

**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS**

Fecha de presentación: Septiembre 2008.

Estación Experimental: Santa Catalina.

Programa: Fruticultura.

Proyecto: Mejoramiento de la productividad y calidad de la fruticultura en la Región Litoral, Andina y Amazónica del Ecuador.

Resultado: Desarrollo de las prácticas culturales y alternativas tecnológicas para el manejo integrado de los frutales.

Actividad: Exploración y uso de micorrizas para la producción de plantas de chirimoya (*Annona Cherimola*).

Título: Evaluación del efecto de las micorrizas en el crecimiento de plantas de chirimoya (*Annona cherimola mill*) variedad Cangahua, bajo condiciones semicontroladas.

Ubicación: Granja Experimental Tumbaco
Provincia de Pichincha.

Autor: Egda. María Salomé Castro Tafur.

Coautor: Ing. William Viera - INIAP
Dr. Wilson Vásquez – INIAP
Ing. Juan León - INIAP
Ing. Pablo Viteri – INIAP

Colaboradores: Lcda. Verónica Luna - PUCE
Dra. Josefina Egas - PUCE
Ing. Rocío Morales - ANCUPA

Fecha de inicio: Octubre del 2008

Fecha de terminación: Octubre del 2009

Presupuesto: \$. 4547,85

Fuentes de financiamiento:

INIAP	63%	\$ 2870,85
TESISTA	37%	\$ 1680

1. Antecedentes

La chirimoya (*Annona cherimola mill*), pertenece a la familia *Annonaceae*, la planta es proveniente de los Andes de Ecuador y Perú situados entre los 1 500 y 2 600 metros a nivel del mar. Es un fruto de clima subtropical y comportamiento semicaducifolio. El crecimiento y desarrollo de la planta es óptimo cuando la temperatura media anual está entre los 14°C y 24°C y sin mucha fluctuación, relativamente seco. A la chirimoya se le considera actualmente un producto de alta demanda y se estima que se mantendrá así algunos años debido a la poca oferta que existe en el mercado internacional. (TESTER, 1987).

Las micorrizas son estructuras formadas por la asociación de ciertas variedades de hongos que se establecen en simbiosis con la raíces de muchas plantas vasculares. Esta relación hongo – raíz es considerada una estructura microbiológica básica para la formación de ecosistemas agrícolas sostenibles (MORALES, 2004, BERNAL; MORALES, 2006). La simbiosis entre los hongos y las raíces es beneficiosa, ya que aportan con nutrientes como fósforo y otros minerales a la planta, que le sirven para su crecimiento y desarrollo. Esta interacción es muy compleja, las plantas que son colonizadas tienen la capacidad de reconocer señales químicas provenientes de los hongos y en estas se establece una retroalimentación, de comunicación y respuesta. (DUICELA, 2003). La principal función de los hongos micorrízicos es extender la exploración de las raíces en el suelo, lo cual hace más eficiente el proceso de absorción de nutrientes, ya que la superficie de absorción de las raíces colonizadas se incrementa hasta en 1.000 veces que la normal (GONZÁLES, 2004).

Estudios realizados en la Estación Experimental del Zaidín, en Granada España sobre la morfología de las micorrizas arbusculares en los cultivos de chirimoya muestran que existe un desarrollo exclusivo de hifas intracelulares principalmente con la especie *Glomus deserticola*. Esta morfología y colonización puede ser similar a la de otros microorganismos; sin embargo, esta depende únicamente del hospedero (AZCÓN *et. al*, 1994).

Otros estudios realizados en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biotecnología de la Estación Experimental “La Mayora” en Málaga - España revela que el efecto de inoculación con hongos micorrízicos en las plantas de chirimoya aumenta el crecimiento y la absorción de nutrientes principalmente en el periodo de aclimatación, y apoyan el establecimiento y propagación de los microorganismos en el suelo, tanto en plantas jóvenes como en adultas; la inoculación con hongos del género *Glomus* en plantas jóvenes triplica la absorción de macro y micro nutrientes, y en plantas adultas duplica la absorción de fósforo y de todos los micronutrientes (PADILLA, 2004).

En Ecuador se han desarrollado investigaciones de micorrizas en soya, cacao, papa, banano, palma aceitera, palmito, especies forestales, orquídeas, y cebolla de bulbo, en aspectos como grado de infección, aislamiento de micorrizas, métodos de conservación, variabilidad fenotípica, caracterización genética, tiempos de inoculación, efectividad como bio-protectores y en interacción con otros microorganismos como *Azotobacter* (BERNAL; MORALES, 2006).

2. Justificación

La presente investigación pretende estudiar la eficiencia de las micorrizas en la planta de chirimoya con el fin de mejorar el crecimiento y el desarrollo de estas plantas a nivel de vivero; ya que en la agricultura los hongos micorrízicos merecen especial interés por su efecto en el crecimiento vegetal, al incrementar la eficiencia del sistema radical en la absorción de nutrientes, especialmente fósforo y favorecer la absorción de elementos traza.

Además se intenta disminuir el uso de pesticidas debido a que las micorrizas crearán una barrera física contra organismos patógenos del suelo, constituyéndose en una alternativa ecológica que ayudará a preservar el medioambiente y a promover un enfoque de nuevas tecnologías orientadas hacia una tendencia de manejo sustentable que se puede integrar en el proceso de producción a fin de lograr un incremento en la productividad.

La información básica sobre la presencia de los hongos micorrízicos en el cultivo de chirimoya será de gran ayuda e interés para investigadores, viveristas y productores.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar la eficiencia de las micorrizas en el crecimiento de plantas de chirimoya (*Annona cherimola*) variedad Cangahua, bajo condiciones semicontroladas.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1.** Aislar hongos micorrízicos del suelo y evaluar el grado de asociación en las raíces de plantas de chirimoya.
- 3.2.2.** Seleccionar dos inóculos eficientes para evaluar el desarrollo de las plantas de chirimoya
- 3.2.3.** Determinar la capacidad infectiva de los hongos micorrízicos y el efecto en el desarrollo de plantas de chirimoya en condiciones semicontroladas.
- 3.2.4.** Evaluar los efectos en el crecimiento y contenido nutricional de las plantas con micorrizas en el vivero.

4. Hipótesis

H₀: El uso de micorrizas no tiene influencia en el crecimiento y contenido nutricional de las plantas de chirimoya.

5. Materiales y métodos

5.1. Materiales

Material de laboratorio:

Se utilizará los materiales y equipos de laboratorio de Microbiología Agrícola de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Reactivos:

- Hidróxido de Potasio (KOH) 10%
- Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) 30%

- Ácido Clorhídrico (HCl) 1N
- Azul de Tripán 0.05%
- Lactoglicerol 2:1:1
- Sacarosa 2N
- Alcohol antiséptico 95%
- Cloro 1.5%
- Agua estéril

Materiales empleados en invernadero

- Semillas de chirimoya
- Semillas de Sorgo
- Plantas de chirimoya
- Tierra esterilizada
- Pomina

5.2. Metodología

El proyecto consta de tres fases: laboratorio, invernadero y vivero

5.2.1. Fase de laboratorio

Esta fase incluye la evaluación de la presencia de hongos micorrízicos en las muestras de suelo y raíces obtenidas de los diferentes sitios de muestreo. Resultados que se utilizarán como información para la selección de los dos mejores inóculos.

5.2.1.1. Características del sitio experimental:

5.2.1.1.1. Ubicación geográfica

Esta fase se llevará a cabo en el laboratorio de Microbiología Agrícola de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador ubicada en la ciudad de Quito, y en el Centro de Investigación de Palma Aceitera (CIPAL) perteneciente a la Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Aceitera (ANCUPA) ubicada en el kilómetro 38 de la vía Santo Domingo - Quinindé cantón La Concordia.

5.2.1.2. Factores en estudio

5.2.1.2.1. Suelos

Se realizó un muestreo y análisis previo en cada uno de los siguientes sitios: Pichincha (Munango, San José de Minas, San Francisco de Atahualpa, San José de Atahualpa, Perucho), Imbabura (Tumbabiro, Cotacachi), Azuay (Gualaceo, Paute), Loja (Gonzanama, Vilcabamaba). De los cuales se escogió los 4 suelos con muy poco manejo y baja utilización de productos químicos, que tuvieron un alto conteo de esporas y mayor colonización de raíces.

Datos geográficos, climatológicos y edafológicos de los 4 sitios de muestreo¹

S1 = sitio 1:	Provincia:	Pichincha
	Cantón:	Quito
	Parroquia:	Atahualpa
	Lugar:	San Francisco de Atahualpa
	Altitud:	2100 m.s.n.m.
	Latitud:	0° 79' 65" N
	Longitud:	78° 22' 13" W
	Temperatura:	22°C
	Textura del suelo:	Franco - arenoso
S2 = sitio 2:	Provincia:	Imbabura
	Cantón:	Urcuquí
	Parroquia:	Tumbabiro
	Lugar:	Hda. "El Bohío"
	Altitud:	2120 m.s.n.m.
	Latitud:	00° 28' 3" N
	Longitud:	78° 11' 0" W
	Temperatura:	15°
	Textura del suelo:	Franco - arenoso
S3 = sitio 3:	Provincia:	Azuay
	Cantón:	Paute
	Parroquia:	Paute
	Lugar:	Hda. "Tutucan"
	Altitud:	2289 m.s.n.m.
	Latitud:	2° 46' 39" S
	Longitud:	79° 45' 32" W
	Temperatura:	23°C
	Textura del suelo:	Franco - arcilloso
S4 = sitio 4:	Provincia:	Loja
	Cantón:	Gonzanamá
	Parroquia:	Gonzanamá
	Lugar:	Hda. "El Tablón"
	Altitud:	2.042 m.s.n.m
	Latitud:	04° 13' 49"S
	Longitud:	079° 29' 52" W
	Temperatura:	17°C
	Textura del suelo:	Arcilloso – pesado

¹ INAMHI (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrografía). Ec.2008. Manual de Codificación Meteorológica. Quito. CAÑADAS, L.1983 Mapa bioclimático y ecológico del Ecuador; Quito; MAG – PRONAREG.

5.2.1.2.2. Tratamientos

Los tratamientos estarán constituidos por cuatro suelos seleccionados de los diferentes sitios de muestreo para el cultivo de chirimoya.

5.2.1.3. Unidad experimental

Estará constituido por una muestra compuesta de 1 kg de suelo, formada por 10 submuestras de 100 g, de cada los 4 sitios establecidos para el muestreo.

5.2.1.4. Análisis estadístico

Se utilizará estadísticos como: media, desviación estándar y coeficiente de variación. Además se realizará un análisis de correlación entre las características físicas (textura, humedad, densidad aparente) y químicas (pH, materia orgánica, nutrientes) de los suelos muestreados con el número de esporas presentes en los mismos.

5.2.1.5. Variables y métodos de evaluación

5.2.1.5.1. Población de esporas micorrízicas del suelo

La cuantificación de esporas se realizará por el método de tamizado y centrifugado descrito por Herrera (1993).

5.2.1.5.2. Tasa de colonización micorrízicas en raíces

Se utilizará el método de clarificación y tinción de raíces, siguiendo la técnica de Phillips y Hayman, descrita por Herrera (1993).

5.2.1.6. Manejo específico del experimento

5.2.1.6.1. Muestreo de suelo para determinación de esporas

El muestreo se realizará a alrededor de la corona de plantas seleccionadas al azar a una profundidad de 20 cm. La muestra estará compuesta por 10 submuestras de 100 gramos. Las muestras serán extendidas sobre un papel periódico y secadas a temperatura ambiente, bajo sombra durante 15 días en el laboratorio, para luego realizar la cuantificación de esporas presentes en el suelo. (Anexo 2).

5.2.1.6.2. Muestreo de suelo para análisis químico

Para el análisis físico – químico del suelo se delimitará el área del terreno buscando tomar siempre en forma separada, muestras de áreas diferentes, se recorrerá el área en forma de X y se procederá a tomar submuestras hasta obtener 1kg, luego se procederá a identificar la muestra con todos los datos necesarios. Las muestras serán enviadas al laboratorio de suelos de la EESC.

5.2.1.6.3. Muestreo de suelo para análisis físico

Para el análisis de la textura del suelo se tomará la muestra con un barreno común a 20 cm de profundidad, haciendo varias submuestras del terreno. Se mezclarán todas las submuestras y se obtendrá una sola de aproximadamente 1kg para luego enviar al laboratorio de suelos de la EESC.

Para el análisis de humedad y densidad aparente se tomará una sola muestra con un barreno cilíndrico específico a 20 cm de profundidad. La muestra será secada en estufa a 110 C para obtener estos datos mediante el método gravimétrico

5.2.1.6.3. Muestreo de raíces

Para obtener muestras de raíces, se deberá tomar como referencia la copa del árbol de chirimoya, con ayuda de una pala de desfonde se procederá a cavar a una profundidad de 40 x 40cm para que de esta forma se pueda buscar y obtener raíces terciarias y cuaternarias sanas, jóvenes y poco lignificadas. Las cuáles serán llevadas al laboratorio, para teñirlas y determinar la tasa de colonización micorrízica. (Anexo 1)

5.2.2. Fase de invernadero

La fase de invernadero comprenderá la evaluación de los cuatro suelos seleccionados, utilizando plantas trampa (sorgo) para la multiplicación del inóculo.

5.2.2.1. Ubicación geográfica

La fase de invernadero se llevará a cabo en la Granja Experimental Tumbaco perteneciente a la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) ubicada en el cantón Quito en la parroquia de Tumbaco.

5.2.2.2. Factores en estudio.

Se utilizará los mismos factores de la fase de laboratorio

5.2.2.2.1. Suelos

Se utilizarán los 4 suelos seleccionados en la fase de laboratorio para ser utilizados como inóculo en la multiplicación de hongos micorrízicos

S1 = sitio 1 (San Francisco de Atahualpa)

S2 = sitio 2 (Hacienda “El Bohio”)

S3 = sitio 3 (Hda. “Tutucan”)

S4 = sitio 4 (Hda. “El Tablón”)

S5 = testigo (Tierra Negra y Pomina)

5.2.2.2.2. Tratamientos

Los tratamientos estarán constituidos por cuatro suelos seleccionados de los diferentes sitios de muestreo para el cultivo de chirimoya más un testigo

5.2.2.3. Unidad experimental

Estará constituido por una maceta de 2 kg de capacidad en la cual se colocaran 10 semillas de de sorgo (planta trampa), manteniéndolas hasta el final del ciclo estimado de reproducción del inóculo.

5.2.2.4. Diseño experimental

Se aplicará un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cinco observaciones.

5.2.2.4.1. Análisis estadístico

Cuadro 1: Esquema del análisis de varianza para evaluar los suelos seleccionados de los diferentes sitios de muestreo para el cultivo de chirimoya (*Ammona cherimola*). 2008

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total	24
Tratamientos	4
Error experimental	20

5.2.2.4.2. Análisis funcional

Se realizará la prueba de Tukey al 5% para tratamientos

5.2.2.5. Variables del cultivo trampa

5.2.2.5.1. Población de esporas micorrízicas del suelo

A los 90 días después de la siembra de las plantas trampa, se realizará la cuantificación de esporas utilizando el método de tamizado y centrifugado descrito por Herrera (1993).

5.2.2.5.2. Tasa de colonización micorrízicas en raíces

A los 90 días después de la siembra de las plantas trampa se evaluará la tasa de colonización utilizando el método de clarificación y tinción de raíces, siguiendo la técnica de Phillips y Hayman, descrita por Herrera (1993).

5.2.2.5.3. Número de hojas

Cada 15 días durante tres meses, se contabilizará el número de hojas de las plantas trampa.

5.2.2.5.4. Altura de planta (cm)

Cada 15 días durante tres meses, se medirá el incremento en altura de las plantas trampa de la base del tallo hasta el ápice.

5.2.2.5.5. Biomasa producida

A los 90 días de instalado el ensayo se evaluará la biomasa producida en el Departamento de suelos y Aguas de EESC.

5.2.2.6. Manejo específico del experimento

5.2.2.6.1. Desinfección de semillas

Para este estudio se utilizará las semillas de sorgo que serán colocadas en alcohol antiséptico durante 3 minutos, posteriormente serán remojadas con una solución de cloro al 1.5% durante 2 minutos y enjuagadas 5 veces consecutivas con agua destilada esterilizada.

5.2.2.6.2. Evaluación de las plantas trampa y multiplicación del inóculo

Se sembrarán 10 semillas de sorgo (plantas trampa) en macetas de 2 kg de capacidad, en las cuales se colocará sustrato conformado por una parte de tierra negra estéril, una parte de pómida y dos partes del suelo muestreado. Después de 3 meses de reproducido el inóculo se escogerán 3 plantas al azar para evaluar la colonización de raíces, de las cuales se sacará un promedio para obtener un dato representativo; cada 15 días se

evaluaran la altura y el número de hojas de 3 plantas al azar que servirán también para ser usadas en la determinación de biomasa al final del ciclo, de las cuales se sacara un promedio para obtener un dato representativo y las 4 plantas restantes se utilizarán para formar el inóculo que será utilizado en la fase de vivero.

5.2.2.6.3. Selección de los dos mejores inóculos

En base a la capacidad de colonización de los diferentes consorcios micorrízicos y a la eficiencia de los mismos se seleccionarán los 2 mejores inóculos para ser probados en condiciones semicontroladas de vivero

5.2.2.6.4. Preparación del Inóculo

Diez días antes de utilizar el inóculo se cortará las plantas trampa por la base del tallo y se dejará de regar. Así se matará la planta y se engañará al hongo para que produzca esporas reproductivas. Diez días después se preparará el inóculo mezclando las raíces de las plantas trampa las cuales se cortarán en pedazos de aproximadamente 1cm., y la tierra de la maceta. Esta mezcla de raíces y tierra servirá como inóculo.

5.2.3. Fase de vivero - Ensayo A

En la fase de vivero se evaluarán los dos mejores inóculos (suelos muestreados) seleccionados en base a los resultados de la fase de laboratorio y de invernadero.

5.2.3.1. Ubicación geográfica

La fase de vivero se llevará a cabo en la Granja Experimental Tumbaco perteneciente a la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) ubicada en el Cantón Quito, en la Parroquia de Tumbaco.

5.2.3.2. Factores de estudio

5.2.3.2.1. Tipo de material vegetativo (t)

t1 = Semilla

5.2.3.2.2. Inoculo (I)

i1= inóculo seleccionado 1

i2= inóculo seleccionado 2

i3= inóculo comercial

i4= testigo absoluto.

5.2.3.2.3. Tratamientos

El tratamiento del ensayo A estará constituido por 3 inóculos y un testigo evaluados en semilla, dando un total de 4 tratamientos.

Cuadro 2.- Tratamientos a analizar en el ensayo de evaluación del uso de micorrizas en las semillas de chirimoya (*Annona cherimola*). 2008

TRATAMIENTO	CODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
1	I1t1	Semilla + inoculo 1
2	I2t1	Semilla + inoculo 2
3	I3t1	Semilla + inoculo comercial
4	I4t1	Semilla + testigo absoluto

5.2.3.3. Unidad experimental

En el ensayo A la unidad experimental estará constituida por una semilla de chirimoya, sembrada en una funda de 2 kg. de sustrato con 200 gramos de inóculo.

5.2.3.4. Diseño experimental

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 10 observaciones

5.2.3.4.1. Análisis estadístico.

Cuadro 3: Esquema del análisis de varianza para evaluar del uso de micorrizas en las semillas de chirimoya (*Annona cherimola*), 2008.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad
Total	39
Tratamientos	3
Error experimental	36

5.2.3.5. Análisis funcional

Se realizara la prueba de Tukey al 5% para tratamientos

5.2.3.6. Variables y métodos de evaluación

5.2.3.6.1. Altura de las plantas y número de hojas

En todas las repeticiones, se medirá la altura, expresada en centímetros, desde la base del tallo hasta la yema apical, además se registrará el incremento en el número de hojas. Los datos se tomarán cada 15 días a partir del primer mes de instalado el ensayo

5.2.3.6.2. Diámetro del tallo

Se determinara midiendo el diámetro del tallo, expresado en milímetros, a una altura de 10 cm de la base del tallo. Los datos se tomarán mensualmente a partir del primer mes de instalado el ensayo

5.2.3.6.3. Tasa de colonización micorrízica en raíces

Al quinto mes después de inoculadas las semillas de chirimoya, se determinará la tasa de colonización mediante la clarificación y tinción de raíces, por medio de la técnica de Phillips y Hayman, descrita por Herrera (1993). Para obtención de datos se procesará las raíces de 5 plantas de las 10 repeticiones utilizadas en esta fase.

5.2.3.6.4. Concentración de nutrientes

Al quinto mes después de inoculadas las semillas de chirimoya, se determinará la concentración total de nutrientes en el tejido vegetal mediante un análisis bromatológico en el Departamento de Nutrición y Calidad de la EESC. Para obtención de datos se procesarán 5 plantas de las 10 repeticiones utilizadas en esta fase

5.2.3.6.5. Absorción y extracción total de nutrientes

Al quinto mes después de inoculadas las semillas de chirimoya, se determinará los valores de absorción y extracción total de nutrientes en el tejido vegetal (Planta completa). Los análisis se realizarán en el Departamento de Nutrición y Calidad de la

EESC. Para obtención de datos se procesarán 5 plantas de las 10 repeticiones utilizadas en esta fase

5.2.3.6.6. Biomasa

Al quinto mes después de inoculadas las semillas de chirimoya, se medirá el peso fresco (gramos), por separado, de raíz, tallo y hojas. Las muestras se colocaran en la estufa por 24 horas a 110 °C para luego medir el peso seco de cada una. Para la obtención de datos, en el caso de raíces se utilizarán 5 plantas, para tallo y hojas se utilizara el material vegetal de las 10 repeticiones.

5.2.3.7. Manejo específico del experimento

5.2.3.7.1. Desinfección de semillas

Para este estudio se utilizará el ecotipo Cangahua, las semillas serán colocadas en alcohol antiséptico durante 3 minutos, posteriormente serán remojadas con una solución de cloro al 1.5% durante 2 minutos y enjuagadas 5 veces consecutivas con agua destilada esterilizada.

5.2.3.7.2. Pregerminación de semillas

Las semillas se sumergirán en una solución de ácido giberelico a una concentración de 1250 ppm por 24 horas.

5.2.3.7.3. Siembra del Ensayo

Para la siembra del ensayo se colocarán en fundas de 2 kg, una cantidad de sustrato (en proporción 3:1) compuesto por tierra negra estéril y pomina. Se rellenará los 2/3 de la funda con el sustrato estéril, luego se colocará 200 gramos del inóculo preparado según el tratamiento más una capa de sustrato estéril donde se realizará la siembra de una semilla de chirimoya, para que de esta manera cuando salgan las primeras raíces sean infectadas por las esporas de micorrizas y finalmente se completará la funda con otra capa de sustrato estéril.

5.2.3.7.4. Fertilización por planta

Se realizará una fertilización media en base al análisis físico-químico del sustrato que se realizará en el laboratorio de suelos de la EESC.

5.2.3.7.5. Labores culturales

Los riegos y deshierbes se realizarán según las necesidades del cultivo.

5.2.4. Fase de vivero - Ensayo B

En la fase de vivero se evaluarán los dos mejores inóculos (suelos muestreados) seleccionados en base a los resultados de la fase de laboratorio y de invernadero.

5.2.4.1. Ubicación geográfica

La fase de vivero se llevará a cabo en la Granja Experimental Tumbaco perteneciente a la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) ubicada en el cantón Quito, en la parroquia de Tumbaco.

5.2.4.2. Factores de estudio

5.2.4.2.1. Tipo de material vegetativo (t)

t2 = planta

5.2.4.2.2. Inoculo (I)

i1= inóculo seleccionado 1

i2= inóculo seleccionado 2

i3= inóculo comercial

i4= testigo absoluto.

5.2.4.2.3. Tratamientos

El tratamiento del ensayo B estará constituido por 4 inóculos evaluados en planta, dando un total de 4 tratamientos.

Cuadro 4.- Tratamientos a analizar en el ensayo de evaluación del uso de micorrizas en las plantas de chirimoya (*Annona cherimola*). 2008

1	I1t2	Planta + inoculo 1
2	I2t2	Planta + inoculo 2
3	I3t2	Planta + inoculo comercial
4	I4t2	Planta + testigo absoluto

5.2.4.3. Unidad experimental

En el ensayo B la unidad experimental estará constituida por una planta de chirimoya, sembrada en una funda de 2 kg. de sustrato con 200 gramos de inóculo.

5.2.4.4. Diseño experimental

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 10 observaciones

5.2.4.4.1. Análisis estadístico.

Cuadro 5: Esquema del análisis de varianza para evaluar del uso de micorrizas en las plantas de chirimoya (*Annona cherimola*), 2008.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad
Total	39
Tratamientos	3
Error experimental	36

5.2.4.5. Análisis funcional

Se realizara la prueba de Tukey al 5% tratamientos

5.2.4.6. Variables y métodos de evaluación

5.2.4.6.1. Altura de las plantas y número de hojas

En todas las repeticiones, se medirá la altura, expresada en centímetros, desde la base del tallo hasta la yema apical, además se registrará el incremento en el número de hojas. Los datos se tomarán cada 15 días a partir del primer mes de instalado el ensayo

5.2.4.6.2. Diámetro del tallo

Se determinara midiendo el diámetro del tallo, expresado en milímetros, a una altura de 10 cm de la base del tallo. Los datos se tomarán mensualmente a partir del primer mes de instalado el ensayo

5.2.4.6.3. Tasa de colonización micorrízica en raíces

Al quinto mes después de inoculadas las plantas de chirimoya, se determinará la tasa de colonización mediante la clarificación y tinción de raíces, por medio de la técnica de Phillips y Hayman, descrita por Herrera (1993). Para obtención de datos se procesará las raíces de 5 plantas de las 10 repeticiones utilizadas en esta fase.

5.2.4.6.4. Concentración de nutrientes

Al quinto mes después de inoculadas las plantas de chirimoya, se determinará la concentración total de nutrientes en el tejido vegetal mediante un análisis bromatológico en el Departamento de Nutrición y Calidad de la EESC. Para obtención de datos se procesarán 5 plantas de las 10 repeticiones utilizadas en esta fase

5.2.4.6.5. Absorción y extracción total de nutrientes

Al quinto mes después de inoculadas las plantas de chirimoya, se determinará los valores de absorción y extracción total de nutrientes en el tejido vegetal (Planta completa). Los análisis se realizarán en el Departamento de Nutrición y Calidad de la EESC. Para obtención de datos se procesarán 5 plantas de las 10 repeticiones utilizadas en esta fase

5.2.4.6.6. Biomasa

Al quinto mes después de inoculadas las plantas de chirimoya, se medirá el peso fresco (gramos), por separado, de raíz, tallo y hojas. Las muestras se colocaran en la estufa por 24 horas a 110 °C para luego medir el peso seco de cada una. Para la obtención de datos, en el caso de raíces se utilizarán 5 plantas, para tallo y hojas se utilizara el material vegetal de las 10 repeticiones.

5.2.4.7. Manejo específico del experimento

5.2.4.7.1. Implementación

Para la siembra del ensayo se colocarán en fundas de 2 kg, una cantidad de sustrato (en proporción 3:1) compuesto por tierra negra estéril y pomina. Se rellenará los 2/3 de la funda con el sustrato estéril, luego se colocará 200 gramos del inóculo preparado según el tratamiento luego se realizará la siembra de una planta de chirimoya procurando que las raíces estén en contacto con el inóculo y finalmente se completará la funda con otra capa de sustrato estéril

5.2.4.7.2. Fertilización por planta

Se realizará una fertilización media en base al análisis físico-químico del sustrato que se realizará en el laboratorio de suelos de la EESC

5.2.4.7.3. Labores culturales

Los riegos y deshierbes se realizarán según las necesidades del cultivo.

6. Cronograma

Cuadro 6. Desarrollo de actividades del proyecto “Evaluación de la eficiencia del uso de micorrizas en el crecimiento de plantas de chirimoya (*Annona cherimola*) bajo condiciones semicontroladas”

TIEMPO	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me
ACTIVIDADES	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Definición de los sitios de muestreo	X											
Recolección de frutos		X										
Extracción de Semillas		X										
Secado de Semillas		X										
Preparación del material y reactivos		X										
Recolección del suelo y raíces en los sitios de muestreo			X	X								
Aislamiento de hongos micorrízicos			X	X	X							
Trampeo y preparación del inoculo					X	X	X					
Inoculación en plantas y semillas							X					
Siembra y transplante del ensayo							X					
Toma de datos							X	X	X	X	X	
Evaluación de resultados									X	X	X	
Elaboración del informe de tesis										X	X	X

7. Presupuesto

Cuadro 7. Presupuesto para el estudio de la eficiencia del uso de micorrizas en plantas de chirimoya (*Annona cherimola*)

RUBRO	UNIDAD	CANTIDAD	VALOR UNITARIO USD	Financiamiento INIAP	Financiamiento Tesista	VALOR TOTAL USD
Materiales laboratorio						
Tamiz	Unid.	1	120,00	120,00		120,00
Soporte universal	Unid.	1	50,00	50,00		50,00
Piceta	500ml	1	4,00	4,00		4,00
Pinza de punta de aguja	Unid.	1	8,00	8,00		8,00
Azul de Tripán	gramos	10	1,44	14,40		14,40
Ácido Clorhídrico	litro	1	11,25	11,25		11,30
KOH	gramos	100	0,052	5,20		5,20
Peróxido de Hidrógeno	litro	1	11,80	11,80		11,80
Ácido Láctico	mililitros	100	0,076	7,60		7,60
Glicerol	litro	1	30,00	30,00		30,00
Alcohol Polivinílico	1 litro	1	150,00	150,00		150,00
Sacarosa	gramos	640	0,08	51,20		51,20
Alcohol industrial	galón	1	10,00	10,00		10,00
Porta Objetos	caja	1	1,40	1,40		1,40
Cubre Objetos	24x50-honza	1	4,50	4,50		4,50
Caja guantes quirúrgicos	100 pares	1	7,00	7,00		7,00
Manguera con regadera de lavado	Unid.	1	5,00	5,00		5,00
Recipiente para lavado	Unid.	1	3,00	3,00		3,00
Embudo	Unid.	1	1,00	1,00		1,00
Materiales fase invernadero y vivero						
Semilla	Unid.	100	0,05	5,00		5,00
Macetas de 2 kg.	Unid.	20	1,50	30,00		30,00
Fundas para vivero	Unid.	100	0,40	40,00		40,00
Análisis de laboratorio						
Análisis completo de suelo	Unid.	4	14,67	58,68		58,70
Análisis de nutrientes	Unid.	20	3,30	66,00		66,00
Biomasa	Unid.	20	1,34	26,80		26,80
Otros						
Becario	Unid.	6	280,00	1680,00	1680	3360,00
Viáticos	Unid.	8	50,00	400,00		400,00
Combustible	galón	40	1,20	48,00		48,00
Resmas de papel	Unid.	2	4,00	8,00		8,00
Impresiones	Unid.	0,05	200,00	10,00		10,00
TOTAL				2870,85	1680	4547,85

8. Bibliografía:

1. AZCON Aguilar C., ENCINA C. L., BAREA J. M. 1994, Mycotrophy of *Annona cherimola* and the morphology of its mycorrhizae, Estación Experimental del Zaidín, Granada-España.
2. BERNAL, G; MORALES, R. 2006. Micorrizas: Importancia e investigación en el Ecuador. ANCUPA, Quito- Ecuador. 1ra Edición. Pag 14-15, 36-38.
3. DUICELA GUAMBI Luis Alberto, CORRAL CASTILLO Rubén, REYES PILAY Javier, FARFÁN TALLEDO Daniel, 2003, Identificación de micorrizas asociadas a la rizosfera y producción artesanal, programa de modernización de los servicios agropecuarios, PROMSA,
4. GONZÁLES, M.C.A; GUTIERREZ, M.C; WRIGHT, S. 2004, Hongos Micorrízicos Arbusculares en la agregación del suelo y su estabilidad. TERRA Latinoamericana. Volumen 22. Número 4. Pag 507-513.
5. HERRERA, R. 1993. General methodology to analyze rootlets, raw humus and VA mycorrhizal (VAM) components. Cuba. p. 1-8
6. MORALES, R. 2004. Estudio de la diversidad microbiana en sistemas agroforestales de café (*Coffea* sp.), y cultivos de pastos y arroz (*Oriza sativa*), en dos tipos de suelo del sur de Manabí. Tesis de Grado. Ingeniera Agrónoma. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas.
7. PADILLA I. 2004, Changes in root morphology accompanying mycorrhizal alleviation of phosphorus deficiency in micropropagated *Annona cherimola* Mill. Plants, Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biotecnología, Estación Experimental “La Mayora” Málaga España, Junio. http://www.sciencedirect.com/science2_ob=articleurl&_vdi_B6TC3.html (11 – 04 – 08)
8. TESTER M, SMITH FA & SMITH SE 1987 The phenomenon of nonmycorrhizal plants. Canadian Journal of Botany 65, 419-431

9. Anexos

Anexo 1. Metodología para el procesamiento de raíces - Phillips y Hayman (HERRERA, 1993).

Para el procesar las muestras obtenidas de raíz de chirimoya se aplicará la siguiente técnica:

- 1.- Escoger de la muestra a analizar las raíces más jóvenes de la planta.
- 2.- Lavar las raíces cuidadosamente con agua corriente.
- 3.- Colocar en un erlenmeyer de 100ml una cantidad suficiente de raíces para ser procesadas.
- 4.- Cubrir las raíces con KOH al 10%.
Para preparar KOH al 10% diluir 50g de KOH en 500ml de agua destilada.
- 5.- Autoclavar la muestra a 10 libras de presión durante 5 minutos.
- 6.- Enjuagar con agua corriente.
- 7.- Agregar H₂O₂ hasta cubrir las raíces.
Para preparar H₂O₂ al 30% mezclar 50ml de H₂O₂ en 450ml agua destilada.
- 8.- Dejar las raíces en contacto durante 3 minutos.
- 9.- Enjuagar con agua corriente.
- 10.- Agregar HCl por 3 minutos.
Para prepara HCl agregar 57ml de HCl en 458.5ml de agua destilada.
- 11.- Eliminar el HCl sin lavar la muestra.
- 12.- Agregar Azul de Tripán y meter al autoclave por 5 minutos a 10 libras de presión.
- 13.- Eliminar el colorante mediante el lavado de la muestra hasta que no salga más color.
- 14.- Dejar en Lactoglicerol 24 horas.
- 15.- Prepara una placa colocando las raíces en forma perpendicular al lado mas largo del cubre objetos y montar.
- 16.- Observar la colonización de las raíces por micorrizas.

Anexo 2. Metodología para el procesamiento de suelos (HERRERA, 1993).

Para el procesar las muestras obtenidas de suelo de chirimoya se aplicará la siguiente técnica:

- 1.- Tamizar el suelo que se va a evaluar a través del tamiz de 2mm.
- 2.- Pesar 20g del suelo tamizado.
- 3.- Colocar en 1 litro de agua los 20 gramos de suelo y agitar con un guante hasta formar un remolino.
- 4.- Pasar la suspensión antes de que pare el molino por los tamices de 500 μ , 180 μ y 38 μ .
- 5.-Lavar lo que quedo de los tamices de 180 μ y 38 μ y colocar 20ml de cada uno en un tubo cónico de 50ml.
- 6.- Agregar a cada tubo 20ml de sacarosa 2M desde la parte inferior y agitar para homogenizar la muestra.
- 7.- Centrifugar por 15 minutos a 2500 rpm.
- 8.- Volver a pasar el centrifugado por los tamices de 500 μ , 180 μ y 38 μ .

- 9.- Lavar lo que quedo de los tamices de 180 μ y 38 μ y llenar 2 cajas petri de cada uno de los tamices.
- 10.- Dejar durante toda la noche.
- 11.- Observar en el estereomicroscopio las esporas obtenidas y realizar el conteo.

Anexo 3. Metodología para el procesamiento de plantas trampa – trampeo²

El trampeo es una parte muy importante para formar el inóculo (multiplicación de micorrizas), se utilizará sorgo como planta trampa.

Se realizará el siguiente procedimiento:

- 1.- Preparar el invernadero cubriendo todos los lugares que tengan polvo con piedra o cemento.
- 2.- Desinfectar cuidadosamente todas las áreas con cloro.
- 3.- Las macetas a ocuparse deben ser desinfectadas 2 días antes de realizar la siembra y ser enjuagadas con agua estéril para eliminar lo que quede de cloro.
- 4.- Aspergear alcohol antiséptico en toda el área del invernadero incluyendo las macetas.
- 5.- Colocar la turba estéril que contiene arena o suelo negro, pomina, y cascarilla de arroz en una maceta de 2 Kg en proporción 2:1:1.
- 6.- Preparar la semilla pregerminada:
 - Desinfectar la semilla con cloro al 1.5% durante 2 – 3 minutos con cuatro lavados.
 - Escarificar la semilla por aproximadamente 24 horas dependiendo la calidad de la misma.
 - Colocar la semilla en una caja petri que contenga papel filtro o papel toalla estéril y húmedo.
- 7.- Colocar agua destilada o corriente en el macetero preparado con la turba durante toda la noche y que esté saturado completamente.
- 8.- Realizar un orificio con una paleta de helado limpia hasta que quede a la mitad de la maceta.
- 9.- Colocar en el fondo del orificio 50 gramos de la tierra que servirá como inóculo.
- 10.- Colocar la semilla o la planta en contacto con el inóculo y cerrar el orificio con la turba.
- 11.- Colocar muy poca cantidad de agua si es necesario.
- 12.- identificar la plántula adecuadamente y tomar datos de crecimiento al primer mes, y luego cada semana.

² MORALES, Rocío, Comunicación Personal