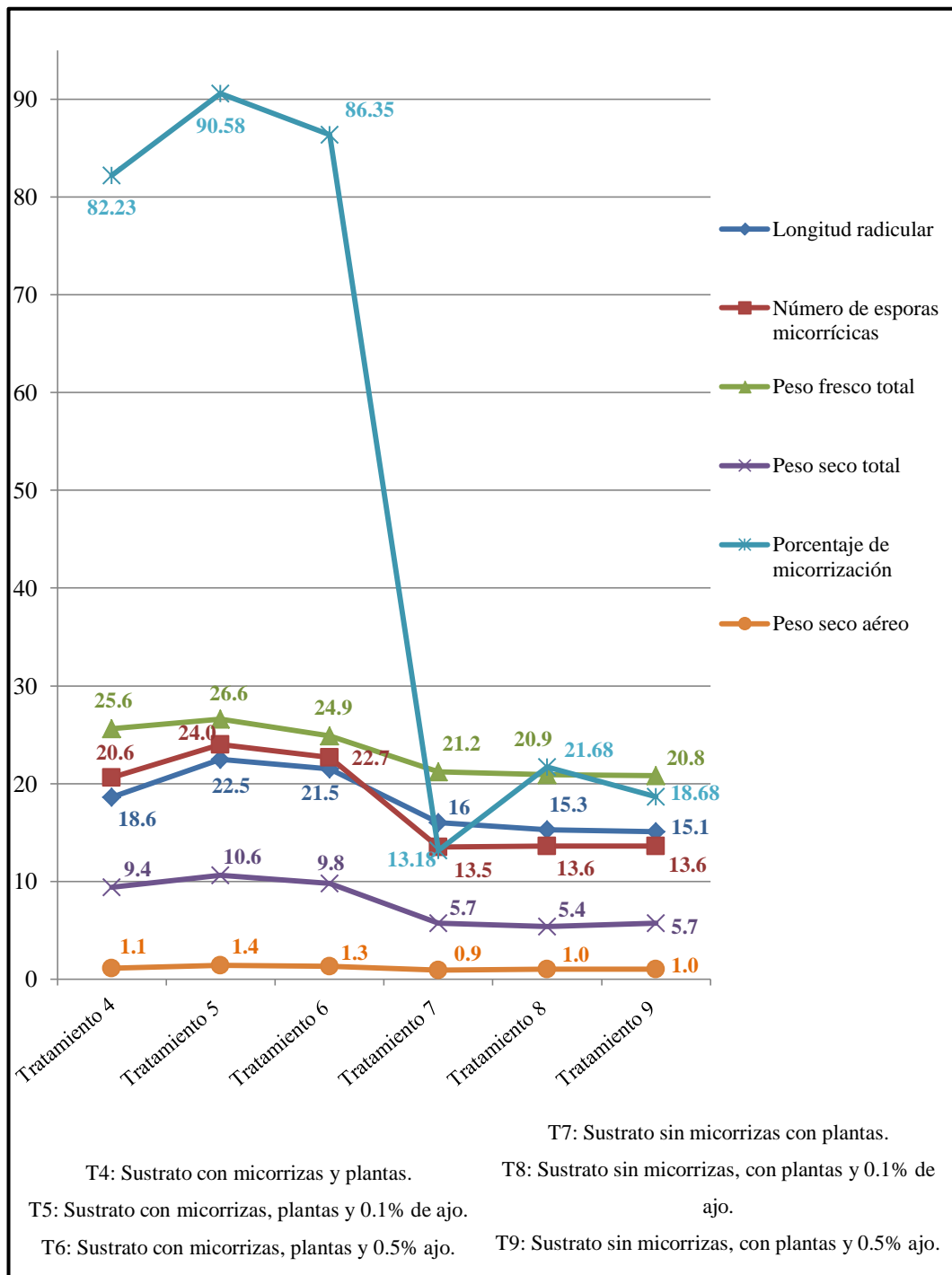


Figura 30: Correlación de las variables de crecimiento de las plantas de avena (*Avena sativa*), el porcentaje de micorrización y el número de esporas micorrícicas obtenidas al final del ensayo.

Tabla 10:

Coefficientes de correlación entre las variables de crecimiento de las plantas y la población de esporas micorrícicas en los tratamientos que incluían siembra

Variables relacionadas	Coefficientes de correlación
Longitud radicular y número de esporas	0.976
Longitud radicular y el peso fresco total	0.926
Longitud radicular y el peso seco total	0.959
Número de esporas y el peso fresco total	0.975
Número de esporas y el peso seco total	0.995
Peso fresco total y el peso seco total	0.988
Porcentaje de micorrización y el número de esporas	0.987
Porcentaje de micorrización y la longitud radicular	0.930
Porcentaje de micorrización y el peso fresco total	0.978
Porcentaje de micorrización y el peso seco total	0.989
Porcentaje de micorrización y el peso seco aéreo	0.889
Número de esporas y el peso seco aéreo	0.936
Longitud radicular y el peso seco aéreo	0.953

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

4.1. Selección del inóculo micorrícico y montaje del ensayo

A lo largo de los últimos cincuenta años, la agricultura ha experimentado un crecimiento exponencial en cuanto a las tecnologías aplicada en la explotación de éste recurso (FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2000). Éste avance de la agricultura, ha permitido una amplia cantidad de ventajas y desventajas para la misma, puesto que si bien las tecnologías actuales, han permitido conocer una amplia cantidad de técnicas biosustentables que mejoren la calidad de los suelos y las plantaciones, así también, se han incorporado una amplia cantidad de compuestos agroquímicos, pesticidas e insecticidas, que con el fin de promover el crecimiento y producción de los cultivos, han sido usados de forma indiscriminada, afectando las propiedades de los suelos y cultivos (Proyecto Live Sinergia, 2006) (Consejería del Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, 2003).

Por todas estas razones, la ciencia ha venido buscando alternativas biológicas sustentables, que permitan de forma simultánea la producción óptima de los cultivos y el cuidado de medio ambiente (Grageda-Cabrera, *et al.*, 2012). Entre estas alternativas, está el uso de microorganismos benéficos (hongos, bacterias, etc.) que promuevan el crecimiento vegetal sin contaminar el medio ambiente (Armenta, *et al.*, 2010). En la actualidad, existen numerosos estudios científicos acerca de estos microorganismos y su mecanismo de acción, pero a pesar de ello, el conocimiento es todavía limitado (FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2000).

Los hongos micorrícicos son parte de estos microorganismos benéficos que estimulan el desarrollo vegetal, de hecho, son hongos simbioses obligados, que desarrollan una relación bilateral con la planta, en la que tanto el hongo como la planta se benefician (Aguilera, *et al.*, 2007).

Por su parte, desde la antigüedad ha sido conocido el empleo de productos naturales en la preparación de extractos que debido a sus compuestos activos, constituyen una alternativa saludable para la protección de los cultivos (IPES / FAO, 2010). Tal es el

caso del ajo (*Allium sativum*), el cual según varios estudios científicos, constituye un alimento rico en compuestos orgánicos capaces de ejercer una función insecticida y protectora para la planta frente a varias plagas (Celis, *et al.*, 2008).

Por todo lo expuesto, en el presente estudio, se analizó el comportamiento de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y la microbiota del suelo, bajo el suministro de un extracto hidroalcohólico de ajo (*Allium sativum*), a fin de determinar los efectos que se producen en la microbiota del suelo y el desarrollo vegetal.

Para llevar a cabo este ensayo, se analizaron varios suelos cultivados, a fin de conseguir un buen inóculo micorrícico y buenas condiciones del suelo. El inóculo empleado, contó con una población de esporas micorrícicas de 15.1 esporas por gramo de suelo, un número alto de esporas según Tovar y Franco, 2006, quienes afirman que una población de micorrizas superior a 10 esporas / g de suelo, se encuentra en un rango alto de esporas micorrícicas. Según Usuga-Osorio, *et al.*, 2008, para que la simbiosis entre el hongo micorrícico y la planta sea óptima, el sustrato de siembra de la planta huésped, debe presentar buena capacidad de aireación y cantidad de nutrientes, a fin de conseguir el buen desarrollo vegetal y por consiguiente del hongo micorrícico. El sustrato empleado tuvo una composición volumétrica del 30% de turba, lo cual está en concordancia con Carrillo, C. 2000, quien afirma que un sustrato con turba, facilita el crecimiento del micelio del hongo, ya que proporciona aireación y porosidad al suelo, 35% de suelo negro (autoclavado) y 35% del inóculo micorrícico, el mismo que en el sustrato para el inicio del ensayo, contó con una población de 5.2 esporas por gramo de suelo.

Para esta investigación, se empleó avena (*Avena sativa*), en vista de que existen ensayos previos, realizados en el laboratorio de Microbiología de Suelos de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, por Villarroel, *et al.*, 2007, y Baroja, *et al.*, 2010, con esta especie de planta, por lo que se puede afirmar que existe un alto grado de especificidad entre la planta de avena (huésped) y los hongos micorrícicos. Además, Salas y Blanco, 2000, y Castillo, *et al.*, 2008, afirman que para permitir una adecuada propagación de los hongos micorrícicos, se requiere una planta micorrizógena, perenne, de fácil germinación, que tenga un ciclo corto y que sea

resistente a las plagas, por lo que la avena, cumplía con todas estas características, para la adecuada propagación de micorrizas.

El ensayo fue mantenido durante un periodo de 90 días, que está de acuerdo con Mattar, 2001, es un lapso de tiempo adecuado para la que se establezca la interacción planta – hongo, y se de una adecuada propagación de los hongos micorrícicos.

4.2. Evaluación de las variables de crecimiento de las plantas.

El desarrollo de los organismos vegetales se encuentra estrechamente relacionado con los microorganismos que interactúan con ellos, puesto que son estos microorganismos, los encargados del transporte y transformación de nutrientes para la asimilación de las plantas (Corrales, *et al.*, 2014; García I. , 2011). La microbiota normal del suelo se encuentra constituida por una serie de microorganismos como bacterias, actinomicetos, hongos, nematodos y pequeños invertebrados que en conjunto realizan funciones biológicas indispensables para mantener las propiedades normales del suelo y permitir el crecimiento vegetal (Ramos J. , 2009). Entre la población fúngica normal del suelo, uno de los grupos más diversos y relevantes son los hongos micorrícicos, que se caracterizan por establecer una acción simbiótica con la planta, beneficiándose de los compuestos exudados radiculares y a su vez brindando una amplia cantidad de beneficios para el desarrollo vegetal (Camargo-Ricalde, *et al.*, 2012).

Por otra parte, los nutrientes de los suelos, generalmente se hallan dispuestos en formas no asimilables para las plantas, así por ejemplo, casi la totalidad del azufre del suelo se encuentra formando compuestos orgánicos, que sólo pueden ser utilizados por ciertos microorganismos para volverlos aptos para la asimilación vegetal (Montaño, *et al.*, 2010).

Recientes estudios de Gahan y Schmalenberger, 2014, afirman que las bacterias encargadas de la degradación de los compuestos sulfurados pueden desarrollar cierto tipo de relación con las hifas micorrícicas, y, si bien los hongos micorrícicos, no disponen de un sistema enzimático adecuado para la degradación de compuestos sulfonatados, si pueden aumentar la capacidad del transporte de estos compuestos y consecuentemente, mejorar la nutrición vegetal. El objetivo de este estudio fue evaluar el desarrollo de las plantas y la microbiota del suelo bajo el efecto de un

extracto de ajo, el cual por contener una alta cantidad de compuestos sulfonados que podría mejorar la propagación de esporas micorrícicas y el desarrollo vegetal.

En la evaluación de las variables de crecimiento y desarrollo de las plantas, se observó que los pesos frescos (aéreo y total), aumentaron en el tratamiento que tuvo el inóculo micorrícico inicial sin esterilizar y fue tratado con el extracto de ajo al 0.1%. Mientras que en el tratamiento en el que se había aplicado el extracto de ajo al 0.5%, mostró que los mismos parámetros disminuyeron, por debajo del tratamiento 4 que contenía plantas y micorrizas, sin ajo. Estos resultados, están en concordancia con las investigaciones realizadas por Han, *et al.*, 2013, que realizaron ensayos con lechuga (*L. sativa* var. *crispa* L.), y propusieron que los compuestos activos del ajo, ejercen un efecto alelopático positivo para el crecimiento vegetal, cuando éste se encuentra en bajas concentraciones, pero cuando se aumenta la concentración, se inhibe el crecimiento, puesto que el efecto alelopático podría ser negativo.

Por su parte, los parámetros de longitud radicular y peso seco aéreo, mostraron incrementos en los tratamientos que incluyeron el extracto de ajo al 0.1% y al 0.5%, resultados que están de acuerdo en el ensayo de Han, *et al.*, 2013, en los que, independientemente de la concentración de ajo, se evidenció un aumento en la longitud radicular de las plantas. No obstante, las mediciones del peso fresco radicular y los pesos secos (radicular y total), en los distintos tratamientos con micorrizas, no mostraron diferencias significativas debido a las concentraciones de ajo, lo cual pudo deberse a errores por pérdida de material vegetal de la raíz, en el momento del levantamiento del ensayo.

Ahora bien, en cuanto a la variación de los parámetros de crecimiento de las plantas, debido a la presencia de micorrizas, las diferencias entre los tratamientos que incluyeron micorrizas fueron evidentes frente a los tratamientos que incluyeron el inóculo micorrícico autoclavado, es decir, sin micorrizas. Estos resultados concuerdan con los ensayos realizados por Espín, *et al.*, 2010, que analizaron las variables de crecimiento de plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) inoculadas con cepas de HMA, y obtuvieron resultados de un mejor desarrollo vegetal y el aumento de la biomasa de la planta. Del mismo modo, los estudios realizados por Villegas & Cifuentes, 2004, afirman que la inoculación de hongos

micorrícicos en plantas, permite mejorar la biomasa foliar y aérea, debido a que facilitan la asimilación de nutrientes.

4.3. Evaluación del porcentaje de micorrización radicular en las plantas y el número de esporas micorrícicas.

La medición del porcentaje de colonización de las raíces que alcanza un inóculo de HMA, proporciona una idea certera del grado de infectividad, efectividad y especificidad existentes entre la planta y el hongo (Olivares & Barea, 2007; León, 2006). Por este motivo, en esta investigación se evaluó el porcentaje de micorrización, a fin de conocer en qué porcentaje, las raíces de las plantas fueron colonizadas por los HMA, y si el extracto de ajo, tiene alguna influencia en la efectividad de ésta colonización. En los resultados obtenidos, se observó que los tratamientos con ajo, aumentaron la micorrización destacándose en el tratamiento con extracto de ajo al 0.1%, cuyo porcentaje de micorrización fue del 90.5%, seguido del tratamiento con 0.5% de ajo, donde la micorrización radicular alcanzó el 86.3% y finalmente, el tratamiento sin ajo, que presentó una micorrización del 82% (Ver Figura 3.8).

En el recuento de esporas de HMA presentes en el suelo de cada uno de los tratamientos, se observó que el número de esporas micorrícicas, era significativamente mayor en los tratamientos que con micorrizas, plantas y ajo, obteniéndose 24 esporas por gramo de suelo en el mejor tratamiento al que se aplicó 0,1% de ajo. En segundo lugar, quedó el tratamiento con ajo al 0.5% (22.67 esporas) y finalmente el tratamiento sin ajo (20.5 esporas) (Ver Figura 3.9). Por su parte los tratamientos que no fueron inoculados con micorrizas inicialmente, pero que sí contenían plantas, su población micorrícica fue baja en comparación con los tratamientos, antes expuestos. Estos resultados demuestran que el ajo tiene una influencia positiva en el porcentaje de micorrización, así como también en el número de esporas, cuando existe presencia de planta.

Además, los resultados de los análisis concuerdan con los de Han, *et al.*, 2013, que manifiestan un efecto alelopático positivo del ajo, cuando se encuentra en bajas concentraciones, puesto que mejora el desarrollo vegetal, mientras que cuando las concentraciones de ajo son elevadas, el desarrollo vegetal se inhibe.

Por otra parte, Baroja, *et al.*, 2010, realizaron un ensayo con hongos micorrícicos en los que estudiaron el efecto de la infectividad de los hongos micorrícicos germinados y sin germinar en plantas de avena, soya y maíz, concluyendo que cuando se emplean esporas de HMA germinadas, éstas tienen un mayor porcentaje de colonización de raíces frente al empleo de esporas de HMA sin germinar. En ese sentido, se podría afirmar que los compuestos suministrados por el ajo ejercieron alguna actividad en la germinación de las esporas micorrícicas, cuando hay presencia de plantas, puesto que cuando se aplica ajo y no existe presencia huésped (Tratamientos 1, 2 y 3), el número de esporas no aumenta (Figura 3.9). Del mismo modo, cuando se analizan las plantas con micorrizas pero sin ajo, el incremento del porcentaje de micorrización es menos significativo que en las plantas que han sido tratadas con el extracto.

Por otro lado, Gahan & Schemalenberger, 2014, señalan en sus ensayos, la influencia de los compuestos azufrados en el desarrollo de la relación bacteria – micorriza – planta. Un estudio similar es reportado por Wipf, *et al.*, 2014, quien asegura también, la importancia del papel que juega el azufre en la colonización micorrícica y viceversa. Las dos investigaciones manifiestan que las bacterias encargadas de la transformación de los compuestos azufrados en formas asimilables para la planta, transportan sus productos a través de las hifas micorrícicas, para así alcanzar el tejido radicular.

Por todo esto, se demuestra que la aplicación de ajo, cuando existen plantas micorrizadas, mejora las respuestas de longitud radical, biomasa aérea y total, población micorrícica y porcentaje de micorrización. Estos resultados también se confirmaron a través de la gran correlación que existe entre las variables mencionadas (Ver Figura 3.15 y Tabla 3.3), índices que según González & Pérez, 2012, expresan que una correlación superior a 0.8, es muy alta y la relación existente entre las variables comparadas, es muy intensa.

4.4. Evaluación de la microbiota del suelo

Para conocer la diversidad microbiológica del suelo, es importante tener en cuenta los nutrientes presentes en el mismo, la presencia o ausencia de especies vegetales, las propiedades del sustrato empleado y los factores ambientales que influyen en él,

ya que son estos aspectos los que intervienen de forma directa en la colonización y propagación de los microorganismos, así por ejemplo, el empleo de sustancias agroquímicas o extractos vegetales, pueden modificar o potenciar el crecimiento de la microbiota original (García I. , 2011; Coyne, 2000).

En esta investigación, se realizó un análisis general del número de bacterias y hongos presentes en cada uno de los tratamientos, a fin de determinar la influencia del extracto de ajo en la población de microorganismos.

En los resultados obtenidos en el ensayo, se observó que el recuento general de bacterias no fue influenciado por la presencia de micorrizas o las concentraciones de ajo, sino debido a la presencia o ausencia de plantas, puesto que el número de bacterias presentes en el suelo aumentó en los tratamientos que contenían planta, independientemente de la población micorrícica existente o de la concentración de ajo suministrada, mientras que en los tratamientos que no contenían plantas, el recuento bacteriano fue bajo.

Por su parte en el recuento total de hongos, no se observaron diferencias entre ninguno de los tratamientos, puesto que todos mostraron una población similar, sin importar la composición de cada uno. Del mismo modo, el análisis de bacterias solubilizadoras de fósforo y bacterias fijadoras de nitrógeno, no produjo diferencias significativas en el recuento bacteriano, obteniéndose resultados que no se veían influenciados por la presencia de micorrizas, plantas o por la adición de ajo.

En cuanto a estos resultados, existen estudios realizados hasta la fecha, que señalan que la presencia de hongos micorrícicos favorece la colonización de otros microorganismos, es decir, existe una relación sinérgica entre las micorrizas y ciertos microorganismos, por ejemplo, Barea, *et al.*, 2001 y Azcon, *et al.*, 2001, afirman que la presencia de hongos micorrícicos puede influenciar la colonización de microorganismos propios o inoculados de la rizósfera.

Del mismo modo, González, *et al.*, 2012, realizaron un estudio sobre la coinoculación de bacterias de rizobios y una cepa de hongos micorrícicos y concluyeron que ambas microorganismos establecen una relación sinérgica y mutualista que beneficia el crecimiento vegetal. Un estudio similar es presentado por Terry & Leyva, 2005, en el que pone de manifiesto que la coinoculación de bacterias

promotoras del crecimiento y hongos micorrícicos generan un efecto sinérgico en el desarrollo de la planta y en las poblaciones de ambos microorganismos.

En ese sentido, los resultados microbiológicos obtenidos, a excepción del recuento general de bacterias, no se apegan a las experiencias mencionadas, debido a lo cual, se podría sugerir que existieron errores en los análisis, los cuales pudieron estar causados por una esterilización deficiente o a una contaminación del sustrato, posterior al montaje del ensayo.

En relación con esto, Giampoli, *et al.*, 2014, afirma que la desventaja de usar el vapor como agente esterilizante, se basa en que el sustrato no siempre alcanza una esterilidad total o que a su vez, el proceso de esterilización, genera un vacío biológico que lo hace susceptible a la recolonización microbiana, por lo que se podría deducir que los recuentos microbiológicos obtenidos en el ensayo, obedecen a estos errores. Adicionalmente, Tello (2012) señala que los tratamientos de esterilización o desinfección del suelo, permiten la liberación de recursos energéticos, los cuales podrían intervenir en la propagación de microorganismos, sean éstos benéficos o no para las plantas.

En cualquier caso, los resultados obtenidos en este ensayo, no muestran ninguna influencia del ajo o la presencia de micorrizas en el recuento de hongos o cierto tipo de bacterias específicas del suelo, y sólo el recuento de bacterias totales, se ve influenciado por la presencia de plantas de avena.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pudieron determinar en ésta investigación fueron:

- La administración de un extracto hidroalcohólico de ajo (*Allium sativum*) mejoró el crecimiento de las plantas, aumentó la población de hongos micorrícicos e incrementó el porcentaje de micorrización radicular de HMA en la planta.
- El extracto hidroalcohólico de ajo (*Allium sativum*), aplicado en una concentración del 0.1%, con respecto al tratamiento con planta, sin inóculo micorrícico inicial ni extracto de ajo, tuvo un efecto positivo en el desarrollo de la longitud radicular, con un incremento del 28%, el peso fresco aéreo, con un incremento del 12%, peso fresco total (20%), peso seco aéreo (35%) y peso seco total (46%).
- El extracto hidroalcohólico de ajo (*Allium sativum*), aplicado en una concentración del 0.5%, tuvo un efecto positivo en el desarrollo de la longitud radicular (24%) y del peso seco aéreo (28%). Por el contrario, mostró un efecto negativo en las variables del peso fresco aéreo y peso fresco total (1.7%), por lo que se puede asumir que en ciertas variable de crecimiento de las plantas, las concentraciones elevadas del extracto de ajo, ejercen un efecto inhibitorio.
- El recuento microbiológico general del suelo (bacterias y hongos) no se vio afectado por las poblaciones de esporas micorrícicas o las adiciones de extracto de ajo, y sólo el recuento bacteriano mostró un aumento del número total de bacterias, cuando hubo presencia de planta (huésped).
- La planta de avena (*Avena sativa*) es una buena especie propagadora de HMA, puesto que se evidenció un incremento de hasta 4.5 veces en la población inicial de esporas micorrícicas.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

- A fin de tener una mejor comprensión del efecto que causa el extracto de ajo en el desarrollo vegetal, se recomienda administrar concentraciones de 0.1%, 0.5% y 1%.
- Analizar el contenido de los nutrientes en el suelo y en la planta, tanto al inicio como al final de ensayo, en especial de los bioelementos más relevantes como son nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, hierro, entre otros, con el propósito de comprender la influencia del ajo en las concentraciones de los nutrientes del suelo.
- Realizar un ensayo similar a éste, variando la especie vegetal como trigo, papa o soja, especies que sean reconocidas como plantas propagadoras de micorrizas para investigar el efecto del ajo en otras plantas.
- Repetir el mismo ensayo, aplicando un método de esterilización del suelo diferente, controlando las condiciones de humedad, temperatura y contaminación ambiental, y además realizar un análisis microbiológico antes y después del ensayo, para así tener claro como varía la microbiota del suelo.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, Ó. (2003). *El uso de fertilizantes en la Agricultura*. Recuperado el 01 de 08 de 2016, de Laboratorio de Bioquímica de Procesos Orgánicos: <http://cep.unep.org/repcar/capacitacion-y-concienciacion/cenat/biofertilizantes.pdf>
- Aguilera, L., Olalde, V., Arriaga, R., & Contreras, R. (2007). Micorrizas Arbusculares. *Ciencia Ergo Sum*, 300-306.
- Alarcón, A., & Ferrera, R. (Junio de 2000). *Manejo de la Micorriza Arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas*. Recuperado el 3 de Marzo de 2016, de Instituto de Recursos Naturales. Colegio de Postgrados en Ciencias: <http://www.chapingo.mx/terra/contenido/17/3/art179-190.pdf>
- Andrade-Torres, A. (2010). Micorrizas: Antigua interacción entre plantas y hongos. *Ciencia*, 84 - 90.
- Arévalo, M. (14 de Febrero de 2011). *Efecto de la utilización de Ajo macerado en el Control de Yersinia pseudotuberculosis y Escherichia coli en Cuyes*. Recuperado el 9 de Febrero de 2016, de Escuela Superior Politécnica de Chimborazo: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2390/1/17T1024.pdf>
- Arias, E., & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de Hongos Filamentosos de muestras de suelo de los páramos Guasca y Cruz Verde*. Recuperado el 02

de Septiembre de 2016, de Pontificia Universidad Javieriana:
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf>

Armenta, et al. (2010). *Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México*. Recuperado el 12 de Agosto de 2016, de Ra Ximhai, Universidad Autónoma Indígena de México: <http://www.ejournal.unam.mx/rxm/vol06-01/RXM006000107.pdf>

Arriaga, A., De la Cruz, G., & Ortiz, G. (1999). *Relaciones Hídricas en las plantas: teoría y ejercicios*. México: Plaza y Valdés.

Baca, B., Soto, L., & Pardo, M. (2000). Fijación Biológica de Nitrógeno. *Elementos*, 43 - 49.

Bago, A., & Cano, C. (2011). *Hongo formador de micorrizas arbusculares y su uso para estimular el crecimiento de plantas*. Recuperado el 13 de Septiembre de 2016, de Consejo Superior de Investigaciones Científicas: <http://hdl.handle.net/10261/40684>

Bagyaraj, D., Manjunath, A., & Reddy, D. (1979). Interaction of Vesicular Arbuscular Mycorrhiza with root knot nematodes in tomato. *Plant and Soil*, 51(3), 397 - 403.

Ballesteros, W., Unigaro, A., Cadena, C., & Cadena, J. (2004). Evaluación de Hongos formadores de Micorrizas Vesículo Arbusculares (MVA) en la etapa de Almacigo de Cacao (*Theobroma cacao* L.), en Tumaco, Nariño. *Revista de Ciencias Agrícolas*.

- Baroja, I., Medina, M., & Proaño, K. (2010). Evaluación de la actividad del formonometín, ácido 3-indol butírico y tiamina para promover la germinación in vitro de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA). *Revista Ciencia*, 13(1), 95 - 102.
- Barrer, S. (5 de Mayo de 2009). *El uso de Hongos Micorrízicos Arbusculares como una alternativa para la Agricultura*. Recuperado el 10 de Febrero de 2016, de Facultad de Ciencias Agropecuarias : <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n1/v7n1a14>
- Bécard, G., & Pféffer, P. (1993). Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma*(174), 62 - 68.
- Beltrán, M. (2014). *La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal*. Recuperado el 23 de Agosto de 2016, de Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v15n1/v15n1a09.pdf>
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. (2012). *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents*. Recuperado el 17 de Agosto de 2016, de Sociedade Brasileira de Genética: <http://www.scielo.br/pdf/gmb/v35n4s1/20.pdf>
- Betancourt, R. (2011). *Los beneficios de los Hongos simbiotes*. Recuperado el 11 de Febrero de 2016, de Ed. El Cid. Argentina: <http://www.worldcat.org/title/beneficios-de-los-hongos-simbiontes/oclc/823744838>

- Blanco, F., & Salas, E. (1997). Micorrizas en la Agricultura: Contexto Mundial e Investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 55 - 67.
- Bobadilla, C., & Rincón, S. (2008). *Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuo de plaza*. Recuperado el 20 de Enero de 2016, de Pontificia Universidad Javeriana: <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis130.pdf>
- Borie, F., Rubio, R., Morales, A., & Castillo, C. (2000). Relación entre densidad de hifas de hongos micorrizógenos arbusculares y producción de glomalina con las características físicas y químicas de suelos bajo cero labranza. *Revista Chilena de Historia Natural*(320), 749 - 756.
- Brunel, J. (Junio de 2015). *La soja estimulada por los hongos micorrízicos arbusculares* . Recuperado el 25 de Agosto de 2016, de Food News Latam.com: <http://www.foodnewslatam.com/biotecnolog%C3%ADa/58-agricultura/3054-la-soja-estimulada-por-los-hongos-micorr%C3%ADzicos-arbusculares.html>
- Bucchese, et al. (2012). *Programa de Fortalecimiento da Viticultura Familiar da Serra Gaúcha*. Brasil: Grafisul - C. Carnielutti & Irmão Ltda.
- Burgos, A. (2014). *Estudio de biodiversidad fúngica en el suelo del viñedo del la Finca La Granjera*. Recuperado el 29 de Agosto de 2016, de Universidad de la Rioja: http://biblioteca.unirioja.es/tfe_e/R000001909.pdf
- Calvo, S. (2011). *Bacterias simbióticas fijadoras de Nitrógeno*. Recuperado el 12 de Febrero de 2016, de Universidad de Salamanca:

<http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf>

Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, A., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. Recuperado el 27 de Agosto de 2016, de Facultad de Química - UNAM: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf.

Camargo-Ricalde, S., Montaña, N., De la Rosa-Mera, C., & Montaña, S. (2012). *Micorrizas: una gran unión debajo del suelo*. Recuperado el 13 de Agosto de 2016, de Revista Digital Universitaria UNAM, Volumen 13, Número 7: www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/art72.pdf

Cano, M. (2011). A review of interation of beneficial microorganisms in plants: Mycorrhizae, Trichoderma spp. and Pseudomonas spp. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15 - 31.

Carling, D., & Brown, M. (1982). *Anatomy and physiology of vesicular-arbuscular and nonmycorrhizal roots*. Recuperado el 13 de Febrero de 2016, de Symposium of Mycorrhizae and Plant disease research: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n08_1108.PDF

Carrillo, C. (2000). *Técnicas de micorrización en vivero con hongos ectomicorrícicos.experiencias realizadas en el Centro Nacional de Mejora Forestal "El Serranillo"*. Recuperado el 12 de Septiembre de 2016, de Tercer

Curso Avanzado de Viveros y Producción de Planta Forestal. Guadalajara.:
www.mapama.gob.es/es/biodiversidad/.../result_micorrizas_tcm7-23501.pdf

Castillo, C., Astroza, I., Borie, F., & Rubio, R. (2008). Efecto de Cultivos Hospederos y no hospederos sobre propágulos micorrícicos arbusculares. *Revista de la Ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 8(1), 37 - 54.

Cecilia, L., Villalba, M., & Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6 - 14.

Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. (2008). *Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión*. Recuperado el 13 de Agosto de 2016, de *Agronomía Colombiana* 26 (1) 96 - 106: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/13923>

Consejería del Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. (2003). *Contaminación de suelos por compuestos orgánicos*. Andalucía - España.

Córdova, M. (2010). *Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (Allium sativum L.): Implicaciones analíticas*. Recuperado el 03 de Septiembre de 2016, de Instituto Politécnico Nacional: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/9243/81.pdf?sequence=1>

Corrales, L., Arévalo, Z., & Moreno, V. (2014). *Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal*. Recuperado el 29 de

Agosto de 2016, de Universidad Nacional Abierta y a Distancia:
<http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/251/502>

Coyne, M. (2000). *Microbiología del Suelo: un enfoque exploratorio*. España: Parafino.

Cuenca, G., Cáceres, A., Oirdrobo, G., Hasmy, Z., & Urdaneta, C. (2007). Las Micorrizas Arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia*, 32(1), 23 - 29.

De la Rosa, C. (2009). *Micorriza arbuscular y estrés abiótico en el contenido de alcaloides (vinblastina y vincristina) de Catharanthus roseus (L.) G. Don*. Recuperado el 12 de Septiembre de 2016, de Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación: <http://hdl.handle.net/10521/1303>

Domínguez, J. (2002). *Aplicaciones de la Micorrización artificial con trufa negra en planta forestal*. Recuperado el 02 de septiembre de 2016, de Universidad Politécnica de Madrid: <http://oa.upm.es/188/1/07200207.pdf>

Durán, J., Retamal, N., & Moratíel, R. (2010). *El papel del nitrógeno en la agricultura y la contaminación por nitrato*. Recuperado el 24 de 08 de 2016, de Universidad Politécnica de Madrid: <http://www.interempresas.net/Agricola/Articulos/39819-El-papel-del-nitrogeno-en-la-agricultura-y-la-contaminacion-por-nitrato.html>

Escalante, A., Gosset, G., Martínez, A., & Bolívar, F. (2001). *Diversidad Bacteriana del Suelo: Métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e*

implicaciones biotecnológicas. Recuperado el 18 de Febrero de 2016, de Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología. UNAM: <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2004/nov-dic/art-2.pdf>

Escobar, C., Zuluaga, J., Colorado, G., & Páez, D. (1998). Micorriza Vessícula Arbuscular (MVA): Recurso biológico para desarrollar una agricultura sostenible. *Corpoica*, 1 - 6.

Espín, E., Medina, M., Jadán, M., & Proaño, K. (2010). Utilización de hongos micorrícico-arbusculares en plántulas de tomates de árbol *(solanum betaceum)* cultivadas in vitro: Efectos durante la fase de aclimatación. *Revista Ciencia*, 13(1), 87 - 94.

Estrada, A. (2011). *Análisis espacio-temporal de morfotipos de esporas de Micorrizas Vesiculo Arbusculares en la rizósfera de Ceiba aesculifolia*. Recuperado el 12 de 08 de 2016, de Universidad Autónoma de Querétaro: <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/673/1/RI000216.pdf>

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2000). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación*. Recuperado el 12 de Octubre de 2016, de Deósito de Documentos de la FAO: <http://www.fao.org/docrep/x4400s/x4400s10.htm>

Fernández, R. (2008). Las Micorrizas: Desenterrando un tesoro. *Revista Agricultura Orgánica*, 22 - 25.

Flor, M. (2013). *Uso de Agentes de control y protección biológica frente a nemátodos del género Meloidogyne en cultivos protegidos bajo plástico*.

Recuperado el 14 de 05 de 2016, de Universidad de Granada: <http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/21862369.pdf>

Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e interacciones de estas bacterias con Hongos formadores de Micorrizas.*

Recuperado el 20 de Enero de 2016, de Universidad de Granada - Facultad de Ciencias: http://es.slideshare.net/paulicarpio/actinomicetos?next_slideshow=1

Gahan, J., & Schmalenberger, A. (Diciembre de 2014). *The role of bacteria and mycorrhiza in plant nutrient supply.* Recuperado el 12 de Agosto de 2016, de

Frontiers in Plant Science: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4267179/>

García, A., & Bello, A. (2004). *Diversidad de los organismos del suelo y transformación de la materia orgánica.* Recuperado el 24 de Agosto de 2016,

de I Conferencia Internacional: Eco-Biología del Suelo y el Compost: <http://www.soilace.com/pdf/pon2004/19.Alvarez.pdf>

García, C., & Rodríguez, G. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai*, 8(3), 1 - 10.

García, I. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Revista Argentina de Microbiología*, 1 - 3.

García, S. (2006). *Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la regulación de genes de resistencia implicados en el metabolismo carbonatado en plantas de tomate (Solanum esculenum).* Recuperado el 12 de Febrero de 2016, de

Universidad de Granada. Consejo Superior de Investigaciones Científicas:
<http://hera.ugr.es/tesisugr/1649071x.pdf>

Giampaoli, G., Brandán de Weht, C., Enrico, R., Coll Aráoz, M., & Lencina, V. (2014). Efecto de la esterilización con métodos físicos en suelo, sobre la flora micorrícica y en el cultivo del yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en Horco Molle, Tucumán. *Revista de Agronomía del Noroeste de Argentina*, 34(2), 36 - 39.

Giri, B., Huong, P., Kumari, R., Prasad, R., & Varma, A. (2005). Microbial diversity in soils. *Soil Biology*, 19 - 55.

González, M. (2005). *Estudio de los mecanismos implicados en la homeostasis de metales pesados en el hongo formador de micorrizas arbusculares Glomus intraradices*. Recuperado el 02 de Septiembre de 2016, de Universidad de Granada - Consejo Superior de Investigaciones Científicas:
<http://hera.ugr.es/tesisugr/15432440.pdf>

González, M. (2007). *Estudio de los mecanismos implicados en la homeostasis de metales pesados en el hongo formador de micorrizas arbusculares*. Recuperado el 24 de Enero de 2016, de Universidad de Granada. Consejo Superior de Investigaciones Científicas:
<http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/626/1/15432440.pdf>

González, Y. (2010). *Los actinomicetos: una visión como promotores de crecimiento vegetal*. Recuperado el 28 de Agosto de 2016, de Pontificia Universidad Javeriana:
<http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8665/1/tesis618.pdf>

- González, M., & Pérez, A. (2012). *Estadística Aplicada, una visión instrumental*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos S.A.
- González, P., Pérez, G., Medina, N., Crespo, G., Ramírez, J., & Arzola, J. (2012). Coinoculación de cepas de rizobios y una cepa de hongo micorrícico arbuscular (*Glomus cubense*) y su efecto en kudzú (*Pueraria phaseoloides*). Nota técnica. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas*, 46(3), 331 - 334.
- Grageda-Cabrera, Ó., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J., & Vera-Núñez, J. (2012). *Impacto de los Biofertilizantes en la Agricultura*. Recuperado el 12 de Octubre de 2016, de Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, Vol. 3, Num. 6 : <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263123222015>
- Grant, W., & Long, P. E. (2008). *Microbiología ambiental*. . Capítulo 1°. Ed. ACRIBIA.
- Grümberg, B., Conforto, C., Rovea, A., Boxler, M., March, G., Luna, C., y otros. (2010). La Glomalina y su relación con la productividad del cultivo de maíz. *Informaciones Agronómicas*, 23 - 25.
- Guatapi, N. (Enero de 2010). *Estudio Investigativo del Ajo, análisis de sus propiedades y difusión de su aplicación en la Ciudad de Quito*. Recuperado el 9 de Febrero de 2016, de Universidad Tecnológica Equinoccial: http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/12990/1/40742_1.pdf
- Guerrero, L. (2012). *Comunidades bacterianas en suelo bajo siembra directa en la región agropecuaria pampeana. Influencia del manejo y propuesta de nuevos indicadores biológicos*. Recuperado el 25 de Agosto de 2016, de Universidad

de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.:
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5175_Guerrero.pdf

Han, X., Cheng, Z., Meng, H., Yang, X., & Ahmad, I. (2013). Allelopathic effect of decomposed garlic (*Allium sativum* L.) stalk on lettuce (*L. sativa* var. *crispa* L.). *Pak. J. Bot.*, 45(1), 225 - 233.

Hanafy, M., Saadawy, F., Milad, S., & Ali, R. (2012). Effect of Some Natural Extracts on Growth and Chemical Constituents of *Schefflera arboricola* Plants. *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*, 26 - 33.

Hernández, C. (2001). *Efecto del Hongo Micorriza (Glomus intraradices schenk & smith) en el crecimiento del portainjerto mexícolita (persea americana mili) cultivado bajo cinco tratamientos de fertilización*. Recuperado el 12 de Febrero de 2016, de Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, Quillotoa - Chile:
http://www.avocadosource.com/papers/Chile_Papers_A-Z/G-H-I/HernandezClaudio2001.pdf

Higa, T., & Parr, J. (2013). *Microorganismos benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenible*. Recuperado el 19 de Agosto de 2016, de Centro Internacional de Investigación de Agricultura Natural:
http://fundases.com/userfiles/file/MicroorG_Benef_Efect.pdf

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

- Hudson, J. P. (1967). Review of E. J. Hewitt 'Sand and Water Culture Methods used in the Study of Plant Nutrition'. *Experimental Agriculture*, 104.
- Hurst, C. (2008). *Manual of Enviromental Microbiology* (3ra. edición ed.). Whashington D.C.: ASMPRESS.
- Hussey, R., & Roncador, R. (1982). Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. *Plant disease*, 9 - 14.
- Ibarra, C. (Junio de 2010). *Diversidad de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno aisladas de suelo de Chinampa y su efecto en plantas de interés agrícola*. Recuperado el 10 de Febrero de 2016, de Escuela Nacional de Ciencias Biológicas: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/9203/33.pdf?sequence=1>
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2004). *Estado del medio ambiente: suelo*. México: GEO.
- INVAM. (2016). *International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fur*. Recuperado el 05 de Septiembre de 2016, de West Virginia University: <http://invam.wvu.edu/>
- IPES / FAO. (2010). *Biopreparados para el manejo sostenible de plagas y enfermedades en la agricultura urbana y periurbana*. Recuperado el 15 de Agosto de 2016, de Guía ¿Cómo hacerlo?, Primera Edición: www.fao.org/3/a-as435s.pdf
- Jaizme, m., & Rodríguez, A. (2008). Integración de microorganismos benéficos (Hongos Micorrícicos y Bacterias Rizosféricas) en Agrosistemas de las Islas Canarias. *Agroecología*, 33- 39.

- Japón, J. (1984). *El Cultivo del Ao*. Recuperado el 03 de septiembre de 2016, de Hojas Divulgadoras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1984_01.pdf
- León, D. (2006). *Evaluación y caracterización de micorrizas arbusculares asociadas a yuca (Manihot esculenta sp.) en dos regiones de la Amazonía Colombiana*. Recuperado el 7 de Octubre de 2016, de Pontificia Universidad Javeriana: www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis296.pdf
- Li, R., Chen, W.-c., Wang, W.-p., Tian, W.-y., & Zhang, X.-g. (Diciembre de 2009). Extraction of essential oils from garlic (*Allium sativum*) using ligarine as solvent and its immunity activity in gastric cancer rat. *Medicinal Chemistry Research*, 1092 - 1105.
- López, A. (2006). *Manual de Edafología*. Recuperado el 15 de Agosto de 2016, de Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Universidad de Sevilla: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/30157/AVA/2014/Unidad_1/manual_De_Edafologia-Jordan.pdf
- López, T. (2007). El Ajo: Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *OFFARM*, 78 - 81.
- Martín, A. (2011). *Efectos de la Inoculación del Hongo de Micorrización Tuber Melanosporum y la Rizobacteria Pseudomonas Fluorecens en la calidad de la plántula de Pinus halepensis*. Recuperado el 19 de 08 de 2016, de

Universidad Politécnica de Madrid:

http://oa.upm.es/6345/2/PFC_ANA_MARTIN_AMOR.pdf

Martínez, R., & Rivera, M. (2008). *Evaluación de la acción repelente, insecticida y protectora de los extractos acuoso e hidroalcohólico de Allium sativum (ajo) contra el Zabrotes subfasciatus (Gorgojo común) del frijol almacenado.*

Recuperado el 05 de septiembre de 2016, de Universidad de El Salvador:
<http://ri.ues.edu.sv/3031/1/16100243.pdf>

Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación Biológica del Nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, 1 - 20.

Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., & Sánchez, J. (2010). *Los microorganismos: pequeños gigantes.* Recuperado el 15 de Agosto de 2016, de Revista Elementos: Ciencia y Cultura, Número 77, Págs. 15 - 23:
www.elementos.buap.mx/num77/pdf/15.pdf

Morales, M. (2009). Los Hongos. *Revista Digital: Innovación y Experiencias Educativas*, 1 - 8.

Moreira, F., Huisisng, J., & Bignell, D. (2012). *Manual de biología de suelos tropicales : muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo.* España: México : Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Morte, A., Gutierrez , A., Dreyer, B., Torrente, P., & Honrubia, M. (2010). *Biofertilizantes de última generación.* Recuperado el 12 de 08 de 2016, de Universidad de Murcia. Facultad de Biología:
<https://www.carm.es/web/integra.servlets.Blob/AsuncionMorte.pdf?ARCHIV>

O=AsuncionMorte.pdf&TABLA=ARCHIVOS&CAMPOCLAVE=IDARCHIVO&VALORCLAVE=20940&CAMPOIMAGEN=ARCHIVO&IDTIPO=60&RASTRO=c503\$m4632.

Mukerji, K. (1996). *Concepts in Mycorrhizal Research*. Boston, London: Kluber Academic Publishers, Dordrecht.

Neyoy, C. (Octubre de 2012). *Micorrizas*. Recuperado el 28 de Agosto de 2016, de Apuntes de Fisiología Vegetal: <http://fisiolvegetal.blogspot.mx/2012/10/micorrizas.html>

Noda, Y. (2009). *Las Micorrizas: Una alternativa de fertilización ecológica en los pastos*. Recuperado el 03 de Septiembre de 2016, de Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”. : <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v32n2/pyf01209.pdf>

Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas: Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*, 41 - 51.

Ocampo, G. (2008). *La incidencia de la colonización Micorrízica en la propagación vegetativa de cuatro especies de Ericaceae con fuentes de inóculo (sustratos) provenientes de la Estación Científica San Francisco* . Recuperado el 12 de Febrero de 2016, de Universidad Nacional de Loja: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5201/1/Ocampo%20Veintimilla%20Geovanny.pdf>

Olivares, J., & Barea, J. M. (2007). *Significado de los Microorganismos del Suelo en Nutrición Vegetal: Simbiosis Rhizobium-Leguminosa y Micorrizas* Va. Recuperado el 11 de 08 de 2016, de Biblioteca Digital de la Universidad de Chile:

http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmacuticas/lachicam01/parte05/03-4.html

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2002). *Los Fertilizantes y su uso*. Asociación Internancional de la Industria de los Fertilizantes.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1995). *Manual Técnico de la Fijación simbiótica del nitrógeno: leguminosa - Rizobium*. Roma - Italia: FAO.

Paredes, M. (2013). *Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas*. Recuperado el 10 de Febrero de 2016, de Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina.:
<http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf>

Peña, (2007). *Micorrizas arbusculares del sur de la amazonia colombiana y su relación con algunos factores fisicoquímicos y biológicos del suelo*. Recuperado el 21 de Abril de 2016, de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672007000300003

- Peña, H., & Reyes, I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de Nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la Lechuga (*Latuca sativa* L.). *Interciencia*, 560 - 565.
- Pérez, A., Rojas, J., & Montes, D. (2011). Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el Caribe Colombiano. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.*, 366-385.
- Pfenning, L., & Magalhães, L. (2012). CAPÍTULO 8: Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas. En F. Moreira, *Manual de Biología de Suelos Tropicales* (págs. 243 - 280). México: Instituto Nacional de Ecología.
- Phillips, J., & Hayman, D. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Trans. Bryt. Micol*, 158 - 161.
- Proyecto Live Sinergia. (2006). Producción Respetuosa en Viticultura. Impactos ambientales en Agricultura. *Sinergia*, 2 - 11.
- Quiñones-Aguilar. (2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos 101*, 59 - 64.
- Ramírez, L. (2000). *Manual de Microbiología*. Pereira - Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Ramos, C. (2010). *Adecuación al área mediterránea de la evaluación del riesgo para el medio ambiente de products fitosanitarios*. Recuperado el 01 de 08 de

2016, de Universidad Complutense de Madrid:
<http://eprints.sim.ucm.es/11178/1/T31771.pdf>

Ramos, J. (2009). *Microorganismos de Suelo*. Recuperado el 20 de Febrero de 2016, de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/429/organismos.pdf>

Restrepo, G., Marulanda, S., Pérez, Y., Díaz, A., Baldani, V., & Hernández, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *CENIC, Ciencias Biológicas*, 63 - 76.

Reyes, J. (2002). Asociaciones biológicas en el suelo: la micorriza arbuscular (MA). *UAM - I(44)*, 5 - 10.

Richardson, A., Barea, J., McNeill, A., & Prigent, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Springer Science + Business Media B.V.*, 305 - 339.

Rico, M. (2009). *Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género Acetobacter y Actinomicetos aislados de cultivos de Solanum tuberosum Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en Zonas altoandinas del Perú*. Recuperado el 25 de 08 de 2016, de Universidad Nacional Mayor de San Marcos:
http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/875/1/Rico_gm.pdf

Rodríguez, M. (2001). Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 53 - 78.

- Rodríguez, V. (2002). *Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismo saprófitos contra Rhizoctonia Solani, un fitopatógeno causante del (damping off) en plantas de tomate* . Recuperado el 14 de Agosto de 2016, de Universidad Nacional Mayor de San Marcos: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/rodriguez_lv/t_completo.pdf
- Rodríguez, V. (2004). *Tesis Digitales UMNSM*. Recuperado el 5 de Enero de 2016, de Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra Rhizoctonia Solani, un fitopatógeno causante de (Damping Off) en plantas de tomate: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/Rodriguez_LV/Introduc.PDF
- Rojas, D. (2008). *Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de Rhizobium sp.* Recuperado el 27 de Agosto de 2016, de Pontificia Univercidad Javieriana : <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis212.pdf>
- Roldán, B. (1985). *Micorrizas VA en Cultivos Arbóreos: Almendro, Naranja y Olivo*. Recuperado el 11 de 08 de 2016, de Universidad de Granada: http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/35646/1/FCI_T_5_4.pdf
- Romani, C. (2008). Preparaciones de Ajo. *La fertilidad de la tierra - Revista de Agricultura ecológica*, 19 - 23.
- Rubio, G. (Diciembre de 2002). *Conectando el fósforo del suelo con la planta*. Recuperado el 23 de Agosto de 2016, de Informaciones Agronómicas del

Cono Sur, N 16:

http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Conectando_%20el_fosforo.pdf

Ruiz, N., Rangel, M., & Cárdenas, I. (2014). Estructura del bosque y propagación de dos especies de encinos con micorrizas en el Estado de México. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 138 - 146.

Salas, E., & Blanco, F. (2000). Selección de plantas hospederas y efectos del fósforo para la producción del inóculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares por el método de cultivo en macetas. *Revista Agronomía Costarricense*, 24(1), 19 - 28.

Sánchez, I. (2009). *Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interés ecológico en ambientes mediterráneos*. Recuperado el 03 de septiembre de 2016, de Universidad de Granada - Consejo Superior de Investigaciones Científicas: <http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/18131360.pdf>

Silva, G., Lagunes, Á., Rodríguez, C., & Rodríguez, D. (2002). Insecticidas Vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 4 - 12.

Smith, F. A., & Smith, S. E. (1997). Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 373 - 388.

- Tello, J. (Enero de 2012). *El suelo como “ente vivo” y su relación con las enfermedades de las plantas*. Recuperado el 05 de 09 de 2016, de Universidad de Almería: <http://www.iec.cat/Noticia/butlleti7/docs/agroecologia%20resum%20Tello.pdf>.
- Terjena. (2012). *Diversidad de Hongos Micorrícicos Arbusculares en la finca Agrofuturo de la Comuna Zapotal, Cantón Santa Elena*. Recuperado el 12 de Agosto de 2016, de Universidad de Guayaquil: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/819/4/Diversidad%20de%20hongos%20micorr%20adzicos%20Parte%203.pdf>
- Terry, E., & Leyva, Á. (2005). Evaluación agrobiológica de la coinoculación micorrizas.rizobacterias en tomate. *Revista Agronomía Costarricense*, 30(1), 65 - 73.
- Tovar-Franco, J. (2006). *Selección en invernaderos de inóculos de micorriza arbuscular (MA) para el establecimiento de la alfalfa en un Andisol de la Sabana de Bogotá*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2016, de Universitas Scientiarum: Revista de la Facultad de Ciencias, Edición especial, Vol. 11, 87-103: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4997>
- USDA. (1998). *Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos*. México: Limusa.
- Usuga, C., Castañeda, D., & Franco, A. (2008). Multiplicación de hongos micorriza arbuscular (H.M.A.) y efecto de la micorrización en plantas micropropagadas

de banano(Musa AAA cv. Gran Enano) (Musaceae). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 6(1), 4279 - 4290.

Vargas, S. (2012). *Microorganismos solubilizadores de Fosfato en suelos*. Recuperado el 20 de Enero de 2016, de Universidad Industrial de Santander: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/7012/2/145102.pdf>

Villarroel, A., Duchicela, J., Koch, A., & Proaño, K. (2007). Influencia de hongos micorrícicos arbusculares en la tolerancia a arsénico en helechos y avena. *Revista Ciencia*, 10(1), 87 - 98.

Villegas, M., & Cifuentes, J. (2004). Las micorrizas en la evolución de las plantas. *Revista Ciencia*, 73 - 80.

Yepis, O., Fundora, O., Pereira, C., & Crespo, T. (2000). La contaminación ambiental por el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados en el cultivo de tomate. *Scientia*, 5 - 12.