

**Mycoral<sup>®</sup> effect on *Swietenia humilis* Zucc.  
(Pacific Mahogany) in a nursery**

**Luis Ricardo Orellana Jiménez**

**ZAMORANO**

Socioeconomic Development and Environment

December, 2001

**Efecto del Mycoral<sup>®</sup> en un vivero de *Swietenia humilis* Zucc. (Caoba del Pacífico)**

**Luis Ricardo Orellana Jiménez**

**ZAMORANO**

Carrera de Desarrollo Socioeconómico y Ambiente

Diciembre, 2001

# **Efecto del Mycoral<sup>®</sup> en un vivero de *Swietenia humilis* Zucc. (Caoba del Pacífico)**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero Agrónomo en el grado  
académico de Licenciatura.

Presentado por

**Luis Ricardo Orellana Jiménez**

**Zamorano, Honduras**  
Diciembre, 2001

El autor concede a Zamorano permiso  
para reproducir y distribuir copias de este  
trabajo para fines educativos. Para otras personas  
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

---

Luis Ricardo Orellana Jiménez

Zamorano, Honduras  
Diciembre, 2001

**Efecto del Mycoral<sup>®</sup> en un vivero de *Swietenia humilis* Zucc.  
(Caoba del Pacífico)**

Presentado por

Luis Ricardo Orellana Jiménez

Aprobada:

---

Darío Mejía, Ing. Forestal  
Asesor Principal

---

Peter Doyle, M. Sc.  
Coordinador de la Carrera de  
Desarrollo Socioeconómico y  
Ambiente

---

George Pilz, Ph. D.  
Asesor

---

Antonio Flores, Ph. D.  
Decano Académico

---

Gabriel Chiriboga, Ing. Agr.  
Asesor

---

Keith Andrews, Ph. D.  
Director General

---

George Pilz, Ph. D.  
Coordinador PIA – DSEA

## **DEDICATORIA**

A mi Dios

A mis padres

A mis hermanas

A mis amigos

## AGRADECIMIENTOS

A mi Dios de quien puedo decir con toda seguridad me ha acompañado desde el primer día de mi vida hasta este momento. Quien me a cuidado y me a guiado para poder atravesar esos “valles de sombra y de muerte”, quien siempre que lo necesité estuvo ahí. Ese Señor que me dio fuerzas cuando parecía que todo sin remedio se estaba hundiendo y que me acompañó en esos momentos, que aunque estando entre un mar de gente solo él sabia y pudo aliviar mi soledad. A ese Maestro por excelencia y Padre de amor “tardo para la ira y grande en misericordia” pero que “al que ama castiga”, quien me enseñó y perfeccionó en todo este tiempo de estudio. A ese señor que espero un día no muy lejano estar ante su presencia en el momento donde personas de toda tribu, lengua y nación alaben por la eternidad, a ese ser Supremo. ¡Gracias!

A mi familia, mis padres Luis Alonso Orellana y Abigail Jiménez, quienes siempre prestos para escucharme y aconsejarme, quienes con paciencia me enseñaron los principios de la vida, esos principios que me han ayudado a vivir honrada y decorosamente todo este tiempo. Son ahora el más grande y digno ejemplo que tengo en la vida para seguir. A mis hermanas Claudia y Belinda por su cariño y comprensión. A mis abuelos, tíos y primos que estuvieron pendientes de mi.

A mis asesores, Ing. Darío Mejía por extenderme la mano siempre que la necesité, su amistad y su ejemplo. Al “Doc.” George Pilz por su enorme paciencia, por confiar en mi y ser como un padre. Al Ing. Gabriel Chiriboga, que no solo se limitó a prestarme su excelente ayuda, si no que también se interesó por mejorar el aspecto espiritual de mi vida; con quienes estaré agradecido siempre.

A mis amigos en Siguatepeque: Doña Tinita de Danjoy, Peter y Maylin, Angi, Ana Maria Sen, Rolf y mis amigos del grupo de jóvenes de la Iglesia Betel.

A las familias: Sutton, Hagler, Martínez-Baca, Livingston Gutierrez, Neil y Marilu L., Rodríguez, Tobar, Muñoz, Daniel y Ximena, que con sus oraciones consejos, cariño y financiamiento, me sostuvieron en algún momento durante estos años.

A mis compañeros, en especial: Mildred Alvarado, Juan Paredes, Marielena Moncada, Guillermo Peña, Nahún Lobo, José Torres, Juan Galindo, Marisabel Caballero, Miguel Calderón, Sergio Nava, Erick Caamaño, Bernarda Calla, Shadia Duery, José Canavides, Néstor Menéces, Gabriela Garzón.

A los que me adoptaron como su padre o abuelo y aceptaron con paciencia mis concejos y regaños: Douglas, Gabriela, Alejandra R., Fernanda, Héctor, Saúl, José Luis.

A los que con cariño los alumnos que pasamos por esta escuela le llamamos “paicitas”, pero son uno de los motores fundamentales de esta institución y de nuestra educación.

Quiero agradecer a los de forestales: Gustavo, Victoriano, Jorge, Mateo, Casimiro, Don Rufo, etc. A los de hortalizas: Chavelo, Reina, Monchito y su hijo. A los de los de Zootecnia, Cárnicos y Lácteos: Fernando, Armando, Chavelo, Carballo, Carlos, Rigo S., Rigo R., Juan, Helio, Matta y todos los demás que sus nombre se me escapan. Un agradecimiento especial también para la gente del comedor: Crescencio, Angel, Tino, Leonel, Fuentes y todos los demás que desgraciadamente no recuerdo en este momento.

Un agradecimiento especial Tomasa Sánchez, quien muy amablemente me ayudó con mis pruebas de laboratorio.

A la gente de Barrios, con quien convivimos los tres años, pero en especial cuando fui monitor, a los cuales voy tratar de mecionarlos a todos: Carlos E., Mauricio, Rafael, Raul, Rodrigo, Francisco, German, Andy, Carlos R. Daniel, Salvador, Rene, Sebastián, Kenny, Sebastián, Juan, Javier.

Sole gracias por ayudarme con mi presentación de tesis, que de otra manera, sin tu apoyo me hubiera sido imposible.

A mis compañeros en los diferentes grupos extracurriculares, CVA, Teatro, Cucumis Band, La Banda de Cuarto año (Regraduation), el grupo panamericano de música (especialmente Shohei, Jorge y Pablo) y a Heidy, Beatriz y Claudia.

A todos los que mencioné anteriormente y a los que sin querer omití sus nombres pero que hicieron que mi vida en Zamorano fuera más llevadera, les deseo lo mejor en todo y quiero decirles que pueden contar conmigo donde quiera que nos vuelva a juntar la vida. Mis mas sinceros agradecimientos, su servidor.

## **AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES**

Agradezco al Fondo Dotal Hondureño por el financiamiento brindado para poder continuar mis estudios en el programa de Agrónomo.

Agradezco a mis padres Luis A. Orellana y Abigail Jiménez, la señora Tina de Danjoy, Ana Maria Sen; a las familias: Martinez-Baca, Sutton, Livingston por el financiamiento brindado para poder continuar mis estudios en el programa de Agrónomo.

Agradezco a la Secretaria de Agricultura y Ganadería de la República de Honduras por el financiamiento brindado para poder continuar mis estudios en el programa de Ingeniero Agrónomo.

A la Decanatura Académica de Zamorano por el apoyo brindado a través del programa de monitores para poder continuar mis estudios en el programa de Ingeniero Agrónomo.

## RESUMEN

Orellana Jiménez, L. R. 2001. Efecto del Mycoral<sup>®</sup> en un vivero de *Swietenia humilis* Zucc. (Caoba del Pacífico). Proyecto especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 34 p.

Las micorrizas son asociaciones simbióticas entre hongos y raíces, que ocurren en la naturaleza en el 90% de las plantas. Los beneficios que reciben las plantas son: i) aumento en la absorción de nutrientes, ii) agua y iii) tolerancia a diferentes tipos de estrés. *Swietenia humilis* (Caoba del Pacífico) posee una madera de alto valor económico, se encuentra en el apéndice II de especies amenazadas de la CITES y es endémica de Centroamérica. A través de la iniciativa Baldwin Zamorano logró plantar 41.2 ha de *S. humilis* en el 2000. Con esto, se interesó en investigar el manejo silvícola de esta especie. El objetivo fue evaluar el efecto de la inoculación de Mycoral<sup>®</sup> (producto colombiano con tres géneros de hongos micorrizógenos), en un vivero de *S. humilis*. El estudio se realizó en Zamorano entre mayo y agosto del año 2000. Se usó un diseño de bloques completamente al azar con 10 repeticiones, dos tratamientos por bloque: Con Mycoral<sup>®</sup> y sin Mycoral<sup>®</sup> (testigo). Las variables que se midieron fueron: diámetro y altura de la planta, peso seco, diámetro de la raíz principal y longitud de las raíces secundarias. No hubo diferencia en el crecimiento para el diámetro de la planta ( $P= 0.6614$ ), ni para la altura ( $P= 0.6968$ ); las demás variables tuvieron probabilidades aún más bajas. Una de las causas por la que no se vieron diferencias es: que en observaciones de raíces con el microscopio se encontraron estructuras de hongos micorrizógenos en las plantas con Mycoral<sup>®</sup> y en las testigo, pero en menor cantidad. La presencia de hongos en las plantas testigo pudo haber compensado el efecto benéfico del Mycoral<sup>®</sup>. Otra posibilidad es que las plantas en esta etapa no pudieron proveer el carbono necesario para que los hongos desarrollaran la simbiosis. Finalmente, es posible que ninguna de las especies contenidas en el Mycoral<sup>®</sup> prefirieron a la especie *S. humilis* como planta hospedera.

**Palabras Claves:** Arbusculos, CITES, hongos micorrizógenos, PCR, vesículas.

---

Dr. Abelino Pitty

## **NOTA DE PRENSA**

### **EFFECTO DE HONGOS BENEFICOS EN UN VIVERO DE CAOBA DEL PACIFICO**

Zamorano una institución líder en la agricultura ha comenzado a estudiar los beneficios de la asociación de hongos con las raíces (micorrizas), en diferentes especies de plantas, entre ellas la Caoba del Pacífico; una especie maderable de alto valor económico y que se encuentra dentro las especies amenazadas.

Los beneficios de las micorrizas han sido ampliamente estudiados pero la mayoría de las investigaciones se han realizado para las especies de las regiones templadas, por lo que es necesario investigar a las especies de hongos que puedan beneficiar las plantas con las condiciones que se presentan en el trópico. En el estudio se utilizó el producto Mycoral® de origen colombiano, el cual contiene tres géneros de hongos que al asociarse con las raíces de las plantas pueden mejorar la absorción de nutrientes, agua y tolerancias a tipos de estrés.

El estudio se estableció entre mayo y agosto del año 2000. Este contó con dos tratamientos, plantas con Mycoral® comparadas contra plantas sin Mycoral® (testigo), utilizando un medio bajo en fósforo, compuesto por tierra y arena.

La evaluación se realizó durante la etapa de vivero, en donde no se pudo observar ninguna diferencia significativa en el crecimiento. Hay dos teorías del porqué no se notaron diferencias. La primera sugiere que como es una etapa temprana en la vida de las plantas, la micorriza recién se está comenzando a establecer como asociación simbiótica y los resultados se mostrarán más adelante cuando las plantas se encuentren en el campo y sean expuestas a diferentes tipos de estrés.

La segunda es que en observación realizadas con el microscopio a las raíces de las plántulas, se encontró estructuras de hongos benéficos tanto en las tratadas con Mycoral® como en las testigo, esto implica que posiblemente micorrizas nativas ayudaron a las plantas que no se les aplicó Mycoral®, no permitiendo ver diferencias entre los tratamientos.

Aunque no se encontró un beneficio para la Caoba, actualmente se esta investigando en otras especies como: café, maíz y plántano. Estos hongos son un tipo de fertilizante biológico, excelentes para utilizar en cultivos orgánicos. Su costo es relativamente bajo (alrededor de L. 30/ kg) y se pueden aplicar hasta unas 100 plantas/kg dependiendo de la especie.

Con estos estudios, Zamorano pretende proveer a los productores alternativas en las que se reduzca el uso de agroquímicos, implementando técnicas que vayan más acorde con el cuidado del medio ambiente y que prolonguen la vida útil del suelo.

---

Licda. Sobeyda Alvarez

## INDICE DE CONTENIDO

	Pag.
Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimientos a patrocinadores.....	vii
Resumen.....	viii
Nota de prensa.....	ix
Índice de contenido.....	xi
Índice de cuadros.....	xiii
Índice de gráficos.....	xiv
Índice de anexos.....	xv
<b>1 INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivo general.....	2
1.2 Objetivos específicos.....	2
<b>2 REVISION DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Descripción de la especie.....	3
2.1.1 Descripción botánica.....	3
2.1.2 Aspectos ecológicos.....	3
2.2 Mercado.....	3
2.3 Micorrizas.....	4
2.3.1 Plantas hospederas.....	5
2.3.2 El hongo.....	5
2.3.3 Factores que afectan el desarrollo micorrizal.....	5
2.3.3.1 Factores físicos.....	5
2.3.3.2 Factores Químicos.....	7
2.3.3.3 Factores biológicos.....	9
<b>3 MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>11</b>
3.1 Localización del estudio.....	11
3.2 Metodología.....	11
3.2.1 Variables.....	11
3.2.2 Preparación del medio.....	11
3.2.3 Preparación del vivero.....	12
3.2.4 Siembra.....	12
3.2.5 Mantenimiento.....	12

3.2.6	Transplante.....	13
3.2.7	Pruebas de laboratorio.....	13
3.2.8	Diseño estadístico.....	14
3.2.9	Análisis estadístico.....	14
4	<b>RESULTADOS</b> .....	15
4.1	Germinación y sobrevivencia.....	15
4.2	Aspectos fitosanitarios.....	15
4.2.1	Insectos.....	16
4.2.2	Hongo.....	16
4.3	Variables de vivero: altura y diámetro.....	16
4.4	Pruebas de laboratorio.....	16
4.4.1	Análisis de varianza para: Peso seco, diámetro y altura de la raíz.....	17
4.4.2	Observación con el microscopio.....	17
4.4.3	Conteo de esporas.....	18
4.5	Costos.....	18
5	<b>DISCUSION</b> .....	19
6	<b>CONCLUSIONES</b> .....	21
7	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	22
8	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	24
9	<b>ANEXOS</b> .....	29

**INDICE DE CUADROS**

## Cuadro

1.	Resultados del análisis de suelos.....	12
2.	Análisis de covarianza para las variables altura y el diámetro de la planta....	16
3.	Análisis de varianza del peso seco, diámetro y altura de la raíz.....	17

## INDICE DE GRAFICO

### Gráfico

1. Germinación de *S. humilis* con y sin Mycoral®..... 15
2. Vesículas y arbusculos en raíces de *S. humilis*..... 17

**INDICE DE ANEXOS**

## Anexo

1.	Método para clarificar y teñir muestras de raíces.....	30
2.	Método para aislamiento de esporas.....	31
3.	Artículo IV de la CITES.....	32
4.	Otras especies con madera similar a la Caoba del Pacífico.....	34
5.	Clasificación de los hongos.....	34
6.	Costo de vivero para una hectárea de Caoba sin inóculo.....	35
7.	Costo de vivero para una hectárea de Caoba con inóculo.....	35

## 1. INTRODUCCION

La superficie de los bosques del mundo, incluidos los bosques naturales y plantaciones forestales, se estimaba en 3,454 millones de ha en 1995, es decir, alrededor de una cuarta parte de la superficie terrestre del planeta, de las cuales el 55% se encuentran en países en vías de desarrollo y el otro 45% restante en países desarrollados. América Latina representa un 27.5% del total de la capa boscosa mundial aproximadamente 950 millones de ha de bosque (FAO, 1998).

Del total de masa boscosa se desforestan anualmente en el mundo entre 15 y 18 millones de hectáreas. De este total de tierras deforestadas menos del 10% se vuelve a plantar. Honduras tiene una extensión de 11,249,200 ha, de las cuales se asume que el 75% es de vocación forestal (Salazar, 1990). Contrastando con eso, casi el 50 % de su territorio está cubierto por bosques. Lo que corresponde a 5,382,500 ha de cubierta forestal.

En los bosques latifoliados mixtos de Honduras se encuentran dos especies del género *Swietenia*. Una de las especies, *Swietenia macrophylla*, conocida como Caoba del Atlántico, se encuentra en los bosques de las regiones correspondientes a la zona de vida según Holdridge (1967) denominada como el “bosque húmedo”. La otra especie *S. humilis* conocida como “Caoba del Pacífico” se encuentra en la zona de vida del “bosque seco”, estos han sido críticamente perturbados por el hombre, estando hoy en día muy fragmentados y en la mayoría de los casos desaparecidos de sus ecosistemas.

Esta especie ha sido sometida muy poco a estudio razón por la cual es muy difícil recavar información sobre su silvicultura, a diferencia de la *S. macrophylla* para la cual se pueden encontrar libros y artículos en revistas o en internet, que describen el comportamiento y los aspectos silviculturales de la especie.

*S. humilis* ha sido ubicada en el apéndice II (Anexo 3) de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). La existencia de la especie esta siendo mantenida mediante plantaciones. En Zamorano en el año 2000 a través del iniciativa Baldwin se plantaron 41.12 ha y esta institución a través de la Zamoempresa de Cultivos Forestales (ZECFOR) se ha interesado en investigar acerca del manejo silvícola de la especie.

Con el desafío de conocer más de la especie, se consideró importante, entre otros temas conocer las relaciones que puede desarrollar esta especie con hongos formadores de micorriza. Estos hongos han sido estudiados por mas de un siglo pero aún queda mucho por conocer acerca de los beneficios que la asociación (micorriza) puede traer a las plantas.

Estos hongos son de mucha importancia para un gran número de especies de plantas y se cree que existen aproximadamente en el 90 por ciento de todas las especies vegetales de la tierra. Entre los beneficios que la asociación (micorriza) pueden traer a la planta están: incremento de la absorción de nutrientes, de agua y tolerancia a diferentes tipos de estrés.

El producto que se utilizó como inóculo se conoce comercialmente como Mycoral®. Este producto de origen colombiano contiene tres géneros de hongos endomicorrizógenos: *Glomus*, *Entrophospora* y *Scutelospora*. Según <sup>1</sup>Raddatz (2000) estos hongos han sido estudiados por mas de 15 años en Colombia y son el resultado de una selección enfocada en su capacidad de establecer una asociación en la cual las plantas sean las que mas se beneficien de la relación.

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

- Observar cual es el efecto de la inoculación con Mycoral® en plantas de *S. humilis* en etapa de vivero.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Medir el crecimiento por el efecto del Mycoral®.
- Obtener los costos de producción de vivero con y sin Mycoral®.
- Generar información que pueda servir de guía a otras investigaciones de micorrizas.

---

<sup>1</sup> Raddatz. 2000. Aspectos importantes sobre el Mycoral®. (Comun. Pers.).

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

#### 2.1.1 Descripción botánica

La Caoba del Pacífico es un árbol mediano, de hojas caedizas, que alcanza una altura de 24 m y un diámetro de 50 cm, se ramifica desde la parte media-alta del tallo y tiene una copa irregular. La corteza de color plateado a negruzco y horizontales que forman placas delgadas. La corteza inferior de color rojo cafésoso está dispuesta en capas, y tiene olor leve a menta y sabor amargo. Las ramitas de color verde a gris, un poco ásperas, tiene puntos verrugosos (lenticelas) inconspicuos. Las hojas están apiñadas en el ápice de la ramita (CATIE, 1998).

#### 2.1.2 Aspectos ecológicos

**Lluvia:** la Caoba del Pacífico necesita por lo menos 800 hasta 1000 milímetros de lluvia por año en los sitios de plantación. En un bosque seco puede tolerar hasta 6 meses sin lluvia (CONSEFORH, 1999).

**Altitud:** la Caoba del Pacífico puede crecer en sitios desde los 50 hasta los 1000 metros sobre el nivel del mar, sin embargo, para obtener mejores resultados, se recomienda plantarla entre los 50 a 800 metros sobre el nivel del mar (CONSEFORH, 1999).

**Suelos:** crece en suelos profundos, ricos en materia orgánica y bien drenados, lo cual determina su lento o rápido crecimiento. Crece mejor en suelos profundos de más de 50 centímetros (CONSEFORH, 1999).

### 2.2 MERCADO

Las Caobas son conocidas en el mercado internacional como “mahoganys” agrupándose bajo este nombre los géneros *Swietenia* y *Khaya*, el primero con dos especies *S. macrophylla* y *S. humilis* de las cuales la primera se comercializa en mayor escala, además tiene un mayor número de países productores (en Centro y Sur América) y la segunda prácticamente solo Honduras. Por otro lado las especies del género *Khaya* se producen en Africa.

La madera de las mahoganys es importada principalmente por países de Norteamérica, Europa y Japón (ITTO, 2000). La madera se comercializa de cuatro diferentes formas: en troza, aserrada, veneer y plywood (ITTO, 2000). Los precios van a variar según la especie, el país de procedencia de la madera, el importador y si la madera es comprada en el país de origen o si es comprada en el país importador.

Las variaciones en los precios internacionales pueden ser ilustradas por el siguiente ejemplo: en Brasil la madera en troza de primer grado en el mercado interno, aumentó entre la segunda quincena de agosto del 2000 y la segunda de mayo del 2001 de \$280 a \$495 por m<sup>3</sup>, para el género *Swietenia*. El precio más alto en este periodo se pagó en Inglaterra \$1250 por m<sup>3</sup> de plywood, para la mismo género.

Por otra parte Ghana exportó madera aserrada a la Unión Europea y U.S.A. a \$750 y \$510 por m<sup>3</sup> respectivamente sin presentar variación entre agosto del 2000 y mayo 2001, para mahogany del género *Khaya*. (ITTO, 2000)

Aunque la ITTO tiene registrada a *S. humilis*. y maneja precios de comercialización, no posee registros de venta para los últimos 2 años.

### 2.3 MICORRIZAS

La micorriza es la asociación de hongos con las raíces de una planta, en la mayor parte de los casos es benéfica, según Harley (1959) esta asociación simbiótica se da en el 90% de las plantas, mejorando la absorción de nutrientes, agua e incluso puede generar tolerancia, en el simbiote, a diferentes tipos de estrés. Según Brundrett *et al.*(1996), se han encontrado diferentes tipos de asociaciones y distintos patrones morfológicos, los más comunes son dos:

- a) Micorriza arbuscular (MA): en este tipo de asociación los hongos zigomicetos producen arbusculos, vesículas e hifas dentro de las células de la raíz.
- b) Ectomicorriza (ECM): donde en su mayoría basidiomicetos junto con otros forman un manto alrededor de las raíces y una red de Hartig entre las células de las raíces.

Las siguientes son también asociaciones micorrizógenas en la naturaleza pero menos comunes y generalmente de menor importancia que las anteriores:

- c) Orqui-micorrizas: donde el hongo produce hifas espirales dentro de las raíces (o tallos) de orquídeas.
- d) Ericáceas: espirales de hifas envuelven las células externas de los pelos radiculares absorbentes en el orden de las plantas Ericales.

- e) Ectendo: arbutropodo y monotropodo, sus asociaciones son similares a las asociaciones de las ectomicorrizas pero tiene características anatómicamente especializadas.

### 2.3.1 Plantas hospederas

En estudios de campo se ha encontrado que plantas con asociaciones micorrizógenas predominan en la mayoría de los ecosistemas naturales alrededor de todo el mundo (Brundrett *et al.*, 1996).

Según Bagyaraj (1991), las micorrizas arbusculares (MA), tienen el rango más amplio de hospederos y de distribución geográfica de todas las asociaciones micorrizógenas. De manera que es más fácil listar las familias de las especies que no forman MA que listar a las que lo hacen.

Entre las familias que no forman MA tenemos: Pinaceae, Betulaceae, Orchidaceae, Fumariaceae, Conmelinaceae, Urticaceae y Ericaceae. Entre las familias que raras veces forman MA: incluyen las Brassicaceae, Chenopodiaceae, Polygonaceae y Cyperaceae.

Familias que forman ambas, ectomicorrizas y MA: Jungladiaceae, Tiliaceae, Myrtaceae, Salicaceae, Fagaceae y Caesalpinaceae. Cultivos importantes con MA tenemos: trigo, maíz, todos los mijos, papas, frijoles, soya, tomate, manzana, naranjo, uvas, banano, tabaco, té, café, cacao, caña de azúcar, mango, espárrago, cardamomo y chile.

### 2.3.2 El hongo

Los hongos MA, siendo biótrofos, no pueden crecer en medio artificial y por lo tanto son clasificados de acuerdo a las características morfológicas de las esporas formadas en el suelo. Ciento veinte especies fueron descritas hasta 1987 y todas fueron agrupadas en una sola familia, las Endogonaceae. Se considera que la familia tiene su propio orden, están tentativamente situada en la clase de los Zygomycetos en la subdivisión Zygomycotina.

Los siete géneros que tiene son: *Endogone*, *Glomus*, *Sclerocystis*, *Entrophospora*, *Acaulospora*, *Scutellospora* y *Gigaspora*. Las especies dentro del género *Endogone* no producen asociación MA, los otros seis géneros si forman. (Bagyaraj, 1991).

### 2.3.3 Factores que afectan el desarrollo micorrizal

#### 2.3.3.1 Factores físicos:

**Temperatura:** se ha demostrado que la temperatura tiene una significativa influencia en la colonización y esporulación de MA bajo condiciones de invernadero. Altas temperaturas generalmente resultan en grandes colonizaciones de las raíces e incremento en la esporulación (Furlan y Fortín, 1973, citados por Bagyaraj, 1991). Estudiando el efecto de la temperatura Schenck y Schroder (1974, citados por Bagyaraj, 1991)

observaron que el máximo desarrollo de arbusculos ocurrió a la temperatura de 30°C pero esa colonización de micelios fue mayor entre los 28 y 34°C.

Daniels y Trappe (1980, citados por Bagyaraj, 1991) observaron que la temperatura de germinación óptima para esporas de *Glomus* y *Acaulospora* es alrededor de 20-25°C, mientras que *Gigaspora* tuvo un óptimo mucho más alto. Este estudio sugirió que incrementar la temperatura del suelo acelera el desarrollo de MA. Esto podría explicar el lento desarrollo de la infección en cultivos de clima templado (Black y Tinker, 1979, citados por Bagyaraj, 1991) en comparación con suelos del trópico.

Desde que más especies de MA existen en el mundo entero, es posible que las especies puedan adaptarse a las temperaturas. Esto fue sugerido por el trabajo de Schenck *et al.* (1975, citados por Bagyaraj, 1991), quien encontró que dos cepas de *Glomus* de la Florida germinaron mejor a 34°C, mientras que una de Washington tuvo un óptimo de 20°C.

**Luz:** los hongos MA obtienen sus fuentes de carbono de la planta hospedera y dependiendo así en de dos cosas, la habilidad de fotosíntesis de la planta y la translocación de fotosintatos a la raíz. Por lo tanto la luz puede afectar fuertemente el desarrollo de las micorrizas. El efecto estimulante de la luz sobre las micorrizas ha sido mostrado por Furlan y Fortin (1977, citados por Bagyaraj 1991). La sombra no sólo reduce la colonización y la producción de esporas sino también reduce la respuesta de la plantas a dicha colonización (Gerdemann, 1968, citado por Bagyaraj, 1991).

Redhead (1975, citado por Bagyaraj, 1991) postuló que la longitud del día podría planear un rol importante en el desarrollo de las MA y esto fue confirmado por Daft y El-Giahmi (1978, citados por Bagyaraj, 1991). Al menos, el efecto de la luz sobre las micorrizas parece depender de la fotosensibilidad de la especie de la planta hospedera (Redhead, 1975). En efecto, un fotoperíodo de 12 horas o más puede tener mayor importancia que la intensidad de la luz en promover altos niveles de colonización (Schenck y Schroder, 1974, citados por Bagyaraj, 1991). Este aspecto puede que sea particularmente interesante examinarlo en otras especies como café, cardamomo, etc. los cuales son cultivados en los trópicos bajo sombra.

**Agua:** MA ocurre en un rango amplio de contenido de agua en el suelo. Colonizaciones han sido encontradas en regiones áridas en xerófitas (Khan, 1974, citado por Bagyaraj, 1991), los suelos muy mojados de pantanos (Dowding, 1959, citado por Bagyaraj, 1991), también en plantas flotadoras libres (Bagyaraj *et al.*, 1979, citados por Bagyaraj, 1991) y plantas acuáticas (Clayton y Bagyaraj, 1984, citados por Bagyaraj, 1991). Esto fue lo que se creyó primero que en condiciones bajo saturación, la concentración de oxígeno pueden inhibir la esporulación del hongo y la colonización (Saif, 1981, citado por Bagyaraj, 1991).

Le Tacon *et al.* (1983, citados por Bagyaraj, 1991) observaron que para las esporas germinadas en aire que su subsecuente crecimiento estuvo poco afectado por la deficiencia de oxígeno hasta que esta tensión estaba por debajo de 3%. Las observaciones

recientes en micorrizas de plantas acuáticas sugieren que quizá en el agua hay una adecuada cantidad de oxígeno disuelto, y que concentraciones de sustancias tóxicas como Mn, H<sub>2</sub>S, ácidos orgánicos, etc., desarrollados bajo condiciones anaeróbicas son probablemente ausentes. El agua podría ser un factor de selección para ciertas especies de MA, que se adaptan a esos ambientes (Manjunath *et al.*, 1981, citados por Bagyaraj, 1991)..

### 2.3.3.2 Factores químicos

**Ph:** estudios hechos en el laboratorio, usando agar como medio de crecimiento, sugiere que una buena germinación de esporas de MA ocurre entre pH de 6 – 7, aunque existen casos de hongos germinando a pH 5 y debajo de este, así como a pH 8 y sobre este (Sequeira *et al.*, 1982, citado por Bagyaraj, 1991). Para *Gigospora corraloidea*, *G. heterogama* y *Glomus mosseae* utilizando agar como medio de crecimiento, se encontró el óptimo a pH de 5, 6 y 7 respectivamente (Green *et al.*, 1976, citados por Bagyaraj, 1991).

En el suelo, es muy difícil evaluar el efecto del pH debido a que muchas propiedades químicas del suelo varían con el pH del suelo. Se encontró que en el suelo más del 40% de las esporas de *Glomus epigeum* germinaron en un rango de pH entre 4.8 – 8.0 siendo el óptimo el pH de 7.0 (Daniels y Trappe, 1980, citados por Bagyaraj, 1991). Sparling and Tinker (1978, citados por Bagyaraj, 1991) no encontraron ningún efecto obvio en tres tierras de pasturas pH de 4.9; 5.9 y 6.2. Lambert y Cole (1980, citados por Bagyaraj, 1991) reportaron que seis cepas de *Glomus tenue* tuvieron diferentes habilidades de formar micorrizas a bajos pH.

Daft *et al.* (1975, citados por Bagyaraj, 1991) reportaron colonización de MA de considerable intensidad en plantas creciendo en escombros bituminosos en una mina a pH 2.7. El pH del suelo puede afectar la distribución de las micorrizas de una manera sutil.

**Fósforo (P):** se sabe que la adición de P al suelo afecta la colonización de MA a las raíces. Pero no es posible hacer recomendaciones concluyentes para niveles de P específicos en el suelo, para lo que hay varias razones.

La primera, no es el P del suelo *per se* que regula la colonización micorrizal, pero preferiblemente la cantidad de P absorbido por la planta hospedera (Menge *et al.*, 1978, citados por Bagyaraj, 1991). Lo segundo es que los métodos para la evaluación del fósforo disponible en el suelo a menudo difieren grandemente. El análisis del tejido es un método que está muy lejos de confiar para determinar el P disponible en el suelo en comparación a la mayoría de los métodos de análisis de suelo. Finalmente, debido a que las plantas hospederas varía en su habilidad de absorber P y el hongo micorrizal varía en su respuesta al P, cada simbionte planta-suelo-MA deben de ser analizados separadamente (Jasper y Robson., 1979 y Menge *et al.*, 1978, citados por Bagyaraj, 1991).

Análisis de fósforo en el tejido no siempre es un buen estimador de la colonización micorrizal porque las micorrizas mismas influyen en ese factor. Se ha pensado que el P influencia la colonización de MA afectando las concentraciones de carbohidratos de la raíz (Jasper y Robson, 1979, citados por Bagyaraj, 1991) o la cantidad de exudados (Graham *et al.*, 1981, citados por Bagyaraj, 1991) y por esa razón los efectos de la concentración de P pueden parcialmente ser superados por otros factores como la intensidad de la luz.

Según Jasper y Robson. (1979, citados por Bagyaraj, 1991) parece ser que el porcentaje de P en la planta al mismo tiempo que la colonización MA es el mejor indicador para identificar un suelo que proveerá una buena colonización de MA. La fuente de fósforo hará también variar la cantidad de inoculación en una planta, por ejemplo Sreenivasa y Bagyaraj (1989, citados por Bagyaraj, 1989) observaron que la aplicación de roca fosfatada a niveles 100 ppm resultó en mayor infección de propágulos de *Glomus fasciculatum* comparado con harina de hueso y el fertilizante superfosfato (Clarke y Mosse, 1981, citados por Bagyaraj, 1991). Porter *et al.* (1978, citados por Bagyaraj, 1991) encontraron que aplicaciones a largo plazo de superfosfato (15 años de 150 kg/ha/año) resultaron en poblaciones de MA endófitas que fueron poco afectados por estas adiciones subsecuentes.

**Pesticidas:** la mayoría de las investigaciones con pesticidas han sido emprendidas con fumigantes del suelo, funguicida y nematicidas los cuales exhiben un rango de actividad hacia los hongos. Fumigaciones hechas con los biocidas bromuro de metilo, Cloropicrin, formaldehido, Vapam y Vorlex mataron efectivamente endofitas en la zona de tratamiento. De manera interesante algunos nematicidas como: 1, 2-dibromo-3-cloropropano (DBCP) y 1,3-diclorpen, pueden estimular la infección de raíces en las plantas hospederas. Esto se cree que se debe al control que ejerce sobre la competencia y la microflora patógena, puede que estimulen los exudados de las raíces u otros factores (Bagyaraj, 1991).

Los funguicidas sistémicos como Thiobendazol, Benomyl y Triadimefon son muy tóxicos a estos hongos. También Pentacloronitrobenzeno que aunque no es sistémico es muy tóxico. En cuanto al efecto de herbicidas e insecticidas se han hecho pocas investigaciones de sus efectos en las asociaciones MA. Paraquat y Simazina son tóxicos para estos hongos mientras que, Trifluralin, Bromacil y Diuron no (Bagyaraj, 1991).

Los insecticidas Metasystox y Aldrin difieren en su actividad en MA de los cuales el segundo es el más tóxico (Bagyaraj, 1991). Muchos insecticidas contienen metales pesados y la presencia de estos en el suelo puede que sea la responsable de una pobre germinación de estos hongos ( Hepper y Smith, 1976, citados por Bagyaraj, 1991).

En suelos altamente ácidos, especialmente aquellos que se encuentran en el trópico, el manganeso y el aluminio pueden ser más solubles y alcanzar concentraciones que limitan el crecimiento de MA (Bagyaraj, 1991).

Los herbicidas selectivos no tienen efecto en los hongos pero reducen la contaminación de cultivos en potes lo que es útil para el mantenimiento y la producción de biomasa del hongo (Menge, 1984; citado por Bagyaraj, 1991).

**Salinidad:** iones de cloro y sodio inhiben la germinación de esporas de MA (Gildon y Tinker, 1983, citados por Bagyaraj, 1991). Bowen (1980, citado por Bagyaraj, 1991) encontró colonización típica de MA y esporas en suelos con más de 5000 ppm de cloruro. Bowen también construyó una hipótesis de que la MA podrían contrarrestar algunas formas de toxicidad del suelo absorbiendo elementos que dañan a la planta o asistiendo la tolerancia de las plantas a alta alcalinidad o a alta salinidad en suelos tropicales.

**Materia orgánica:** estudios realizados por Sheikh y Saif (1975, citado por Bagyaraj, 1991) en suelos de Pakistán, encontraron una correlación muy estrecha entre la población de esporas de endogenaceas y los niveles de materia orgánica del suelo. Números máximos de esporas fueron encontrados en suelos con contenidos de materia orgánica entre 1 - 2%, y las esporas se encontraron bien dispersas en suelos con contenidos de materia orgánica debajo de 0.5%. Ninguna correlación se encontró en suelos de clima templado, con contenidos altos de materia orgánica (2 - 13%).

Uno de los aspectos de estudio de materia orgánica que requiere suma atención es el impacto de los propios residuos de las raíces micorrizógenas en la ecología de la MA en el suelo. Un sin número de plantas micorrizógenas son de ciclo de vida anual, y por lo tanto los sistemas de las raíces micorrizógenas son constantemente incorporadas al suelo, siendo degradadas por los microorganismos.

Según Sparling y Tinker (1978, citado por Bagyaraj, 1991) uno de los muchos autores que afirman que las esporas no son necesarias para mantener la infección cuando hay presentes raíces colonizadas especialmente en el caso de comunidades naturales de plantas cuando las MA son de tipos que no esporulan o esporulan muy poco. Rives *et al.* (1980, citados por Bagyaraj, 1991) sugirieron que en áreas con baja precipitación anual el contacto entre los restos de una raíz colonizada y las raíces de plantas no infectadas podría constituir el modo más eficiente de dispersión micorrizal.

### 2.3.3.3 Factores biológicos

**Las plantas hospederas:** la presencia o ausencia de plantas hospederas obviamente desempeña un importante papel en que si habrá o no inoculación y si ocurrirá la esporulación subsiguiente. Especies de familias de plantas no hospederas como las Chenopodiaceae y Brassicaceae pueden a lo mucho ser colonizadas por MA (Kruckelmann 1975, citado por Bagyaraj, 1991).

Estudios hechos por Schenck y Kinloch (1980, citados por Bagyaraj, 1991) ilustraron que las especies de cultivo pueden por si mismas ejercer un efecto selectivo sobre la MA llegando a predominar dentro una población indígena mezclada. Ellos encontraron diferencias marcadas en poblaciones de MA entre diferentes monocultivos durante 7 años. Tres especies de *Gigaspora* fueron las más frecuentes en la asociación con las raíces

de soya, en contraste con algodón y maní, en donde dos especies de *Glomus* fueron las más numerosas.

Hasta el momento no hay una buena explicación de porque se da esta variación en dependencia hacia diferentes plantas. Una posibilidad es que las plantas con pelos radiculares gruesos y relativamente pocos sean más dependientes a las micorrizas que las que tienen raíces finas y pelos largos (St. John, 1980, citado por Bagyaraj, 1991). La reducción de área foliar de la planta por poda o defoliación puede reducir la colonización de las raíces y la esporulación (Sreenivasa y Bagyaraj, 1988, citados por Bagyaraj, 1991)

**Eficiencia de las MA:** las MA no son siempre igual de eficientes para cualquier especie de planta, y ellos varían sus interacciones fisiológicas con diferentes plantas y por lo tanto sus efectos sobre el crecimiento (Bagyaraj, 1991). Las especies y variedades de MA han mostrado diferenciar el fragmento al cual ellos incrementan la absorción de nutrientes y el crecimiento de la planta (Powell *et al.*, 1980, citado por Bagyaraj, 1991)

**Dormancia de las MA:** Tommerup (1983, citado por Bagyaraj, 1991) en su estudio reporto la dormancia de las esporas de *Aculospora laevis* las cuales tuvieron una dormancia sobre 6 meses, *Gigaspora calospora* por 6 – 12 semanas y *Gigaspora decipiens*, *Glomus caledonicus* y *G. monosporum* por unos pocos días. También Tommerup reportó que la dormancia fue más corta en suelos secos que suelos húmedos.

También sugirió que las dormancias de períodos cortos puede prevenir a la espora de germinar inmediatamente después de su formación afuera de la raíz, si dicha germinación ocurriera frustraría todos sus papeles al igual que lo haría un agente infeccioso con un cultivo. La dormancia larga podría proteger las esporas contra falsas roturas tempranas en una estación.

**Otros microorganismos del suelo:** de los microorganismos que colonizan la rizósfera, las MA ocupan un lugar único ecológicamente hablando, ya que están en parte adentro y en parte afuera de la planta. La parte del hongo que está dentro de la raíz no encuentra competencia con otros microorganismos del suelo. Esta es una ventaja que les permite alcanzar una biomasa más funcional en contacto íntimo con la raíz y aumentar así las ocasiones de ejercer un mayor efecto sobre las plantas. MA mejoraron marcadamente la nodulación y la fijación de nitrógeno causada por las bacterias de las leguminosas, principalmente proveyendo del alto fósforo requerido en el proceso de fijación. La colonización micorrizal permite también a los organismos beneficiosos del suelo como azotobacter y las bacterias solubilizadoras del fosfato, mantener números más altos de sus poblaciones, que del que habría alrededor de las plantas no micorrizógenas, y para ejercer efectos sinérgicos sobre el crecimiento de las plantas (Bagyaraj, 1991).

### **3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 LOCALIZACION DEL ESTUDIO**

El estudio fue realizado en Zamorano, en el vivero de la empresa de Cultivos Forestales (ZECFOR), en el periodo comprendido entre mayo y agosto del 2000.

Zamorano se encuentra localizado en el valle del Yeguaré, Francisco Morazán, Honduras, a 30 Km al SE de Tegucigalpa, ubicado a una altura de 800 msnm, en los 14° latitud Norte y 87° 02' longitud Oeste, con una precipitación promedio anual de 1100 mm distribuidas desde junio a noviembre, con una temperatura media anual de 24° C.

#### **3.2 METODOLOGIA**

El propósito fue: observar el efecto que tiene el Mycoral<sup>®</sup> en plántulas de *S. humilis*. en etapa de vivero. Para lo cual se describirá a continuación las variables que se midieron y como se procedió desde la preparación del medio hasta la recolección y análisis de los datos.

##### **3.2.1 Variables**

Hubo dos tipos de variables, el primer tipo de variables fueron las colectadas en el vivero, estas son: el diámetro a la altura del cuello de la raíz, medido con un Vernier Caliper, y la altura de la planta desde el suelo hasta la yema apical, esta medida fue tomada con una regla.

El otro tipo de variables fueron tomadas en el laboratorio, siendo necesario para confirmar la inoculación de los hongos micorrizógenos y para comparar el desarrollo del sistema radicular de las plantas infectadas versus plantas no infectadas, estas variables son: la longitud de las raíces secundarias en el punto medio entre el cuello y el ápice de la raíz y en este mismo punto se midió el diámetro.

##### **3.2.2 Preparación del medio**

Para el establecimiento del ensayo se necesitó preparar un medio compuesto de tierra y arena. Para lo que se utilizó suelo de la vega 5 de Monte Redondo, Zamorano. Su composición es detallada el Cuadro 1. Este suelo fue escogido por su bajo contenido de

fósforo (<17ppm ) lo que según Chiriboga<sup>1</sup> (2000) debe ser tomado como requisito para que pueda haber un desarrollo de estructuras del hongo y por ende una colonización de las células de las raíces.

**Cuadro 1.** Resultados del análisis de suelo.

Muestra	pH	% M.O.	%N TOTAL	ppm			
				P	K	Ca	Mg
M R vega 5	4.92	1.76	0.08	9	138	1050	127
Medio de Crecimiento	4.57	2.25	0.11	6	146	1357	165

La arena que se utilizó provino de una riachuelo de los alrededores de Zamorano. La mezcla final tuvo una proporción de 3:1, que representa 3 partes de tierra y una de arena, esto se determinó mediante pruebas empíricas de humedad y textura. De esta mezcla se utilizó 0.06 m<sup>3</sup>. La composición química del medio también se encuentra detallada en el Cuadro 1. Luego de preparado el medio, se procedió a llenado de las bolsas de polietileno de 6 × 12 pulg.

### 3.2.3 Preparación del vivero

Este fue ubicado en el área de vivero de la empresa ZECFOR. Debido a que la Caoba es una especie que necesita sombra durante las primeras semanas, se construyó una champa con reglas de madera, bambú y hojas de palmas, cuyas dimensiones fueron: 1 m de ancho por 7.75 m de largo y 1.30 m de alto.

### 3.2.4 Siembra

Para la siembra se utilizó semilla de la especie *S. humilis*, la procedencia San Antonio del Norte, La Paz, Honduras. Se realizó una preselección de la semilla, descartando las semillas que tuvieran manchas de hongos o malformaciones. Las semillas fueron escarificadas haciendo una herida en el vértice de la testa, lo que permitió absorber más humedad del suelo, acelerando los procesos de imbibición y germinación. La semilla se sembró a una profundidad de una vez su tamaño. La siembra de las plantas inoculadas se sustrajo tierra del pilón y se reemplazó por 60 gr de Mycoral<sup>®</sup>, el cual es tierra inoculada con diferentes estructuras (hifas y esporas) de 3 géneros de hongos micorrizógenos.

### 3.2.5 Mantenimiento

Las labores de mantenimiento realizadas en el vivero fueron: remoción de la tierra, deshierba, riego y fertilización.

<sup>2</sup> Chiriboga, G. 2000. Importancia del fósforo para los hongos micorrizógenos. Zamorano (Comun. Pers.)

**Remoción de tierra:** el riego aplicado a los pilones hizo que se fuera formando una capa de tierra compactada en la superficie de l. Esta capa pudo dificultar la filtración del agua afectando la imbibición y la germinación en los primeros 18 días después de la siembra. Para contrarrestar este efecto se quebró esta capa con una pequeña estaca de madera de unos 15 cm de longitud. Esto se realizó unas 5 veces durante el tiempo de vivero.

**Deshierba:** esta labor se llevó a cabo manualmente cada dos semanas, fue importante para evitar que las malezas compitieran con las plántulas, ya sea por el riego, los nutrientes o por el inóculo.

**Riego:** este se aplicó a diario durante las primeras dos semanas después de la siembra y luego se alternó con la lluvia. El riego se aplicó con una manguera con regadera a medio abrir para evitar que dañara las plántulas y la erosión.

**Fertilización:** se aplicó solamente urea a una dosis de 125 kg/ha que es recomendada por Mathew y Newton (1998). La urea fue disuelta en agua y se utilizó una jeringa para dosificar la cantidad exacta para cada plántula. La fertilización se realizó de esta manera para facilitar el manejo de pequeñas cantidades de urea necesarias de aplicar a cada plántula.

### 3.2.6 Transplante

El transplante se realizó a los tres meses y medio después de siembra. Se transplantaron 60 plántulas, estas fueron ubicadas junto a la plantación de Caobas de Florencia a un espaciamiento de  $2 \times 2$  m.

### 3.2.7 Pruebas de laboratorio

Las pruebas del laboratorio fueron hechas a los tres meses y medio después de siembra. Las plantas fueron escogidas al azar, se tomó una planta de cada bloque excepto de aquellos que tuvieran dos o menos plantas por tratamiento. Esto fue necesario para que pudieran quedar plantas para el transplante, ya que desde el inicio del ensayo se pensó seguir la investigación después de que las plantas fueran transplantadas. Dichas pruebas se describen a continuación:

**Tinción de raíces:** esto fue necesario para poder hacer montajes de placas al microscopio para poder comprobar si hubo colonización.

El método para clarificar y teñir raíces fue una modificación del método encontrado en el Anexo 1. La modificación del método fue realizada por el Ing. Gabriel Chiriboga y la técnico de laboratorio Tomaza Sánchez.

**Conteo de esporas:** esta prueba se utilizó para comprobar que hubo infección, y cuantificar la intensidad de la esporulación. La tierra se extrajo de la parte media del pilón. El procedimiento que se utilizó para preparar las esporas se puede ver en el Anexo 2.

El conteo se realizó para 10 gr. de suelo, el suelo para este conteo se tomo de la parte media del pilón cercana a la raíz. Con esta prueba se pretendía confirmar la colonización y evaluar la intensidad de la infección en los tejidos de las raíces por parte del hongo micorrizógeno.

**Longitud y diámetro de las raíces:** la longitud se midió en el punto medio de la distancia entre el cuello de la raíz y la parte apical de ésta. Las raíces secundarias en ese punto se colocaron de manera horizontal y se tomó la medición. El diámetro fue tomado en ese mismo punto. Con estas pruebas se trató de encontrar diferencias de crecimiento en el sistema radicular a consecuencia de la colonización de los hongos micorrizógenos.

**El peso seco:** para esto las plantas fueron cortadas en segmentos de entre 5 – 7 cm, se introdujeron individualmente en bolsas de papel, luego se dejaron en el horno a 279 f° por 2 días. Esta prueba se hizo con el propósito de encontrar diferencias en peso seco a causa de una mayor fijación de carbono en las plantas inoculadas con las MA.

### **3.2.8 Diseño estadístico**

El diseño estadístico que se utilizó fue el de bloques completamente al azar, el experimento contó con 10 bloques, cada bloque tuvo dos tratamientos; con Mycoral® y sin Mycoral® (control). Cada tratamiento tenía 6 plantas. El efecto de borde se contrarrestó colocando una línea de plantas alrededor de todos los bloques.

### **3.2.9 Análisis estadístico**

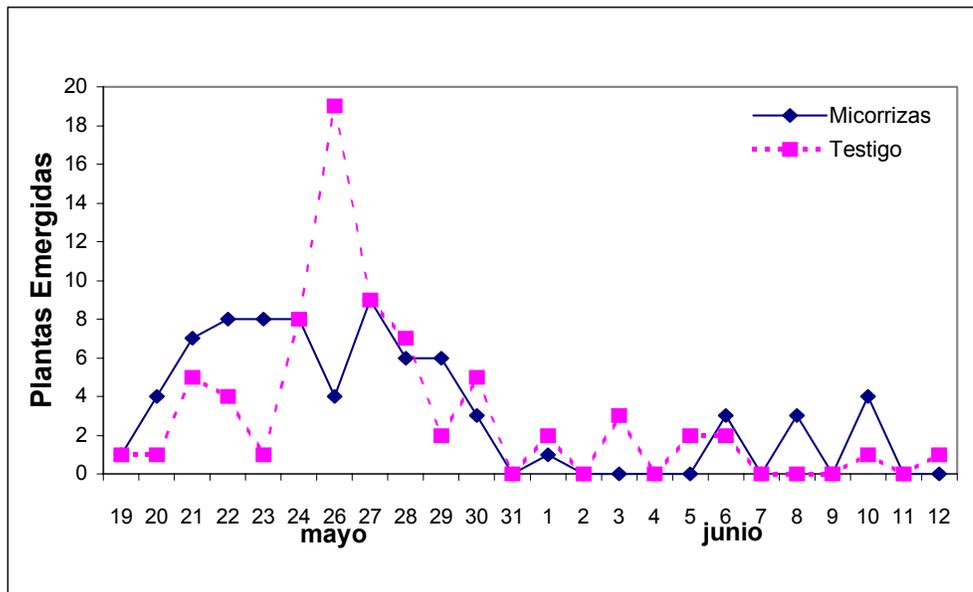
Los datos fueron analizados con el paquete “Statistical Analysis System” (SAS versión 6.04). Se hicieron pruebas de varianza y covarianza, esta última se utilizó para eliminar la variación debida a los diferentes días de germinación que hubieron, lo que implica que no todas las plantas comenzaron a crecer al mismo tiempo y así, no favorecer a las plantas que comenzaron a crecer primero.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 GERMINACION Y SOBREVIVENCIA

Las plantas fueron sembradas el 3 de mayo del 2000, germinando las primeras plantas a los 16 días, prolongándose el periodo de germinación hasta los 24 días, o sea hasta el día 12 de junio (Gráfico 1). El 90 % de la germinación se alcanzó a los 18 días.

**Gráfico 1.** Germinación de *S. humilis*. con y sin Mycoral®



El porcentaje de germinación fue bajo 66.7% y 68.3% para Mycoral® y el testigo respectivamente, en comparación con el ensayo diferentes dosis nitrógeno de Becerra (2000), el cual se realizó de manera paralela al de Mycoral®. La sobrevivencia se midió a los tres meses y medio después de siembra, del total de plantas germinadas 92% sobrevivieron en el tratamiento con Mycoral® y 90% en el caso del testigo.

### 4.2 ASPECTOS FITOSANITARIOS

El ensayo estuvo afectado por dos plagas; una es un insecto y la otra posiblemente un hongo.

### 4.2.1 Insectos

Las plántulas fueron atacadas por el lorito verde, un homóptero del género *Empoasca sp.* Estos poseen un estilete para succionar la savia de las plantas. La plaga se presentó más o menos al mes después de la germinación cuando las hojas estaban tiernas y los tallos succulentos, el daño causado al follaje fue: deformación de los folíolos presente en forma de arrugamiento de los bordes y ápice de los folíolos redondeados. El insecto afectó en mayor grado las hojas más jóvenes.

### 4.2.2 Hongo

El hongo se presentó como una quemadura localizada en los bordes de la parte media de los folíolos, con el tiempo esta quemadura avanzó hacia el ápice, luego los folíolos presentaban con una clorosis intervenal, hasta que toda la planta terminó clorótica, causando así la muerte. Las plantas afectadas fueron tomadas como muestras para ser analizadas, no se pudo obtener un resultado debido a que el hongo que se encontró en las muestras no produjo esporas en el medio de crecimiento, lo que impidió su identificación.

## 4.3 VARIABLES DE VIVERO : ALTURA Y DIAMETRO

**Cuadro 2.** Análisis de covarianza para la altura y el diámetro de las plántulas en vivero.

Tratamiento	media	cv	s	R-cuadrado	Valor F	Probabilidad
Altura Myco.	14.80 cm	13.70	2.03	0.72	0.15	0.6968
Altura Test.	15.62 cm	12.98				
Diametro Myco.	7.04 mm	14.99	1.06	0.46	0.2156	0.6614
Diametro Test.	6.97 mm	15.14				

Estas pruebas se realizaron con las mediciones hechas en la semana 6 y la semana 17 después de la siembra. En el Cuadro 2, se puede ver que la mayoría de los datos para la variable altura se adaptaron mejor aun modelo lineal, a diferencia de la variable diámetro. Los coeficientes de variación son muy similares, encontrándose todos en un rango aceptable. En ninguna de las variables se encontró diferencias significativas.

## 4.4 PRUEBAS DE LABORATORIO

Las pruebas de laboratorio fueron hechas con el propósito de encontrar evidencias de la colonización de hongos micorrizógenos en los tejidos de la raíz y buscar diferencias en el crecimiento.

#### 4.4.1 Análisis de variación para: peso seco, diámetro y altura de la raíz

En el Cuadro 3, la variación resultó ser muy alta lo que impidió encontrar diferencias significativas en alguna de las variables.

**Cuadro 3.** Análisis de varianza del peso seco, diámetro y altura de la raíz.

Tratamiento	media	cv	s	R-cuadrado	Valor F	Probabilidad
P.S. Myco	9.55 gr	27.40	2.62	0.72	0.15	0.70
P.S. Testigo	9.45 gr	27.69				
Diam. Myco	0.71 mm	19.56	0.14	0.46	0.22	0.66
Diam. Testigo	0.7 mm	19.91				
Long. Myco	22.25 cm	26.31	5.85	2.77	0.11	0.17
Long. Testigo	21.87 cm	26.76				

#### 4.4.2 Observaciones con el microscopio

**Gráfico 2.** Vesículas y arbuscúlos en raíces de *S. humilis*.



**Foto:** Chiriboga G. 2000. Lab. Biotecnología CCPA, Zamorano Honduras

Luego de ser teñidas las raíces se montaron en el microscopio para poder ser estudiadas. Se observaron claramente estructuras de micorriza (Gráfico 2) tanto en las plantas inoculadas con Mycoral<sup>®</sup> como en las testigo, solamente que en el caso de las plantas con Mycoral<sup>®</sup> la cantidad de estructuras (vesículas y arbuscúlos) fue muy superior.

#### **4.4.3 Conteo de esporas**

Esto se hizo sólo para complementar lo observado en el microscopio, y también se observaron esporas de hongos micorrizógenos en ambos tratamientos (con Mycoral<sup>®</sup> y testigo), en esta medición resultó no haber diferencia entre tratamientos ya que la media para Mycoral<sup>®</sup> en 10 ml de solución de suelo fue 289 esporas y para el testigo fue 280.

#### **4.5 COSTOS**

El costo de una planta sin ser inoculada es de L. 2.19 y el costo de una planta inoculada con Mycoral<sup>®</sup> es de L.2.39. El incremento del costo por planta debido al uso del Mycoral<sup>®</sup> es de un 9%.

## 5 DISCUSIÓN

El ensayo resultó tener una baja germinación 66%, en comparación con el ensayo de Becerra (2000) en donde se evaluó diferentes dosis de urea para *S. humilis*, teniendo éste un 82% de germinación. Antes del trasplante la sobrevivencia en ambos ensayos estuvo similar, 61% el caso del Mycoral<sup>®</sup> y 63% en el ensayo de Becerra. Esta baja germinación posiblemente se debió a la escarificación de la semilla, la que se realizó para acelerar la imbibición. Al realizarse esta práctica pudo dañarse cierto número de embriones o por otra parte, pudo ser que la herida hecha a la semilla durante la escarificación, fue más grande de lo necesario lo que causó una permeabilidad excesiva pudriendo la semilla.

No se encontraron diferencias significativas para las variables del vivero, altura (P= 0.6968) y diámetro (P= 0.6619).

El peso seco, la longitud y el diámetro en la parte media de las raíces, no fueron estadísticamente diferentes. Esto muy posiblemente se debió al bajo número de observaciones, lo que provocó una alta variabilidad, reflejado en el coeficiente de variación que en el caso más bajo resultó ser 19.56 % para la variable diámetro de la raíz impidiendo al modelo estadístico encontrar diferencias en las raíces.

Un conteo de espora reveló que había esporas de hongos micorrizógenos en las plantas con Mycoral<sup>®</sup>, confirmando la colonización de los tejidos de las raíces. Las observaciones al microscopio también revelaron presencia de estructuras de hongos (hifas, vesículas y arbusculos) en las raíces de las plantas que no fueron inoculadas (testigo), aunque con menor intensidad que las tratadas con Mycoral<sup>®</sup>. Esto puede tener al menos dos explicaciones.

La primera es: que durante la deshierba haya habido una contaminación cruzada, ya que al arrancar la maleza, la tierra que viene entre sus raíces pudo haber traído esporas que se diseminaron hasta alcanzar a las plantas testigo. El segundo origen pudo ser el medio de crecimiento no pasteurizado el que trajo esporas, raíces infectadas u otro tipo de tejido que le haya podido servir como medio de propagación a los hongos micorrizógenos nativos.

Por otra parte aunque haya habido contaminación, hay otros aspectos que pudieron impedir una diferenciación en el crecimiento. El primero es, que las plantas en vivero no han desarrollado su habilidad de fotosíntesis y de translocación de fotosintatos a la raíz, la combinación de estas características son muy importantes según Bagyaraj (1991) para establecer la fuente de carbono que le hubiera permitido a los hongos micorrizógenos conformar una simbiosis que beneficiara el crecimiento de las plantas.

El otro aspecto es acerca de la eficiencia de los hongos micorrizógenos la que según Bagyaraj (1991) no será siempre la misma para cualquier especie de planta, ellos variarán sus interacciones fisiológicas con diferentes plantas y por lo tanto sus efectos sobre el crecimiento. Esto abre la posibilidad para decir que ninguna de las especies de hongos contenidos en el Mycoral<sup>®</sup> prefirió a esta especie como planta hospedera y sólo se limitó a colonizar el tejido de la raíz pero sin desarrollar una simbiosis efectiva.

## 6 CONCLUSIONES

El Mycoral<sup>®</sup> no tuvo ningún efecto positivo en las plantas en vivero de *S. humilis*.

La ausencia de un sistema de fotosíntesis desarrollado y una deficiente translocación de fotosintatos a la raíz, pudo haber impedido la disponibilidad de carbono necesaria para que los hongos pudieran formar una interacción beneficiosa a las plantas inoculadas.

Debido a que los hongos son organismos vivos; pudo ser que la especie *S. humilis* no fue una planta hospedera de elección, para ninguna de las especies de hongos contenidos en el Mycoral<sup>®</sup>.

Aunque no haya habido una respuesta positiva en esta etapa, es necesario seguir evaluando durante las fases de crecimiento y desarrollo después del trasplante en el campo. Además que es muy probable que sea útil para otras especies de plantas.

Es posible que el Mycoral<sup>®</sup> sea efectivo en lugares donde no hay otras especies de hongos micorrizógenos como en las siembras en bandejas donde el medio es pasteurizado.

## 7 RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer un ensayo donde se agreguen más variables para ser evaluadas, como por ejemplo: diferentes dosis de Mycoral<sup>®</sup>, un bloque con medio esterilizado. Se debe agregar variables para evaluación cualitativa, como ser: vigorosidad de la planta (buena, regular o mala). Esto podría servir para ver si la micorriza está ayudando a la planta a soportar tipos de estrés que se presenten en esta etapa especialmente el ataque de plagas.
- Al momento de calcular el número de la población de plantas del ensayo, se debe tomar en cuenta el número de plantas que serán utilizadas en las pruebas de laboratorio, especialmente cuando se trata de especies forestales o frutales donde se piensa seguir investigando a largo plazo.
- Es importante medir las variables de crecimiento en la planta, pero también tienen que tomarse en cuenta las variables que se puedan medir en la raíz. Ya que en la etapa de vivero la simbiosis se está comenzando a formar en la raíz y allí es donde posiblemente el crecimiento va a ser más evidente.
- Al establecerse el vivero, las parcelas deben de aislarse por grupos homogéneos y dársele una distancia prudencial para evitar la contaminación cruzada por manejo.
- Para asegurar el mayor porcentaje de germinación se deben de colocar preferiblemente dos semillas por postura. Las parcelas deben de estar debidamente rotuladas desde el momento de la siembra hasta el transplante para evitar confusiones de tratamientos en el establecimiento en el campo.
- Para realizarse la deshierba no se recomienda arrancar las malezas de raíz sino, solo podarlas a ras de suelo. Esto para evitar que las esporas o hifas de los hongos micorrizógenos que hay en el medio se diseminen y contaminen otros tratamientos.
- Al momento de realizar las aplicaciones de plaguicidas se debe de tener conocimiento de que el producto que se está utilizando no vaya a afectar también a los hongos, y disminuya la eficacia de la colonización.
- Se necesita desarrollar un método de identificación de especies de hongos micorrizógenos ya sea por medio de las esporas o de PCR y electroforesis.
- Es necesario tener un inventario de las especies de hongos micorrizógenos nativos y si es posible clasificarlos según su agresividad para desarrollar la simbiosis.

- Es muy necesario la obtención de equipo para las investigaciones, una cámara para tomar fotos para microscopio. También una máquina especial para hacer cortes finos en el tejido la que mejorará las observaciones en el microscopio de los órganos de la planta como también; de hifas, arbusculos y vesículas de los hongos micorrizógenos.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Bagyaraj, D. J. 1991. Ecology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *In Handbook of applied mycology*, Ed. by Arora, D. K.; Rai, B.; Mukerji, K. G. y Knudsen, G. R. New York, Marcel Dekker. 3- 34.

Brundrett, M. C.; Bougher N.; Dell, B.; Grove, T. Y Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australia, ACIAR. 374 p.

Becerra Cruz, S. C. 2000. Determinación del nivel óptimo de fertilización nitrogenada para *Swietenia humilis* Zucc. (Caoba del Pacífico) en etapa de vivero. Tesis Ing Ag. Zamorano, Honduras. 36 p.

CATIE. 1998. Nota técnica sobre manejo de semillas forestales: *Swietenia humilis* Zucc. <http://www.catie.ac.cr/proyectos/prosefor/notas/Swietenia%20humilis.htm>. (accesada el 20 de agosto del 2000).

CITES, 2000. Listado de especies maderables: *Swietenia humilis* Zucc. <http://www.uco.es/organiza/servicios/jardin/cd1/Maderas%20CITES/swihumil.htm>. (accesada el 19 de julio de 2000).

CITES, 2001. Texto de la convención. <http://www.cites.org/esp/disc/text.shtml#IV>. (accesada 20 de marzo de 2001).

CONSEFORH. 1999. Caoba del Pacífico *Swietenia humilis* Zucc: Un árbol maderable de alto valor. <http://www.geocities.com/RainForest/4075/Swihum.htm>. (accesada el 6 de octubre del 2000).

FAO. 1998. Situación forestal en la región de América latina y el caribe. <http://www.rlc.fao.org/organos/coflac/98sf-s.htm>. (accesada el 14 de junio del 2001).

Guerrero, E. 1996. Micorrizas recurso biológico del suelo. Bogotá, Colombia. Fondo FEN Colombia. 206 p.

ITTO. 2001. Información de Mercado. <http://www.itto.or.jp>. (accesado 19 junio del 2001).

Holdridge, L. R. 1967. Life zone ecology. San José, Costa Rica, Tropical Science Center. 167 p.

Mathew, J. E. & Newton, A. C. 1998. The silviculture of mahogany. CABI Publishing. 226 p.

Salazar, M. 1990. Control de los incendios forestales en Honduras. *Unasylvaj (Italia)*. 41(162): 22 – 28.

## **BIBLIOGRAFIA SECUNDARIA**

La bibliografía que continuación se describe, es menciona en el artículo original de Bagyaraj (1991) y se consideró importante incluirla en esta sección.

Bagyaraj, D. J.; Majunath, A.; Patil, R. B. 1979. Occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizas in some tropical aquatic plants, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 72: 164 – 167.

Black, R. & Tinker, P. B. 1979. The development of endomycorrhizal root systems: Effect of agronomic factors and soil conditions on the development of vesicular – arbuscular mycorrhizal infection in barley and on the endophyte spore density. *New Phytologist*. 83: 401 – 413.

Bowen, G. D. 1980. Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems, *In Tropical mycorrhiza research*, Ed by Mykola, P. Oxford, Oxford University Press. P. 193-195.

Clarke, C. & Mosse, B. 1981. Field inoculation response of barely at two soil levels. *In Plants growth response to vesicular – arbuscular mycorrhiza*. *New Phytol.* 87: 695 – 703.

Clayton, J. S. & Bagyaraj, D. J. 1984. Vesicular arbuscular mycorrhizas in submerged aquatic plants of New Zealand. *Aquatic Botany*. 19: 251 – 262.

Daft, M. J. & El-Giahmi, A. A. 1978. Effect of defoliation and light on selected host. *New Phytologist*, 80: 365 – 3672.

Daft, M. J.; Hacskeylo, E.; Nicolson, T. H. 1975. Arbuscular mycorrhizas in plants colonizing coal spoils in Scotland and Pennsylvania, *In Endomycorrhizas*. Academic Press (London). 561 – 580 P.

Daniels, B. A. & Trappe, J. M. 1980. Factores que afectan la germinación de las esporas de los hongos vesículo – arbusculares, *Glomus epigaeus*. *Mycologia*. 19: 457 – 471.

Dowding, E. S. 1959. Ecology of endogone. *Transaction of the British Mycological Society*. 42: 449 – 457.

Furlan, V. & Fortin, J. A. 1973. Formation of endomycorrhizae by *Endogone caulospora* on *Allium cepa* under three different temperature regimes. *Quebec. Nat. Can.* 79: 467 – 477.

- Furlan, V & Fortin, J. A. 1977. Effects of light intensity on the formation of vesicular – arbuscular endomycorrhizas on *Allium cepa* by *Gygospora calospora*. *New Phytologist*, 79 : 335 – 340.
- Gerdemann, J. W. 1968. Vesicular – arbuscular mycorrhizal and plant growth. *Annual Review of Phytopathology*, 6: 397 – 418.
- Gildon, A. & Tinker, P.B. 1983. Interactions of vesicular – arbuscular mycorrhiza infection and heavy metals in plants: The effect of heavy metals on the development of vesicular arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist*. 95: 247 – 261.
- Graham, J. H.; Leonardo, R. T.; Menge, J. A. 1981. Membrane mediated decrease in root exudations responsible for phosphorus inhibition of vesicular – arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiology*. 68: 548 – 552.
- Green, N. E.; Graham, S. O.; Schenck, N. C. 1976. The influence of pH on the germination of vesicular – arbuscular mycorrhizal spores. *Mycology*. 68: 929 – 934.
- Harley, J.L. 1959. *The biology of Micorrhiza. edited by Nicholas Poulin.* Leonard Hill (Book) Limited, London, England. 253 p.
- Hepper, C. M. & Smith, G. A. 1976. Observations on the growth of endogone spores. *Transaction of the British Mycological Society*. 66: 189 – 194.
- Jasper, P. A. & Robson A. D. 1979. Phosphorus and the formation of vesicular – mycorrhizas. *Soil Biology and Biochemical*. 11: 501 – 505.
- Khan, A. H. 1974. The occurrence of mycorrhizas in halophytes and xerophytes of Endogone spores in adjacent soils. *Journal of General Microbiology*. 81: 7 – 14.
- Kruckelmann, H. W. 1975. Effects of fertilizers, soil, soil tillage and plants species on the frequency of Endogone chlamydospores and mycorrhizal infection in arable soil. *In Endomycorrhizas*, F. E. Sanders, B. Mosse, P. B. Tinker. Academic Press. London. P. 511 – 525.
- Lambert, D. H. & Cole, H. 1980. Effects mycorrhizae on establishment and performance of forage species in mine spoil. *Agronomy Journal*. 72: 257 – 260.
- Le Tacon, F.; Skinner, F. A.; Mosse, B. 1983. Spore germination and hyphal growth of a vesicular – arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*, under decreased oxygen and increased carbon dioxide concentration. *Can. J. Microbiology*, 29: 1280 – 1285.
- Manjunath, A; Mohan, T; Raj, J; Bagyaraj, D. J. 1981. Vesicular – arbuscular mycorrhizas in cultivars of rice. *Journal of Soil Biology and Ecology*. 1: 1 – 4.

- Menge, J. A. & Bagyaraj, D. J.; Jonson E. L. V.; Leonard, R. T. 1978. Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibitions of mycorrhizal infections. *New Phytologist*. 91: 683 – 609.
- Menge, J. A. 1984. Inoculum production. *In* VA micorriza. Ed. by Powell, C. L. y Bagyaraj, D. J.: CRC press, Boca Raton, FL. P 188 – 189.
- Porter, W. M.; Abott, L. K. & Robson, A. D. 1978. Effects of rate of application of super phosphate on populations of vesicular – arbuscular endophytes. *Australian Journal Experimental Agriculture*. 18: 573 – 578.
- Powell, C. L.; Metcalfe, D. M.; Buwalda, J. G.; Waller, J. E. 1980. Phosphate response curves of mycorrhizal and nonmycorrhizal plants: Responses to rock phosphate. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 23: 477 – 482.
- Redhead, J. F. 1975. Endotrophic mycorrhizas in Nigeria: Some aspects of the ecology of the endotrophic mycorrhizal association of *Khaya grandifolia* C.D.D. Academic Press, London. P. 447 – 459.
- Rives, C S.; Bajwa, M. I. & Liberta, A. E. 1980. Effects of topsoil storage during surface mining on the viability of VA micorriza. *Soil Sci*. 129: 253 – 257.
- Saif, S. R. 1981. The influence of soil aeration on the efficiency of vesicular – arbuscular mycorrhizae: Effect of soil oxygen on the growth and mineral uptake of *Eupatorium odoratum* L. inoculated with *Glomus macrocarpus*. *New Phytologist*. 88: 649 – 659.
- Schenck, N. C. & Kinloch, R. A. 1980. Incidence of mycorrhiza fungi on six field crops in monoculture on a newly cleared woodland site. *Mycology*. 72: 445 – 455.
- Schenck, N. C.; Graham, S. O. & Green, N. E. 1975. Temperature and light effects on contamination and spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycology*. 67: 1189 – 1192.
- Schenck, N. C. & Schroder, V. N. 1974. Temperature response of Endogone mycorrhiza on soybean roots. *Mycology*. 66: 600 – 605.
- Sequeira, J. O.; Hubell, D. H.; Shenck, N. C. 1982. Spore germination and germ tube growth of a vesicular – arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. *Mycology*. 74: 952 – 959.
- Sheikh, N. A. & Saif, S. R. 1975. Ecology of chemical soil factors: Relationship of endogone spore population with chemical soil factors. *Islamabad Journal of Science*. 2: 6 – 9.
- Sparling, G. P. & Tinker, P. B. 1978. Mycorrhizal infection in Pennine grassland: Levels of infection in the field. *Journal of Applied Ecology*. 15: 943 – 950.

Sreenivasa, M. N. & Bagyaraj, D. J. 1988. Effect of culture age and pruning on mass production of the VA mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum*. *Pertanika*. 1: 143 – 145

Sreenivasa, M. N. & Bagyaraj, D. J. 1989. Suitable form and level of phosphorus for mass productions of the VA mycorrhizal fungus, *Glomus Fasciculatum*. *Zbl. Mikrobiol.* 144: 34 – 36.

St. John, T. V. 1980. Root size, root hairs and mycorrhizal infection: A re – examination of Bylis's hypothesis with tropical trees. *New Phytologist*. 84: 483 – 487.

Tommerup, I. C. 1983. Spore dormancy in vesicular-arbuscular micorrizal fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81: 37 – 45.

## **9. ANEXOS**

**Anexo 1.** Método para clarificar y teñir muestras de raíces.

- a. Use equipo apropiado para más seguridad y para protección personal (p.e. anteojos, guantes y delantal)
- b. Use cassettes de plástico (denso polymer tissue cassettes de Fisher Scientific para retener las muestras de raíces).
- c. Todas las etapas que no incluyan calentamiento de químicos deben de ser llevadas a cabo en una cámara especial para el manejo de químicos reactivos.
- d. Lea cuidadosamente todas las instrucciones antes de empezar el proceso.

Etapas:

- 1) Prepare los cassettes con muestras de raíces y manténgalos en agua hasta que estén listas para clarificarlas.
- 2) Dispense en un beaker de 1 litro una cantidad suficiente que cubra todos los cassettes con un centímetro de 10% KOH.
- 3) Caliente el KOH hasta que alcance los 80 °C.
- 4) Ponga los cassettes en el KOH por el tiempo deseado:
  - i. 15 minutos para cebolla y otras raíces tiernas
  - ii. 30 minutos para la mayoría de raíces (p.e. maíz, gramíneas)
- 5) Lave con agua cinco veces.

NOTA: si las muestras de raíces tienen pigmentos oscuros (p.e. cafés, negros, morados) aún después del clarificar con KOH, ponga los cassettes en un beaker con 30% agua oxigenada bajo calor (10 minutos a  $\leq 50$  °C). Hasta que las muestras pierden el color y se vuelvan más claras, revíselas constantemente para evitar daños en las estructuras de las raíces. Enjuague cinco veces con agua y proceda a la etapa seis.

- 6) Cubra los cassettes con agua y aumente 5 mL de HCl por cada 200 ml de agua, mezcle y desagüe. Repítalo una vez. **\*\*No enjuague los cassettes con agua.\*\***
- 7) Dispense suficiente tinte azul de Trypan (0.5%) en un beaker de 1 o 2 litros para cubrir los cassettes con un centímetro del tinte (dependiendo del tamaño de la muestra)
- 8) Caliente el tinte azul hasta alcanzar 80 °C. No incluya los cassettes.
- 9) Coloque los cassettes en el tinte azul de Trypan. Mantenga la temperatura a 80 °C. Después de 30 minutos, déjelo enfriar hasta que la temperatura baje a 50 °C. Dispense

el tinte en un frasco, filtrándolo para remover pedazos de raíces, para ser rehusado dos veces al máximo. Enjuague los cassettes en el beaker una vez con agua.

10) Coloque las muestras teñidas en una bolsa plástica con etiqueta en el refrigerador.

La preparación del 0.5% tinte de azul Trypan: en un frasco añada constantemente los ingredientes en el siguiente orden: i) 800 mL glicerina, ii) 800 mL agua destilada, iii) 1,2 gr de tinte azul de Trypan.

**Fuente:** Sánchez 2000, Laboratorio de Biotecnología, CCPA, Zamorano.

## **Anexo 2.** Método para aislamiento de esporas.

- 1) Pese una porción de (submuestra) del suelo o medio de crecimiento colectado (p.e. 50 gr) lo mas pronto posible para evitar la desecación de las esporas.
- 2) Vacíe la submuestra en un envase de 2 litros y, usando una manguera pequeña, asperje al contenido del envase con un fuerte chorro de agua. Llénelo hasta un litro, y deje establecer las partículas de suelo por 15 a 30 segundos (nota: suelos arenosos requieren menos tiempo para establecerse). Vacíe la mezcla sin perturbar el sedimento y pásela por filtros de tamaños corrientes. Repita todo el proceso 1 o 2 veces. El tamaño de la malla del filtro debe reflejar el tamaño de las esporas deseadas. Por ejemplo, esporas de *Glomus erunicatum* pueden ser recolectadas en una malla de 63 micrones las cuales estarán relativamente libres de material inerte si se usa un filtro con malla de 200 micrones arriba.
- 3) Transfiera el material filtrado a un tubo de centrifugación de 50 mL de capacidad. Use un embudo pequeño para evitar pérdidas de material filtrado. Enjuague cuidadosamente para recolectar la mayoría de las esporas en los tubos de centrifugación. Use un embudo con chorro mas fino para mejores resultados. Si es necesario, añada agua hasta alcanzar aproximadamente un centímetro del borde del tubo.
- 4) Centrifugue a 3000 rpm (1230 x gr) por 3 minutos; deje la centrífuga parar por si sola. Vacíe la mezcla sin perturbar el sedimento (nota: las esporas están mezcladas con el suelo).
- 5) Suspenda las partículas de suelo en una solución de 40% (p/v) sucrosa. Sucrosa refrigerada es dispensada con una botella de un litro de capacidad. Mezcle bien y centrifugue a 3000 rpm por 1 minuto. Presione el freno de la centrífuga. Vacíe al mezcla en un filtro de malla de menor diámetro evitando salpicar agua. Enjuague las esporas cuidadosamente por un minuto para remover la sucrosa. Coloque las esporas en un plato petri de plástico, 5 cm capacidad, para ser observadas y añada suficiente agua para evitar la desecación de las esporas. No llene el plato demasiado. Séllelo con cinta plástica y póngalo en el refrigerador.

**Notas:**

- Lave las mallas en agua con bastante presión para evitar contaminación entre muestras. Es recomendable usar jabón.
- Las esporas pueden ser contadas fácilmente en un plato Petri marcado con líneas paralelas (aprox. 0.5 cm aparte una de la otra).
- Recupere las raíces recolectadas de la malla mas grande para observar los propágulos y/o el grado de colonización.
- Esporocarpios de *Sclerocystis sp.* pueden ser encontrados en las mallas de mayor diámetro.
- Normalmente, nosotros usamos la malla de 425 micrones para recolectar esporas de tamaños desconocidos provenientes de las muestras de campo.

**Fuente:** Sánchez 2000, Laboratorio de Biotecnología, CCPA, Zamorano.

**Anexo 3.** Artículo IV de la CITES.

### **Reglamentación del Comercio de Especímenes de Especies Incluidas en el Apéndice II**

1. Todo comercio en especímenes de especies incluídas en el Apéndice II se realizará de conformidad con las disposiciones del presente Artículo. La exportación de cualquier espécimen de una especie incluída en el Apéndice II requerirá la previa concesión y presentación de un permiso de exportación, el cual únicamente se concederá una vez satisfechos los siguientes requisitos.
  - a. Que una Autoridad Científica del Estado de exportación haya manifestado que esa exportación no perjudicará la supervivencia de esa especie.
  - b. Que una Autoridad Administrativa del Estado de exportación haya verificado que el espécimen no fue obtenido en contravención de la legislación vigente en dicho Estado sobre la protección de su fauna y flora.
  - c. Que una Autoridad Administrativa del Estado de exportación haya verificado que todo espécimen vivo será acondicionado y transportado de manera que se reduzca al mínimo el riesgo de heridas, deterioro en su salud o maltrato.
2. Una Autoridad Científica de cada parte vigilará los permisos de exportación expedidos por ese Estado para especímenes de especies incluídas en el Apéndice II y las exportaciones efectuadas de dichos especímenes. Cuando una Autoridad Científica determine que la exportación de especímenes de cualquiera de esas especies debe

limitarse a fin de conservarla, a través de su hábitat, en un nivel consistente con su papel en los ecosistemas donde se halla y en un nivel suficientemente superior a aquel en el cual esa especie sería susceptible de inclusión en el Apéndice I, la Autoridad Científica comunicará a la Autoridad Administrativa competente las medidas apropiadas a tomarse, a fin de limitar la concesión de permisos de exportación para especímenes de dicha especie.

3. La importación de cualquier espécimen de una especie incluida en el Apéndice II requerirá la previa presentación de un permiso de exportación o de un certificado de reexportación.
4. La reexportación de cualquier espécimen de una especie incluida en el Apéndice II requerirá la previa concesión y presentación de un certificado de reexportación, el cual únicamente se concederá una vez satisfechos los siguientes requisitos:
  - a. Que una Autoridad Administrativa del Estado de reexportación haya verificado que el espécimen fue importado en dicho Estado de conformidad con las disposiciones de la presente Convención.
  - b. Que una Autoridad Administrativa del Estado de reexportación haya verificado que todo espécimen vivo será acondicionado y transportado de manera que se reduzca al mínimo el riesgo de heridas, deterioro en su salud o maltrato.
5. La introducción procedente del mar de cualquier espécimen de una especie incluida en el Apéndice II requerirá la previa concesión de un certificado expedido por una Autoridad Administrativa del Estado de introducción. Únicamente se concederá un certificado una vez satisfechos los siguientes requisitos:
  - a. Que una Autoridad Científica del Estado de introducción haya manifestado que la introducción no perjudicará la supervivencia de dicha especie.
  - b. Que una Autoridad Administrativa del Estado de introducción haya verificado que cualquier espécimen vivo será tratado de manera que se reduzca al mínimo el riesgo de heridas, deterioro en su salud o maltrato.
6. Los certificados a que se refiere el párrafo 6 del presente Artículo podrán concederse por períodos que no excedan de un año para cantidades totales de especímenes a ser capturados en tales períodos, con el previo asesoramiento de una Autoridad Científica que haya consultado con otras autoridades científicas nacionales o, cuando sea apropiado, autoridades científicas internacionales.

**Fuente:** CITES, 2001.

**Anexo 4.** Otras especies con madera similar a la Caoba del Pacífico.

<b>Especie</b>	<b>Distribución</b>	<b>Nombre común</b>
<i>Swietenia macrophylla</i> King	Sur y Centro América	Caoba de hoja ancha
<i>S. mahagoni</i> (L.) Jacq.	Antillas y Florida	Caoba española
<i>Entandrophragma angolense</i> (Welw.) C. DC.	África	Tiama
<i>E. candollei</i> Harms	África	Kosipo
<i>E. cylindricum</i> (Sprague) Sprague	África	Sapelli
<i>E. utile</i> (Dawe & Sprague) Sprague	África	Sipo
<i>Khaya anthotheca</i> (Welw.) C. DC.	África	Acajou de África
<i>K. grandifoliola</i> C. DC.	África	Caoba de Benin
<i>K. ivorensis</i> A. Chev.	África	Acajou blanco
<i>K. nyasica</i> Stapf	África	Umbawa
<i>K. senegalensis</i> (Desr.) A. Juss.	África	Caoba africana
<i>Carapa guianensis</i> Aubl.	Sur y Centro América	Andiroba

**Fuente:** CITES, 2000.

**Anexo 5.** Clasificación de los hongos arbusculares.

CLASIFICACION ACTUAL ( a partir de MORTON & BENNY, 1990)	
División:	EUMYCOTA
Clase:	ZYGOMYCETES
Orden:	GLOMALES
Familias:	Glomaceae:
	Géneros: Glomus y Sclerocystis
	Acaulosporaceae
	Géneros: Acaulospora y Entrophospora
	Gigaspraceae
	Géneros: Gigaspora y Scutellospora

**Fuente:** Guerrero, 1996.

**Anexo 6.** Costos de vivero para una hectárea de Caoba del Pacífico sin inóculo.

<i>ACTIVIDAD</i>	<i>CANTIDAD</i>	<i>CTO UNID</i>	<i>CTO TOT Lp</i>	<i>CTO TOT \$</i>
<b>VIVERO</b>				
semilla kg.	2	180	360	24
fertilizante Lbs.	75	2	150	10
bolsas unidades	1,666	0.3	499.8	33.32
substrato m3 (tierra, arena)	5	61	305	20.33
siembra hombres	1.00	50	50	3.33
deshierbe hombres	5	50	250	16.67
riego hombres	3	50	150	10
fertilizacion hombres	6	50	300	20
llenado bolsas hombre	4	50	200	13.33
labores culturales hombre	0.66	50	33	2.2
nivelacion bancal hombre	0.25	50	12.5	0.83
construcc sombra hombre	1.00	50	50	3.33
vehiculo	1	150	150	10
imprevistos 10%				18
<b>total</b>				<b>185.35</b>

**Fuente:** Zecfor, 2000. Modificado por el autor.

**Anexo 7.** Costos de vivero para una hectárea de Caoba del Pacífico con inóculo.

<i>ACTIVIDAD</i>	<i>CANTIDAD</i>	<i>CTO UNID</i>	<i>CTO TOT Lp</i>	<i>CTO TOT \$</i>
<b>VIVERO</b>				
semilla kg.	2	180	360	24.00
Mycoral kg	5.5	31.3	172.15	11.11
fertilizante lbs.	75	2	150	10.00
bolsas unidades	1,666	0.3	499.8	33.32
substrato m3 (tierra, arena)	5	61	305	20.33
siembra hombres	2.00	50	100	6.67
deshierbe hombres	5	50	250	16.67
riego hombres	3	50	150	10.00
fertilizacion hombres	6	50	300	20.00
llenado bolsas hombre	4	50	200	13.33
labores culturales hombre	0.66	50	33	2.20
nivelacion bancal hombre	0.25	50	12.5	0.83
construcc sombra hombre	1.00	50	50	3.33
vehiculo	1	150	150	10.00
imprevistos 10%				22.30
<b>total</b>				<b>204.09</b>

**Fuente:** Zecfor, 2000. Modificado por el autor.