

ESTUDIOS UNIVERSITARIOS

REVISTA CIENTÍFICA

VOLUMEN 9, JULIO 2011



1859

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

Loja - Ecuador

ISBN: 1390 - 4167



Estudios Universitarios, Revista Científica, Volumen 9
Impresa en la Editorial Universitaria de la Universidad Nacional de Loja
(calles Bernardo Valdivieso y Rocafuerte, esquina) en julio 2011. Tiraje: 1500 ejemplares
Teléfono: 07 - 2 573914. Página web: www.unl.edu.ec
email: diredit@unl.edu.ec; oci@unl.edu.ec
Loja - Ecuador

Revista

Estudios Universitarios

Universidad Nacional de Loja

LOJA - ECUADOR - 2011

La Comisión Editorial de la Universidad Nacional de Loja, considerará para su publicación en la Revista Estudios Universitarios, trabajos de reflexión personal o ensayos sobre temas históricos, filosóficos, literarios, pedagógicos, psicológicos, deportivos, políticos, económicos, sociales, etc., cuya estructura sea coherente y su lenguaje claro y preciso.

La reproducción por terceros, traducción o ubicación en la red de los trabajos publicados en la Revista Universitaria, se ajustará a las normas de la Ley de Propiedad Intelectual (Ley 83 - Registro Oficial 320, 19.05.1998) y su Reglamento (Decreto Ejecutivo 508 RO/120, 01.02.1999).

©Revista Estudios Universitarios
Universidad Nacional de Loja
Ciudad Universitaria "Guillermo Falconí Espinosa"
La Argelia
Loja-Ecuador
www.unl.edu.ec

E-mail: vrector@unl.edu.ec ; oci@unl.edu.ec ; diredit@unl.edu.ec

Teléfono: 07-2546384 ; 07-2547252 (Ext.136) ; 07-2573914

Tiraje: 1,500 ejemplares

ISSN: 1390-4167

Impreso en Ecuador - Printed in Ecuador -

Imprimé en Equateur

Loja - Ecuador - 2011

COMISIÓN EDITORIAL:

Dr. Ernesto González Pesantes
PRESIDENTE

Dr. Tito Muñoz
DOCENTE ÁARNR

Dr. Milton Andrade Tapia
DOCENTE ÁEAC

Dr. Noé Bravo Vivar
DOCENTE ÁEAC

Dr. Fidel Maldonado Tapia
OFICINA DE PROTOCOLO

Lic. José Iñiguez Cartagena
DIRECTOR CUDIC

Lic. Víctor Vicente Regalado Valarezo
DIRECTOR EDITORIAL UNIVERSITARIA

EDITOR:

Comisión Editorial de la Universidad Nacional de Loja

DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN:

Fernando Patricio Castillo A.

IMPRESIÓN

Jorge Eduardo Rojas

TERMINADOS:

Luis Felipe Mendoza
Diego Fernando Angüisaca G.

Editorial Universitaria
Telefax: 072573914
email: diredit@unl.edu.ec
Loja - Ecuador

Revista

Estudios Universitarios

Universidad Nacional de Loja

LOJA - ECUADOR - 2011

La aplicación de raíces micorrizadas mejora el crecimiento de plántulas de árboles tropicales en vivero: un paso hacia la reforestación con especies nativas en los Andes del Ecuador.

NARCISA URGILES*, PAUL LOJÁN, NIKOLAY AGUIRRE, HELMUT BLASCHKE, SVEN GÜNTER, BERND STIMM, INGRID KOTTKE

Traducido y adaptado de la versión publicada en: *New Forests*
DOI 10.1007/s11056-009-9143-x

* Este artículo, originalmente publicado en inglés, ha sido traducido al español para ser publicado en ESTUDIOS UNIVERSITARIOS con autorización de sus autores. Traducción del inglés: Narcisa Urgilés y revisado por Nikolay Aguirre

RESUMEN

La mayoría de las especies de árboles en los bosques lluviosos tropicales de montaña están naturalmente asociados con hongos arbusculares micorrízicos. Estudios previos en el sur del Ecuador de 115 especies de árboles revelaron que solamente tres especies no estuvieron asociadas con hongos arbusculares micorrízicos. Las plántulas de las especies de árboles tropicales en el vivero pueden necesitar ser asociadas con el hongo arbuscular micorrízico para sobrevivir a la trasplante en números más elevados. Los métodos para establecer plantaciones con especies de árboles nativos todavía no están establecidos para Ecuador.

Así, se investigó la factibilidad de usar raíces de micorriza de plántulas de *Inga acreana*, *Tabebuia chrysantha*, *Cedrela montana* y *Heliocarpus americanus* que han atrapado el hongo micorriza desde el humus del bosque en el vivero para inocular *C. montana* y *H. americanus* con hongos arbusculares micorrízicos nativos. La inoculación bien sea con una mezcla de raíces de micorriza desde las cuatro especies o solamente con raíces de micorriza desde las mismas tres especies fueron comparadas con efectos de fertilización moderada. La evaluación del crecimiento de la planta y el estatus micorrízico de *Cedrela montana* y *Heliocarpus americanus* de 6 meses de edad reveló un mejoramiento en el crecimiento y diversos hongos asociados a través de la inoculación de la raíz con micorriza en comparación con fertilización moderada. La fertilización moderada no suprime la micorrización.

INTRODUCCIÓN

Ecuador es considerado un "centro" de biodiversidad (Brummitt y Lughadha 2003) pero actualmente está enfrentando la más alta tasa de deforestación (1.7%) en América del Sur (FAO 2006). La rápida pérdida de bosques lluviosos tropicales de montaña con su extraordinaria riqueza en tres especies requiere de repoblación por medio de plantaciones. A pesar del relevante número de más de 2.700 especies de árboles nativos descritas para Ecuador (Jørgensen y León-Yáñez 1999), las plantaciones existentes consisten casi exclusivamente de especies introducidas del género *Eucalyptus* y *Pinus*. La implementación de semilleros de árboles tropicales para plantaciones todavía es un desafío (Stimm *et al.* 2008) y la introducción de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el sustrato del vivero parece ser un paso importante para las especies de árboles dependientes de HMA (Allen *et al.* 2003, 2005).

La aplicación del inóculo de HMA comercialmente disponible y la necesidad para el hábitat y el árbol específico del hongo es controversial (Klironomos 2003; Gianinazzi y Vosatka 2004; Wubet *et al.* 2006). Sin embargo, además de los costos, muchos aspectos como los revisados por Schwartz *et al.* (2006) argumentan en contra del uso del inóculo HMA comercialmente disponible y a favor de la producción de inóculo local para la reforestación del bosque lluvioso tropical de montaña. Los principales argumentos son los que cuando las semillas inoculadas son plantadas en el campo, el hongo exótico con frecuencia tiene dificultad en el establecimiento dentro de la comunidad de hongos pre-existente, y si ellos se establecen pueden llegar a ser esparcidos rápidamente como invasores

poniendo fuera de competencia a la comunidad de hongos locales. Así, se encontró que los hongos locales fueron finalmente más efectivos (Allen *et al.* 2005).

Investigaciones previas en el bosque lluvioso tropical de montaña del sur del Ecuador revelaron que, excepto para tres especies en la familia *Nyctaginaceae*, todos los árboles formados con hongos micorrízicos arbusculares con una multitud de hongos específicos del bosque compartidos entre las diversas especies de árboles (Kottke *et al.* 2004, 2008). Nosotros, por lo tanto, planteamos la hipótesis que el restablecimiento del bosque nativo sobre pasturas degeneradas necesitaría la reintroducción de un inóculo nativo AMF diverso por las plántulas crecidas en vivero. Puesto que las esporas del hongo nativo no estuvieron disponibles en suficientes cantidades para la inoculación de las plántulas en vivero, nosotros evaluamos la factibilidad del mejoramiento de la micorrización y el mantenimiento de plántulas a través de inoculación por raíces de micorriza obtenidas de las plantas trampa crecidas sobre humus del bosque.

Cuatro especies de árboles nativas del bosque lluvioso tropical de montaña en los Andes tropicales del sur del Ecuador, *Inga acreana* Harms (Fabaceae), *Tabebuia chrysantha* (Jacq.) G. Nicholson (Bignoniaceae), *Cedrela montana* Moritz Ex Turcz (Meliaceae), y *Heliocarpus americanus* L. (Tiliaceae) fueron utilizadas como plantas trampa y como suplidores de raíces de micorriza a *H. americanus* y *C. montana*. Las especies fueron seleccionadas de acuerdo a la aceptación por la población local, madera valiosa (*H. americanus*, *C. montana*) de múltiples uso o propósito (*T. chrysantha*, *Inga acreana*) y acceso a

semillas con alta germinación al tiempo de la cosecha, es un especial problema en los trópicos húmedos (Stimm *et al.* 2008). *H. americanus* es una especie de crecimiento rápido y sucesión temprana, mientras *C. montana* es una especie de sucesión media. Ambas especies son usadas en los programas de reforestación en Ecuador (Weber *et al.* 2008), pero sin inoculación con hongo micorrízico el desarrollo es solamente adecuado bajo ciertas condiciones de sitio (Aguirre 2007). Algunos autores argumentan que la fertilización puede mejorar el crecimiento de los semilleros (Remes *et al.* 2005). Sin embargo, la fertilización puede suprimir la micorrización (Smith y Read 2008) y así podría ser contra productivo por el incrementado riesgo de mortalidad de la plantación.

Un ensayo experimental de vivero fue establecido para confrontar las siguientes hipótesis:

- La aplicación de raíces micorrizadas mejorará la colonización de micorrizas y el mantenimiento de las plántulas comparado con la aplicación del fertilizante.
- El inóculo de micorriza mezclado de cuatro plantas trampa nativas será superior al de la misma especie.
- La baja fertilización no suprimirá la micorrización pero mejorará el crecimiento y la supervivencia de la planta.
- La fertilización moderada puede producir crecimiento equivalente como la inoculación con HMA.

- Las plantas de sucesión temprana y media pueden reaccionar diferentemente a la aplicación de micorriza y fertilización.

El tipo y las cantidades de fertilizante fueron escogidas de acuerdo a las experiencias previas de un vivero experimental llevadas a cabo en hayas europeos (*Fagus Sylvatica* L.) en Alemania (Kottke y Hönig 1998). Aquí nosotros reportamos primero los resultados obtenidos desde los 6 meses de edad de las plántulas de *H. americanus* y *C. montana* crecidas en vivero en los Andes tropicales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación experimental

Los experimentos de vivero fueron llevados a cabo en Loja, Ecuador, en la Universidad Nacional de Loja. El vivero de la Escuela Forestal está situado a 2,160 m.s.n.m. (04°02'09"S, 79°11'49"W). La temperatura promedio en el invernadero fluctuó desde 15 a 21°C. Solamente se dispuso de luz solar natural. Hubo un ensayo preliminar para obtener raicillas micorrizadas de cuatro especies de árboles nativos: *T. chrysantha*, *H. americanus*, *I. acreana* and *C. montana*. Estas tres especies fueron escogidas por su importancia ecológica y económica para la población local y disponibilidad de semillas.

Las semillas de todas las cuatro especies fueron colectadas en el bosque que bordea el Parque Nacional Podocarpus, provincias de Loja y Zamora Chinchipe, al Sur del Ecuador y germinadas en una

mezcla (1:1) de arena de mina y suelo agrícola esterilizada a vapor. Las plántulas fueron trasplantadas en fundas plásticas individuales de 500 ml, después de 5 semanas de la germinación y fueron usadas como plantas trampa y el sustrato consistió en humus del bosque lluvioso tropical de montaña mezclado con arena de mina (1:3) esterilizada a vapor. Las raíces de las plantas fueron cosechadas después de 6 meses de crecimiento. La observación microscópica de las raíces indicó la colonización de las plántulas por las especies de HMA, *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*. Las raíces micorrizadas fueron usadas inmediatamente como fuente de inóculo para el siguiente experimento sobre *H. americanus* y *C. montana*.

Ciento cincuenta plántulas de *H. americanus* y *C. montana* fueron germinadas como mencionamos arriba y trasplantadas a fundas plásticas individuales de 500 ml, llenadas con arena y con una mezcla de suelo del bosque lluvioso tropical de montaña (1:3) esterilizada a vapor. Las plántulas fueron inoculadas con raicillas micorrizadas de las mismas especies (*C. montana* o *H. Americanus*) o por una mezcla de micorrizas de cuatro especies trampa (*T. chrysantha*, *H. americanus*, *I. acreana* y *C. montana*) o no inoculadas. Veinte centímetros de raíces micorrizadas fueron agregadas en el hoyo del trasplante. El fertilizante Osmocote® (nitrógeno 15%, fósforo P₂O₅ 8%, potasio K₂O 11%, magnesio 0.9%, sulfuro 1.9%, boro 0.002% boro, hierro 0.4%, manganeso 0.005%, molibdeno

0.018% y zinc 0.017% cubierto para proveer nutrientes de liberación lenta sobre los 6 meses) fue agregado al hoyo de trasplantación de cada planta inoculada (tratamientos C3, C4, C5 y H3, H4, H5) en dos cantidades: alta, 0.5 g/plántula (1 kg/m³), o baja, 0.25 g/plántula (0.5 kg/m³). En el caso de los tratamientos de control, ni las raíces micorrizadas ni el fertilizante fueron añadidos.

El análisis de sustrato estándar fue realizado en la Universidad Nacional de Loja. El pH del suelo fue 5.0; el contenido de materia orgánica 3.5% (combustión) y fósforo 30 µg P₂O₅ ml⁻¹ (colorimétrico). Las condiciones fueron las mismas para todos los tratamientos.

El experimento consistió de seis tratamientos (Tabla 1), cinco plántulas por cinco réplicas, 25 plántulas por especie forestal y tratamiento, resultando un total de 150 plántulas para *C. montana* y *H. americanus* respectivamente. Las plántulas fueron aleatorizadas con respecto a la especie forestal y tratamientos en el vivero.

Tabla 1. Tratamientos de plántulas de *Cedrela montana* y *Heliocarpus americanus* en el experimento

Código	Especies de árbol	Descripción de tratamientos
C0	<i>C. montana</i>	No inoculado, sin fertilizante
C1	<i>C. montana</i>	Inoculado con raíces micorrizadas de plantas de <i>C. montana</i> , sin fertilizante
C2	<i>C. montana</i>	Inóculo mezclado ^a , sin fertilizante
C3	<i>C. montana</i>	Inóculo mezclado ^a , fertilizante Osmocote® 0.25 g (0.5 kg/m ³)
C4	<i>C. montana</i>	Inoculado con raíces micorrizadas de <i>C. montana</i> , fertilizante Osmocote® 0.25 g (0.5 kg/m ³)
C5	<i>C. montana</i>	No inoculado, fertilizante Osmocote 0.50 g (kg/m ³)
H0	<i>H. americanus</i>	No inoculado, sin fertilizante
H1	<i>H. americanus</i>	Inoculado con raíces de micorriza de plántulas de <i>H. americanus</i> , sin fertilizante
H2	<i>H. americanus</i>	Inóculo mezclado ^a , sin fertilizante
H3	<i>H. americanus</i>	Inóculo mezclado ^a , fertilizante Osmocote® 0.25 g (0.5 kg/m ³)
H4	<i>H. americanus</i>	Inoculado con raíces de micorriza de <i>H. americanus</i> , fertilizante Osmocote® 0.25 g (0.5 kg/m ³)
H5	<i>H. americanus</i>	No inoculado, fertilizante Osmocote® 0.50 g (1 kg/m ³)

^a Raíces micorrizadas obtenidas de *I. acreana*, *T. chrysantha*, *H. americanus* y *C. montana*.

Evaluación del crecimiento de la planta y colonización de hongos micorrízicos.

Después de 6 meses de crecimiento, 20 plantas por tratamiento fueron cosechadas al azar. La altura de la planta, el diámetro del cuello de la raíz (RCD), el peso fresco y seco sobre el suelo y la biomasa foliar (hojas y brotes) y radicular (raíces) de 15 plantas fue determinado. Cinco plantas fueron usadas para observar colonización de hongos micorrízicos al microscopio después de la tinción. La evaluación de la colonización de raíces finas, en primera instancia las raíces fueron lavadas con agua del grifo y almacenadas en etanol al 50%. Después, partes de las raíces finas seleccionadas al azar fueron cortadas en segmentos de 2 cm, sumergidas en KOH al 10% en baño maría a 60°C durante 24-48 horas, lavadas dos veces en agua del grifo, acidificadas en HCl al 10% durante 2-3 minutos y teñidas con azul de metileno al 0.05% y ácido láctico al 90% durante 8 horas en baño maría a 60°C. Las raicillas fueron parcialmente desheñadas en ácido láctico al 90% durante la noche (modificado Grace y Stribley, 1991). Quince pedazos de raíz de 2 cm de longitud cada uno, fueron observados a la luz del microscopio a 400x de magnificación. La colonización por HMA fue estimada de acuerdo a la cantidad de células y espacio intercelular del conteniendo hifas y clasificada en una escala de seis valores: 0 = 0%, 1 < 1%, 2 < 10%, 3 < 50%, 4 > 70%, 5 > 90% colonización. Un resultado final (0-5) fue asignado a cada pedazo de raíz y el resultado final de la colonización de cada planta fue calculado como promedio de los 15 pedazos de raíz.

Las diferencias morfológicas de HMA, se consideró el tamaño, forma y diámetro de vesículas, diámetro de hifas, inter e in-

tracelulares hifas, ramificaciones simples y espirales, presencia o ausencia de anastomoses, arbusculos regulares o irregulares fueron considerados para obtener identificación preliminar del género fúngico de HMA (INVAM 1998 <http://www.invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/classification.htm>)

Muestreo de esporas e identificación.

Los substratos fueron colectados desde las fundas de las plántulas muestreadas, agrupados a partir de las respectivas especies y conservados en un refrigerador a 4°C durante 8 meses. La separación de las esporas de HMA fue realizada por tamizado húmedo y el método decantación (Gerdemann y Nicholson 1963). Aparentemente las esporas viables fueron extraídas manualmente por la pipeta Pasteur y transferidas a cajas Petri con agua destilada y observadas bajo un estereomicroscopio a 32x de magnificación. Las esporas viables encontradas en cuatro muestras de 100 g de substrato seco, respectivamente, fueron contadas y promediados los números. Veinte esporas de cada morfo tipo fueron colectadas, la mitad colocadas en PVLG (Polyvinil lacto-glicerol), y la otra mitad en PVLG + reactivo de Melzer, cubiertas por un cubre objeto y aglomeradas para observar el número de paredes presentes en las esporas y reacciones de teñido a 100x, 400x y 1000x magnificación. Los caracteres morfológicos, tales como forma, tamaño, ornamentación, número de estratos de la pared, presencia o ausencia de hifas subyacentes y color del estrato exterior, fueron comparados con las descripciones disponibles en el sitio web INVAM. Esporas similares fueron agrupadas como morfo tipos. Las esporas germinadas seleccionadas de cada morfo tipo fueron

montadas en portaobjetos y almacenadas en un cepario de HMA en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Particular de Loja.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El paquete del software GraphPad Prism® (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>) fue usado para analizar el crecimiento de la planta y la información de la espora combinada con la de las terminaciones de los gráficos del cuadro. Cuando los dos grupos tuvieron variaciones iguales, una prueba t estándar fue usada para comparar las correspondientes muestras, basadas en las diferencias menos significativas de $\alpha = 0.05$, y ANOVA de una vía. El test Mann-Whitney fue aplicado para evaluar las diferencias estadísticas entre las frecuencias de la espora en substratos de *C. montana* y *H. americanus* de $\alpha = 0.05$.

Resultados

Crecimiento de plántulas de *Cedrela montana* y *Heliocarpus americanus*

El rendimiento de *C. montana* y *H. americanus* en plantas no-inoculadas y no-fertilizadas fue inferior en general en comparación con las plantas inoculadas y/o fertilizadas. Aquellas plantas las cuales causaron la larga desviación estándar en el diámetro del cuello de la raíz en *C. montana* (Fig. 1a) más tarde se encontró que eran plantas con hongos micorrízicos. La aplicación de 0.50 g de Osmocote por semillero a las plantas no-inoculadas no estimuló el crecimiento de *C. montana*; por otro lado, la altura y biomasa de las plantas de *H. americanus* fueron significativamente mejoradas pero el diámetro del cuello de la raíz fue inferior (Figs. 1b, 2b). Ambas especies de árboles reaccionaron positi-

vamente a la inoculación en comparación con los tratamientos de control.

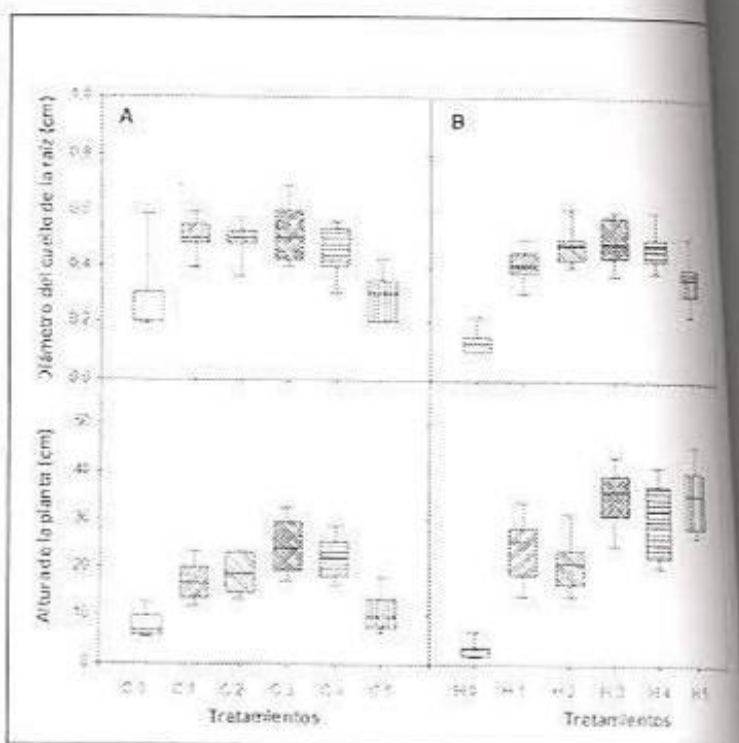
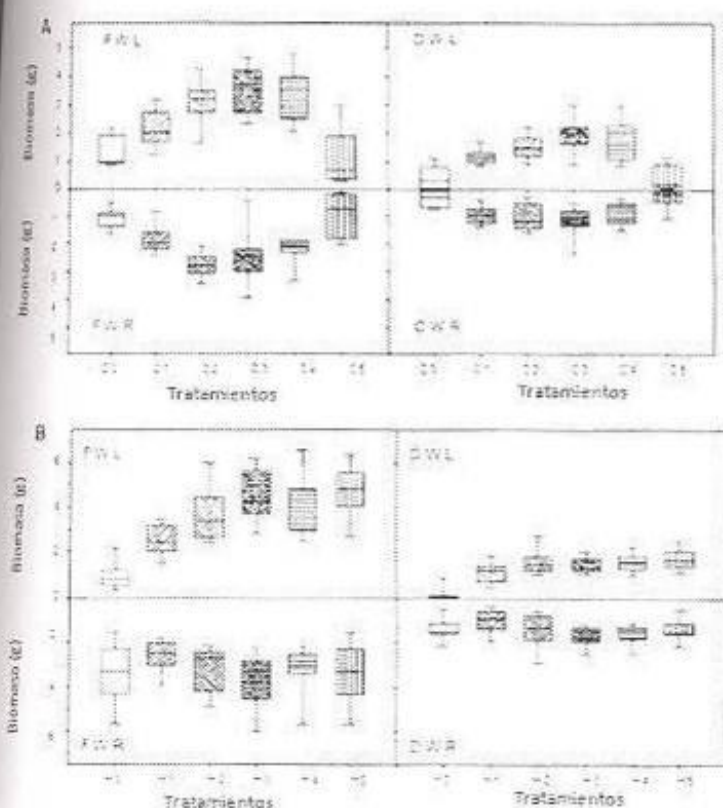


Fig.1 Diámetro del cuello de la raíz y altura de plántulas de *C. montana* (a) y *Heliocarpus americanus* de 6 meses de edad. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos. El cuadro se extiende desde el 25avo percentil al 75avo percentil, con una línea en la mediana (el 50avo percentil). Las terminaciones muestran los valores más altos y más bajos.

El uso de micorrizas obtenidas de las plantas de *C. montana* o inóculo mezclado de las cuatro especies forestales no resultó en un diámetro diferente del cuello de la raíz o altura de la planta en *C. montana* pero la producción de biomasa fue más alta con el inóculo mezclado. La aplicación de 0.25 g de Osmocote por plántula de *C. montana* inoculada resultó en el mejoramiento de la altura de la planta pero no en un diámetro más largo del cuello de la raíz, producción foliar, o peso seco radicular (Figs. 1a, 2a). La inoculación por hongos

Fig. 2 Peso foliar fresco y seco (FWL/DWL) y radicular (FWR/DWR) de plántulas de *Cedrela montana* (a) y *Heiocardus americanus* (b) de seis meses de edad. Diferentes letras indican diferencias significantes ($P < 0.05$) entre tratamientos. El cuadro se extiende desde el percentil 25avo hasta el percentil 75avo, con una línea en la mediana (el percentil 50avo). Las terminaciones muestran los valores más altos y más bajos.



micorrízicos de *H. americanus* mejoró significativamente el diámetro del cuello de la raíz, la altura de la planta y la biomasa de *H. americanus* cuando se comparó con las plantas no-inoculadas, no fertilizadas, y la inoculación con micorrizas mezclados desde las cuatro especies de árboles fue aún más efectiva para el diámetro del cuello de la raíz y la producción de biomasa. Valores más altos fueron obtenidos para la altura de la planta y la biomasa por aplicación de 0.25 g de Osmocote a plántulas de *H. americanus* inoculadas, pero el diámetro del cuello de la raíz alcanzó solamente el nivel de tratamiento (Figs. 1b, 2b).

Micorrización de plántulas de 6 meses de crecimiento

Todas las plantas inoculadas fueron altamente colonizadas por los hongos arbusculares micorrízicos como fue visualizado por las espirales de las hifas intracelulares, hifas intracelular, frecuentes vesículas, esporas y arbusculos. El grado estimado de colonización micorrízica demostró que las plantas inoculadas tuvieron al menos 30% y sobre el 70% de sus células corticales de la raíz colonizadas (Fig. 3). Una insignificante colonización micótica fue observada en los tratamientos sin fertilizante, y sin inóculo. La colonización con hongos micorrízicos fue observada en las plantas con mayor altura de los tratamientos sin inóculo pero con fertilizante, en tanto que las plántulas de tamaño pequeño no presentaron la colonización de HMA. La intensidad de la tinción, la morfología de las vesículas, hifas inter- e intra-celular y células auxiliares representaron a los grupos de *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora* y *Gigaspora*.

Producción de espora e identidad

En promedio, 272 esporas fueron encontradas en 100 g de sustrato de *C. montana* y 175 esporas en el sustrato de *H. americanus*. No se observó una diferencia significativa en la producción de esporas entre las dos especies de árboles (Mann-Whitney a $P = 0.2$). Tres morfo tipos (A1 hasta A3) fueron determinados como especies *Acaulospora*, dos como perteneciente a *Glomus* (G1 y G2, Fig. S1 en apéndice). G1 y G2 fueron morfológicamente muy similares. Cuatro morfo tipos de espora (A1, A2, A3, G1) fueron discernidos desde el sustrato de *C. montana* y uno fue encontrado en sustrato de *H. americanus*. G1 y

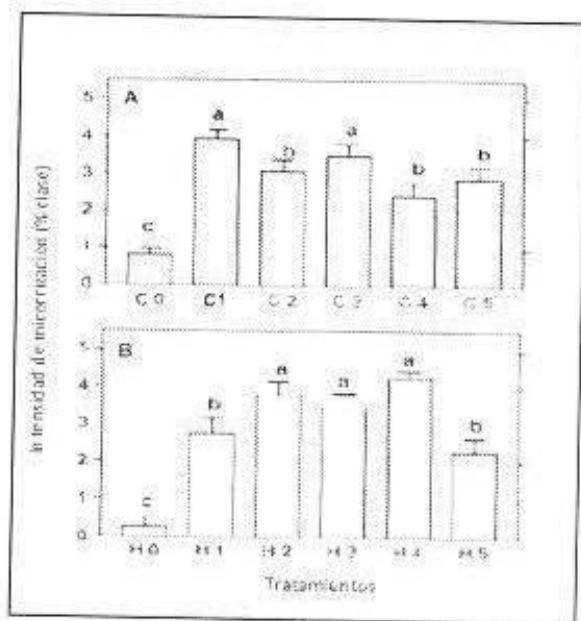


Fig. 3 El rango estimado de micorrización de las plántulas de *Cedrela montana* y *Helicarpus americanus* de 5 meses de crecidas; clase 0 = 0%; clase 1 < 1%; clase 2 < 10%; clase 3 < 50%; clase 4 > 70% y clase 5 > 90% de células corticales colonizadas. Basados en una escala de seis niveles en valores de porcentaje.

G2 fueron tipos de espora frecuentes, mientras los otros morfo tipos ocurrieron en bajas frecuencias (Fig. S1 en anexo electrónico).

DISCUSIÓN

Aunque está bien establecido que las plántulas de árboles tropicales necesitan hongos micorrízicos para resistencia a las condiciones de estrés natural (Alexander y Lee 2005), técnicas para aplicación de estos hongos a las plántulas crecidas en vivero son todavía subdesarrolladas. La mezcla de humus o suelo del bosque natural puesto en el sustrato del vivero puede ser la técnica más simple (Allen et al. 2003). Por este método nosotros obtuvimos las plantas trampa que sirvieron como proveedores de inóculo. Sin embargo, como se demostró por los resultados del control de los tratamientos, el mejoramien-

to del crecimiento y las tasas de micorrización fueron bajas en el sustrato muy limitado de nutrientes en nuestro experimento. En el caso de *C. montana*, solamente aquellas plantas que tuvieron hongos micorrízicos en el humus del bosque pudieron crecer. La fertilización moderada mejoró el crecimiento de *H. americanus* pero no de *C. montana*. Así la especie sucesión temprana *H. americanus* podría hacer un mejor uso de los nutrientes agregados que la sucesión media *C. montana*, y la última pareció ser más una planta que depende de la micorriza (Janos 2007).

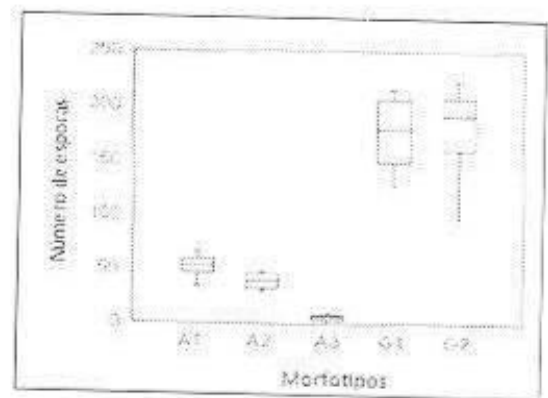


Fig. 4 Frecuencia de los morfo tipos de espora en 100 g de sustrato seco de *Cedrela montana* (A1, A2, A3, G1) y *Helicarpus americanus* (G2). Las especies *Acaulospora* son representadas con A y las especies de *Glomus* con G.

A pesar de la no adición de raíces micorrízicas, *H. americanus* mostró micorrizas cuando fue tratada con fertilizante. Los hongos fueron obviamente atraídos por *H. americanus* desde el humus del bosque probablemente debido al desarrollo de raíces más largas que con *C. montana*. Otra explicación posible podría ser que *C. montana* puede tener alguna especificidad para los hongos no expuestos en el sustrato. Así, la moderada fertilización (0.5 g de Osmocote) no suprimió la micorrización. De acuerdo a la literatura, los altos niveles de fertilidad del suelo, en particular la fertilidad alta de P, estimulan el

crecimiento de la planta pero reprimen el desarrollo de AMF (Smith y Read 2008). Maximizando las contribuciones HMA a través de la fertilización precisa, permite la producción de buenos rendimientos en los suelos, mantenidos a niveles de fertilidad más bajos, reduciendo la pérdida de nutrientes al medio ambiente, mientras que se mejora la calidad biológica y física del suelo (Hamel y Strullu 2006). Bajas cantidades de fertilizante (0.25 g de Osmocote) ligeramente mejoraron el crecimiento de las plántulas inoculadas con HMA. Para la práctica, la baja fertilización combinada con la inoculación es realizada, sin embargo, no es recomendada por el bajo efecto en relación a los costos.

Las diferencias significativas en la colonización de hongos micorrízicos aparentemente correspondieron al crecimiento de *H. americanus*, pero no en el caso de *C. montana*. Esta observación puede ser interpretada como alta receptividad de *C. montana* a la baja colonización (Janos 2007). La presencia de micorrizas puede ser más importante que el nivel de colonización para el crecimiento de las plántulas forestales tropicales de sucesión media.

La técnica de inoculación aplicada aquí ayudó a seleccionar los hongos nativos que pueden ser bien adaptados a las condiciones del vivero local. El estudio de las estructuras micorrízicas reveló una multitud de HMA. Ha sido demostrado que un alto número de especies HMA son favorables para el crecimiento de la planta (Lovelock y Ewel 2005; Van der Heijden et al. 2008) y también se indica aquí, que los mejores resultados de crecimiento fueron obtenidos por el uso de inóculo micorrízico mezclado. El riesgo de usar raíces micorrízicas como

una fuente de inóculo se da la posibilidad de llevar patógenos, pero el efecto de éstos parece haber sido insignificante en este experimento.

La frecuencia de esporas en los substratos fue muy baja cuando se comparó a los resultados de estudios similares de otras plantas trampa y substratos (Molina et al. 2006; Eom et al. 2000). Una razón para el bajo número de esporas encontrado en este estudio puede ser debido a la falta de estrés hídrico de las plantas trampa. En otros estudios el riego fue continuamente reducido para promover la esporulación de hongos micorrízicos asociados. Nosotros no reducimos el riego porque necesitamos usar las micorrizas como inóculo para un experimento subsecuente (Kottke, sin publicar). Las diferentes frecuencias de morfotipos de esporas en ambos substratos y el bajo número de esporas encontrado en el substrato de *H. americanus* concuerdan con las conclusiones previas del rango de producción de esporas altamente variable de especies HMA con diferentes plantas huésped (Bever et al. 1996). De manera interesante, *H. americanus* es menos dependiente de hongos micorrízicos promoviendo la producción de esporas que la micorriza altamente dependiente en *C. montana*.

Los resultados mostraron por primera vez para Ecuador que el mantenimiento de tres semilleros fue significativamente mejorado por inoculación con micorrizas bien sea de las tres especies individuales o una mezcla de micorrizas de las cuatro especies trampa. La técnica es mucho más fácil manipular y con costos inferiores que la producción de espora para un país tropical con limitadas facilidades para

almacenamiento de inóculo. La alta diversidad de HMA aplicados con los semilleros pueden también ser ventajosos después en la plantación forestal, conforme a las condiciones de estrés se seleccionará para las especies mejor adaptadas (Allen et al. 2003, 2005). Las técnicas de inoculación para especies de árboles nativos ayudará a proveer alternativas para los monocultivos predominantes de *Eucalyptus* spp. y *Pinus* spp, y así contribuir a la restauración de la biodiversidad en los Andes Ecuatorianos.

Reconocimientos: El soporte financiero de Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG FOR 402) es muy reconocido.

REFERENCIAS

- Aguirre N. (2007) Silvicultural contributions to the reforestation with native species in the tropical mountain rainforest of South Ecuador. Dissertation, Lehrstuhl für Waldbau. TU München.
- Alexander IJ, Lee SS (2005) Mycorrhizas and ecosystem processes in tropical rain forest: implications for diversity. In: Burslem OF, Pinard MA, Hartley SE (eds) Biotic interactions in the tropics: their role in the maintenance of species diversity. Cambridge University Press. Cambridge. pp 165-200
- Allen BE, Allen MF, Egenon-Warburton L, Corkidi L, Gómez-Pompa A (2003) Impacts of early- and late-seral mycorrhizae during restoration in seasonal tropical forest, Mexico. *Ecol Appl* 13: 1701-1717. doi: 10.1890/02-5309
- Allen MF, Allen BE, Gómez-Pompa A (2005) Effects of mycorrhizae and non target organisms on restoration of a seasonal tropical forest in Quintana Roo, Mexico: factors limiting tree establishment. *Restor Ecol* 13:325-333
- Bever JD, Morton JB, Antonovics J, Schultz PA (1997) Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *J. Ecol* 85:71-82
- Brummitt N, Lughadha E (2003) Biodiversity: where's hot and where's not. *Conserv Biol* 17(5):1442-1448
- Eom A, Hartnett D., Wilson G. (2000) Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tall grass prairie. *Oecologia* 122:435-444
- FAO (2006) Global Forest Resources Assessment (2005). Progress towards sustainable forest management. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
- Gerdemann JW, Nicholson TH (1963). Isolation of spores <http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/Isolation%20of%20spores.html>. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. Accessed in 2007
- Gianinazzi S., Vosatka M. (2004) Inoculum of arbuscular mycorrhizal

- zal fungi for production systems-science meets business. *Can J Bot* 82: 1264-1271. doi: 10.1139/b04-072
- Grace C., Stribley DP (1991) A safer procedure for routine staining of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol Res* 95:1160-1162
 - GraphPad Prism® software package. Data analysis and biostatistics software and resources. <http://www.graphpad.com/prism/Prism3.htm>. Accessed in 2007
 - Hamel C, Strullu D (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi in field crop production: potential and new direction. *Can J Plant Sci* 86:941-950
 - International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal fungi (INVAM) (1998) Classification of Glomeromycota. Available via DIALOG. <http://www.invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/classification.htm> General description. Accessed in 2007
 - Janos DP (2007) Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza* 17:75-91. doi: 10.1007/s00572-006-0094-1
 - Jørgensen PM, León-Yáñez S. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, vol 75, Missouri Botanical Garden Press, pp 1181
 - Klironomos IN (2003). Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84:2292-2301
 - Kottke I, Hönig K (1998). Improvement of maintenance and autochthonous mycorrhization of beech (*Fagus sylvatica* L.) and oak (*Quercus robur* L.) plantlets by pre-mycorrhization with *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. In: Misra A (ed) Problems of wasteland development and role of microbes. AMI-FM Publications, Bhubaneswar, pp 187-218
 - Kottke I, Beck A, Oberwinkler F, Homeier J, Neill D (2004) Arbuscular endomycorrhizas are dominant in the organic soil of a neotropical montane cloud forest. *J Trop Ecol* 20: 125-129. doi: 10.1017/S0266467403001020
 - Kottke I, Haug I, Setaro S, Suárez JP, Weiß M, Preußing M, Nebel M, Oberwinkler F (2008) Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. *Basic Appl Ecol* 9: 13-23
 - Lovelock CA, Ewel JJ (2005) Links between tree species, symbiotic fungal diversity and ecosystem functioning in simplified tropical ecosystems. *New Phytol* 167:219-228
 - Molina M., Medina M., Restrepo LF (2006). Evaluación de sustratos y cultivos trampa bajo condiciones

controladas para la obtención de hongos micorrizógenos de Aliso (*Alnus acuminata* H.B.K.). *Mycotaxon* 48:491-528

- Remes J, Podrazsky VV, Ulbrichova I, Meduna V (2005) Fertilization of Norway spruce plantations on the bulldozer-spread windrows in the Ore Mts. *J For Sci* 51:49-53
- Schwartz MW, Hoeksema JD, Gehring CA, Johnson NC, Klironomos IN, Abbott LK, Pringle A (2006). The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum. *Ecol. Lett* 9:501-515. doi: 10.1111/j.1461-0248.2006.00910
- Smith S., Read D (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. Academic Press, San Diego 16
- Stimm B, Beck E, Günter S, Aguirre N, Cueva E, Mosandl R, Weber M (2008) Reforestation of abandoned pastures: seed ecology of native species and production of indigenous plant material. In: Beck E, Bendix J, Kottke I, Makeschin F, Mosandl R (eds) *Gradients in a Tropical Mountain ecosystem of Ecuador*. Ecological studies 198. Springer Verlag, Berlin, pp 433-446
- Van der Heijden MG, Bardgett RD, van Straalen NM (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11:296-310. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139
- Weber M., Günter S., Aguirre N., Stimm B., Mosandl R. (2008). Reforestation of abandoned pastures: silvicultural means to accelerate forest recovery and biodiversity. In: Beck E, Bendix J, Kottke I, Makeschin F, Mosandl R (eds) *Gradients in a Tropical Mountain ecosystem of Ecuador*. Ecological Studies 198. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 447-458
- Wubet T, Weiß M, Kottke I, Oberwinkler F (2006) Two threatened coexisting indigenous conifer species in the dry Afromontane forests of Ethiopia are associated with distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Can J Bot* 84: 1617-1627. doi: 10.1139/B06-121