



Proyecto:
APLICACIÓN DE LA SIMBIOSIS
DIAZOTRÓFICA ENTRE AZOLLA Y
ANABAENA COMO ABONO VERDE
PARA EL CULTIVO DEL ARROZ EN EL
LITORAL ECUATORIANO (IG-CV-053)



Programa de Modernización de
los Servicios Agropecuarios

INFORME TECNICO FINAL



Mayo del 2004

1. RESUMEN

Este proyecto de investigación denominado “Aplicación de la simbiosis diazotrófica entre *Azolla* y *Anabaena* como abono verde para el cultivo del arroz en el Litoral Ecuatoriano (IG-CV-053)” constituyó uno de los proyectos auspiciados por el PROMSA/BIRF-MAG-BID y ejecutados por la ESPOL-Instituto de Ciencias Químicas. El objetivo central del proyecto fue determinar la aplicación de la simbiosis diazotrófica entre *Azolla* y *Anabaena* como abono verde para el cultivo de arroz en el Litoral Ecuatoriano. El proyecto tuvo una duración de tres años, entre el 2000 y el 2003.

El Proyecto se inició con una revisión de la literatura técnica especializada, luego se recorrió la Costa en busca de afloramientos de azolla procediéndose a muestrear, cuando se encontraba, y a determinar las características ecológicas del sitio. Las muestras se llevaron al laboratorio y fueron estudiadas para establecer su taxonomía, encontrándose que la especie nativa corresponde a la *Azolla caroliniana* Willd. Las azollas fueron inicialmente adaptadas al laboratorio; una vez que crecieron fueron pasadas a un invernadero (azollario) en donde se continuó estudiando sus requisitos de crecimiento; a continuación se estudió su desarrollo en el campo bajo distintas condiciones de fertilización. Cepas alternativas de azolla provenientes del IRRI (Internacional Rice Research Institute-Filipinas) fueron sometidas comparativamente a los mismos tratamientos que la azolla nativa. Como resultado de estas pruebas se encontró que no habían diferencias significativas entre las azollas nativas y las introducidas. El rendimiento de la azolla fresca fue de 20 t/ha/m lo que equivale a 600 kg de nitrógeno por hectárea por año.

El análisis de la composición de la *Azolla caroliniana* nativa dio entre 7.02 % y 5.02 % de nitrógeno (Laboratorio ICQ e INIAP-Bolicho); en base de estos datos se determinó un contenido proteico promedio del 37.5 %. Además, un estudio desarrollado en el Laboratorio de INIAP-Santa Catalina, mostró un perfil con los siguientes aminoácidos: Treonina, Serina, Prolina, Glicina, Alanina, Valina, Metionina, Isoleucina, Leucina, Tirosina, Fenilalanina, Histidina, Lisina, Arginina, Triptofano, Acido Aspartico y Acido Glutámico.

En la Cooperativa San Gabriel (Daule) se probó finalmente mediante análisis factorial exploratorio el crecimiento de *Azolla caroliniana* (nativa) y *Azolla microphylla* (introducida) manteniendo un 50 % de exposición de luz solar y aplicando tratamientos “con” y “sin” Materia Orgánica (estiércol), Fósforo e Insecticida. Se encontró ($p = 0.05$) que no hay diferencia significativa entre las dos azollas y insecticida, fósforo y materia orgánica influyen directamente en el crecimiento de la azolla, cuya producción promedio alcanza 18.94 ± 1.24 t/ha/mes.

Además, se probó la capacidad de fertilización de la azolla en dos variedades de arroz, Iniap 12 e Iniap 14, en las estaciones de invierno y verano del 2003, mediante 6 tratamientos de fertilización, incluyendo un testigo, y 4 réplicas para cada tratamiento. Como resultado se encontró que no hay diferencia significativa ($p = 0.05$) en la producción de las variedades de arroz, tanto en invierno como en verano. El mejor rendimiento de arroz (7.77 t/ha) se obtuvo en el cultivo de invierno, utilizando como fertilizante únicamente azolla (40 t/ha), lo que produjo respecto al cultivo con urea un aumento del 55.6 %.

Dentro del proyecto se realizaron dos tesis, una de Maestría en Agricultura Tropical Sostenible (ESPOL-Universidad de Guayaquil) y otra de Ingeniería Comercial y Empresarial (ESPOL). Para divulgación se editaron: un poster (ESPOLCIENCIAS), 2 boletines del Informativo ESPOL, un CD, un artículo en la Revista Tecnológica (ESPOL), una revista técnica, un cuadernillo gráfico y 10 documentos científicos. Se impartió un seminario a cargo del asesor científico internacional Dr. Francisco Carrapiço. Se efectuaron dos días de campo en la Cooperativa San Gabriel. Los miembros de la Cooperativa, como parte central del Grupo Meta, mantuvieron activa y permanente participación.

Producir azolla es un negocio rentable, produciendo una Tasa Interna de Retorno igual a 50.60 % (Franco, 2004) que es mayor a la tasa de descuento del costo de capital.

Algunas recomendaciones para continuar impulsando este tema, incluyen:

- Realizar otras pruebas experimentales que permitan la mayor certeza posible del rendimiento del arroz, utilizando azolla como fertilizante, a lo largo de todo el año, y en los principales sitios de cultivo, como Daule, Salitre, Yaguachi, Baba y Catarma. También se requiere estudiar diferentes métodos de aplicación de azolla al cultivo de arroz.
- Profundizar en el estudio biológico de la *Azolla Anabaena* nativa, con el fin de proponer otras alternativas de manejo y aplicación. Un aspecto que se recomienda estudiar a fondo es la reproducción; se conocen y se han detectado en el proyecto dos procesos: esporulación y fragmentación, con específicas particularidades y aplicaciones.
- Difundir la tecnología disponible. Para eso se necesitaría ejecutar un proyecto específico por ejemplo casa por casa, para que el campesino agricultor arrocero acepte cultivar azolla y la use.

2. IDENTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Código del Proyecto:	IG-CV-053
Título del Proyecto:	Aplicación de la simbiosis diazotrófica entre Azolla y Anabaena como abono verde para el cultivo del arroz en el Litoral Ecuatoriano
Rubro y Área Temática:	Relaciones S-A-P
Fecha de inicio y fin:	Noviembre 27 de 2000- Noviembre 27 del 2003
Institución Ejecutora:	Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Instituciones Colaboradoras:	Universidad Estatal de Guayaquil/ Facultad de Ciencias Naturales/Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales Universidad Agraria del Ecuador INIAP-Estación Boliche PROUNID (Asociación PROEXANT- UNIVERSIDAD DE FLORIDA-FUNDACIÓN IDEA)
Investigador Principal:	Mariano Montaña Armijos, Ing. Quím., MAE, Ph.D. (Candidate) mmontano@espol.edu.ec
Asesor Científico Internacional	Francisco Carrapiço, Ph.D. f.carrapico@fc.ul.pt
Otros Investigadores:	Barbel Treiber, Dra. Kléber Medina, Ing. Wilson Pozo, Dr. Gloria Carrera, Dra. Carlos Rolando, Ing. Mariuxi Espinoza, Biól. Elisa Tejada, Ing. Pauta Dianne, Ing. Felipe Risco, Ing.
Grupo de Referencia:	Leonardo Corral, Dr. Raúl Estrada, Ing. Francisco Gabela, MS. Washington Peñafiel, Ing. Haydeé Torres, Ing. Tito Brazola, Ing. Vicente Riofrío, Dr.

3. CUADRO DE CONTENIDO

3.1. INDICE GENERAL

Tema	Pág.
0. Carátula	1
1. Resumen	2
2. Identificación del Proyecto	4
3. CUADRO DE CONTENIDO	5
3.1. Indice General	5
3.2. Indice de Cuadros y Figuras	8
3.3. Anexos	10
4. Justificación	11
5. Objetivos de la Investigación	14
5.1. Objetivo general	14
5.2. Objetivos inmediatos (Metas)	14
6. Actividades Desarrolladas	15
6.1. Objetivo 1: Identificar taxonómicamente a los microorganismos fijadores de nitrógeno como: Anabaena en Azolla, cianobacterias epifíticas, epilíticas, planctónicas y bentónicas y eubacterias que viven en los ecosistemas de la Región del Estudio.	15
ESTUDIOS BIBLIOGRÁFICOS	15
MUESTREOS DEL HELECHO AZOLLA	15
ANÁLISIS DE IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	15
6.2. Objetivo 2: Conocer los factores abióticos y bióticos existentes en los ecosistemas en donde se hallaron las muestras de Azolla nativa, sobre todo en lo que se refiere al clima y a la composición química de los cuerpos de agua y de los suelos	16
CARACTERÍSTIZACION ECOLOGICA DE LOS SITIOS MUESTREADOS	16
6.3. Objetivo 3: Conocer y comparar las características y requerimiento de las Azollas nativas y de una Azolla introducida (recomendada por IRRI) en cultivo a nivel de invernadero.	17
CLASIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS ESPECIES NATIVAS E INTRODUCIDAS	17
<u>Especies Nativas</u>	17
<u>Especies Introducidas</u>	18

ADAPTACIÓN DE AZOLLA A NIVEL DE LABORATORIO. USO DEL MEDIO DE CULTIVO HOAGLAND	19
CONSTRUCCIÓN DEL INVERNADERO (AZOLLARIO) Y PRUEBAS DE PROPAGACIÓN DE AZOLLA A NIVEL DE AZOLLARIO	19
6.4. Objetivo 4: Determinar y comparar la capacidad fijadora de nitrógeno de las Azollas a nivel de laboratorio	20
ANÁLISIS BROMATOLÓGICO Y CROMATOGRÁFICO	20
6.5. Objetivo 5: Producir en forma masiva la Azolla más eficiente en crecimiento y fijación, a nivel de lagunas experimentales en el campo	20
CULTIVOS DE EXPERIMENTACIÓN CUALITATIVA	21
CULTIVO DE EXPERIMENTACIÓN CUANTITATIVA	22
6.6. Objetivo 6: Optimizar del sembrío dual de Arroz con Azolla de una variedad mejorada (INIAP) y una nativa, de acuerdo a la zona y Determinar la eficiencia de Azolla sobre la base de un estudio de rendimiento en la producción de arroz	22
DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL CULTIVO DE ARROZ CON AZOLLA EN LA COOPERATIVA SAN GABRIEL-DAULE. PLANTACIONES DE INVIERNO Y VERANO 2003	22
6.7. Objetivo 7: Transferir datos a los arroceros y agrónomos. Difundir los resultados de esta investigación y capacitar al agricultor para el empleo de azolla	24
DIFUSIÓN DEL CULTIVO DE AZOLLA Y APLICACIÓN EN EL CULTIVO DE ARROZ	24
7. Resultados y discusión	26
7.1. Identificación Taxonómica de los Microorganismos fijadores de Nitrógeno	26
BIBLIOGRAFÍA	26
AZOLLA RECOLECTADA Y CONOCIMIENTOS	26
IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS MUESTRAS DE AZOLLA	26
7.2. Conocimiento de los factores abióticos y bióticos existentes en los ecosistemas en donde se hallaron las muestras de azolla nativa (clima, composición química de los cuerpos de agua y de los suelos)	28
CARACTERÍSTICAS ECOLÓGICAS DE LOS SITIOS MUESTREADOS	28

7.3. Conocimiento y comparación de las características y requerimientos de las azollas nativas y de una azolla introducida (recomendada por IIRRI) en cultivo a nivel de invernadero	34
EVALUACIÓN DE ESPECIES NATIVAS E INTRODUCIDAS	34
ESTABLECIMIENTO DE ENSAYOS DE AZOLLA (INOCULACIÓN)	37
RESULTADOS DEL FUNCIONAMIENTO DEL AZOLLARIO Y PISCINAS	38
7.4. Determinación y comparación de la capacidad fijadora de nitrógeno de las azollas a nivel de laboratorio	40
ANÁLISIS BROMATOLÓGICO Y CROMATOGRÁFICA	40
7.5. Producción masiva de la azolla más eficiente en crecimiento y fijación, a nivel de piscinas experimentales en el campo	41
EVALUACIÓN PERMANENTE DE MUESTRAS PERIÓDICAS	41
Nivel de invernadero-laboratorio	41
Nivel de campo. Prueba cualitativa	41
Nivel de campo. Prueba cuantitativa	42
7.6. Aplicación de azolla de una variedad al cultivo de dos variedades INIAP de arroz más utilizadas en la zona y determinación de la eficiencia de azolla sobre la base de un estudio de rendimiento en la producción de arroz	44
DESARROLLO EXPERIMENTAL DE UTILIZACIÓN DE AZOLLA EN EL CULTIVO DEL ARROZ	44
Fase Invierno	44
Fase Verano	46
7.7. Transferencia de información a arroceros y agrónomos. Difusión de resultados de esta investigación y capacitación al agricultor para el empleo de azolla	47
8. Situación inicial y situación final del grupo meta	50
8.1. Situación inicial	50
8.2. Situación final	51
9. Estimación de efectos e impactos	52
9.1. Tecnológicos	52
9.2. Económicos	52
9.3. Sociales	52
9.4. Ambientales	53

9.5. Género	53
10. Productos del Proyecto	54
11. Logros adicionales	56
12. Limitaciones en el desarrollo del proyecto y soluciones	58
13. Conclusiones y recomendaciones	59
13.1. Conclusiones	59
13.2. Recomendaciones	59
14. Lecciones Aprendidas	61
15. Literatura Consultada	62
16. Fecha y firma del investigador principal	65
Anexo	66

3.2. INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro	Pá
Cuadro 6.1. Solución nutritiva Hoagland H-40. Componentes	19
Cuadro 6.2. Tratamientos aplicados a las piscinas experimentales de cultivo de azolla-Daule	21
Cuadro 7.0. Lugares de muestreo y condiciones de las plantas de Azolla	27
Cuadro 7.1. Información meteorológica. Estación Daule (Año 2002)	30
Cuadro 7.2. Características físicas de los Suelos	31
Cuadro 7.3. Características químicas de los Suelos	32
Cuadro 7.4. Resultados de los análisis de agua de Chanduy	33
Cuadro 7.5. Resultados de análisis de suelo y agua de la estación San Gabriel (Daule)	33
Cuadro 7.6. Evolución de las variedades de azolla del IRRI	34
Cuadro 7.7. Resultados de análisis de suelos del ensayo de propagación	35
Cuadro 7.8. Evolución de la propagación de Azolla con EM frente a una testigo sin EM	36
Cuadro 7.9. Resultados de análisis de suelos y foliar de azolla del ensayo con EM	37
Cuadro 7.10. Resultados de análisis de agua después del tratamiento con EM	37
Cuadro 7.11. Evolución del peso y productividad a diferentes medios de cultivo	38
Cuadro 7.12. Perfil de aminoácidos de Azolla nativa de invernadero	40
Cuadro 7.13. Pruebas de fertilización de azolla en el campo	41
Cuadro 7.14. Producción de azolla a distintos tratamientos. Diseño factorial exploratorio	42
Cuadro 7.15. Análisis de la varianza para el rendimiento	43
Cuadro 7.16. Análisis de las medias de los tratamientos significativos	43
Cuadro 7.17. Rendimiento, macollamiento y espigamiento del arroz. Cultivo de invierno	45
Cuadro 7.18. Valores estadísticos de rendimiento, macollamiento y espigamiento (Invierno)	45
Cuadro 7.19. Rendimiento, macollamiento y espigamiento del arroz. Cultivo de verano	46
Cuadro 7.20. Valores estadísticos de rendimiento, macollamiento y espigamiento (Verano)	47

Figura	Pág.
Figura 7.1. Areas climáticas en el Ecuador	29
Figura 7.2. Luminosidad promedio diaria a distintos niveles de sombra	39
Figura 7.3. Aumento de biomasa a distintas luminosidades	39

3.3. ANEXOS

Contenido	Pág.
<i>Unidades y símbolos</i>	66
Foto 1. Corte Histológico longitudinal	67
Foto 2. Borde Células Transparentes	67
Foto 3. Células transparentes con aire	67
Foto 4. Filamentos del agua	67
Foto 5. Anabaena azollae-rosario	67
Foto 6. Muestreo	67
Foto 7. Azolla con 50% de luz solar	67
Foto 8. Llegada de Azolla IRRI	68
Foto 9. Crecimiento de Azolla. Influencia del magnesio	68
Foto 10. Azollario – ESPOL	68
Foto 11. Bandeja con Azolla	68
Foto 12. Cultivo de Azolla. Cooperativa San Gabriel	68
Foto 13. Microphylla 4504	68
Foto 14. Cultivo de Azolla con materia orgánica	68
Foto 15. Cultivo de Azolla. Preparación de Piscinas	68
Foto 16. Semillero	69
Foto 17. Incorporación de Azolla al cultivo de arroz	69
Foto 18. Siembra de arroz en parcelas	69
Foto 19. Control de plagas y malezas	69
Foto 20. Azolla en su medio natural	69
Foto 21. Azolla con uno de los tratamientos	69
Foto 22. Piscina del Azollario	69
Carrapiço Francisco. REPORT	70

4. JUSTIFICACIÓN

Casi 3 mil millones de personas comparten la cultura, las tradiciones y el inexplorado potencial del arroz. Arroz es un alimento, pero también es sociedad, cultura, política, negocio, belleza del paisaje, la gente en sus comunidades. En lema de la FAO (www.fao.org) “el arroz es vida”.

El arroz es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial. Para los países en vías de desarrollo, el arroz representa el 27 por ciento del consumo diario de energía y el 20 por ciento del consumo diario de proteínas (FAO, 2003).

Los sistemas de producción basados en el arroz y actividades vinculadas emplean a cerca de mil millones de personas de las zonas rurales de los países en vías de desarrollo. Aproximadamente cuatro quintas partes del arroz mundial es cultivado por pequeños agricultores en países de escasos ingresos. En los países en vías de desarrollo hay aproximadamente 840 millones de personas desnutridas, entre ellos más de 200 millones de niños (FAO, 2003).

En esta perspectiva, la humanidad enfrenta el especial reto de establecer unos sistemas arroceros eficaces y productivos que contribuyan a erradicar este inaceptable grado de hambre y permitan el desarrollo económico y la mejora de la calidad de vida, especialmente en las zonas rurales. De otro lado, la producción de arroz enfrenta importantes limitaciones, entre ellas, una disminución de los recursos naturales, escasez de mano de obra, limitaciones institucionales y contaminación medioambiental.

La importancia del arroz en el Ecuador se cifra en lo siguiente: una superficie sembrada anual en incremento hasta la dimensión de los últimos años de alrededor de 400 000 ha, que le ubica en el primer lugar dentro de los países andinos; un consumo promedio diario por persona de 115 g de arroz blanco en 1997 (GTZ-IICA-INIAP-CIAT, 2003); una producción correspondiente al ciclo de invierno de 2001 de 660 000 t (INEC y Proyecto SICA, 2001). La actividad vinculada a este cultivo da empleo al 22% de la población económicamente activa, involucrando alrededor de 140 000 familias (SICA-BIRF/MAG, 2002).

El cultivo de arroz requiere de abonos que provean una mezcla de micronutrientes y de macroelementos, entre los cuales el nitrógeno ocupa el primer lugar. El nitrógeno (N) es un elemento capital de la química de las plantas, que lo requieren normalmente en gran cantidad, por lo que con frecuencia este elemento resulta el factor limitante de su crecimiento. Irónicamente las plantas no pueden utilizar el abundante nitrógeno diatómico (N_2) del aire, sino que lo asimilan en la forma de nitrato (NO_3^-) o de amonio (NH_4^+). En vista de que las plantas toman del suelo el nitrógeno necesario para su crecimiento, la restitución de este elemento al suelo es un asunto vital para la agricultura.

La moderna agricultura sostenible requiere revisar la ecuación entera de los costos considerando los costos directos de producción y los costos indirectos del ambiente. Las ventajas de la Revolución Verde estuvieron principalmente basadas en el uso elevado de fertilización con nitrato. Se puso poco énfasis en el incremento de la aplicación de leguminosas en las prácticas de rotación agrícola. Además se hicieron

pocos experimentos para incrementar las habilidades de fijación de nitrógeno de los cultivos existentes de leguminosas o para entender la complejidad de la simbiosis. Las discusiones sobre nuevos cultivos necesitan reconocer las ventajas de la simbiosis e incluir una estrategia dirigida a dejar a un lado el nitrato contaminante del ambiente (Gresshoff, 1990).

En el Ecuador la cuestión agrícola y arrocerá reviste gran complejidad. La dolarización y la situación económica de los últimos años han producido una fuerte subida de los precios de los fertilizantes químicos industriales importados y, en definitiva, se ha elevado el costo de producción y venta del arroz.

Una alternativa original del abono nitrogenado químico es la fijación biológica de nitrógeno, que la realizan ciertas bacterias y algas. Estos microorganismos poseen un complejo enzimático que se encarga de convertir el nitrógeno elemental en amonio que es directamente aprovechable para las plantas, o es oxidado a nitratos por bacterias nitrificantes presentes en los suelos (Sprenst, 1979).

Algunas ventajas de la aplicación de los fijadores de nitrógeno en la agricultura se describen a continuación:

Los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre o simbióticos obtienen la energía para su metabolismo en forma directa o indirecta de la oxidación de azúcares elaborados vía fotosíntesis, la energía para la fijación de nitrógeno es proporcionado por el sol. De esta manera estos microorganismos son los productores del abono nitrogenado más barata del mundo.

La fijación biológica ocurre in situ, cerca de la planta, se realiza durante todo el año en cantidades controladas por la necesidad, lo que ahorra costos de transporte del abono hacía los sembríos y evita el sobreabonamiento y la contaminación de medio ambiente por mal uso de fertilizantes químicos (National Academy of Science, 1979).

Por su alta capacidad fijadora de nitrógeno, la asociación simbiótica entre *Azolla* sp. y la cianobacteria filamentosa *Anabaena* sp. ha adquirido en los últimos años mucha importancia para la agricultura, especialmente para el cultivo de arroz (Carrapico et al., 2001; Watanabe, 2000; Peters 1983).

Azolla es un helecho acuático que alberga en las cavidades en la base de la fronda una cianobacteria del género *Anabaena*. Ecológicamente la azolla es responsable del aumento sustancial de nitrógeno del medio ambiente debido a que durante su vida fija nitrógeno y cuando muere este nitrógeno fijado puede ser utilizado por las plantas en su alrededor. La *Azolla Anabaena* tiene un alto potencial como abono verde en el cultivo de arroz en zonas tropicales, fijando aproximadamente 600 kg de nitrógeno por hectárea por año en condiciones óptimas de temperatura, luz y composición química del sustrato (Peters, 1985; Peters, 1986; Subramanian, G., 1986; Yoneyama, 1987; Zimmermann, 1987).

Otra ventaja adicional del hecho que azolla es que disminuye la presencia de malezas, que en los trópicos son las acompañantes más frecuentes del arroz, convirtiéndose incluso en una amenaza para el cultivo. Los estudios demuestran que la presencia de

azolla flotando en la superficie del agua evita el crecimiento de la maleza y ayuda a ahorrar herbicidas y labor (Nierzwicki-Bauer, 1990).

El cultivo conjunto o “cultivo dual” de arroz con el helecho acuático azolla, en los países asiáticos ya es parte de la agricultura arroceras tradicional y sus beneficios están enteramente investigados y conocidos (Ladha y Reddy, 1995; Fans, 1992; Roger, 1991). Azolla y las plantas del arroz crecen un determinado tiempo juntos hasta que la gramínea, que presenta un pronunciado crecimiento vertical, se eleva por algunos centímetros por encima de Azolla y al hacerse frondoso le da sombra y la azolla deja de hacer su fotosíntesis y perece. Después, la azolla muerta se precipita al suelo en donde es descompuesta por las bacterias, liberándose de esta manera cantidades altas de amoníaco, que por su lado prontamente es oxidado a nitrito y finalmente a nitrato, proporcionando el deseado fertilizante nitrogenado al arroz.

El beneficio de esta biotecnología es tan bueno que países del Africa, Brasil, Colombia y otros han intentado exitosamente su aplicación.

En el Ecuador existen trabajos preliminares (Ramírez, 1986; Icaza, 1991; Palacios, 1992) que señalan la presencia de azolla nativa en la Costa y sus bondades como abono verde sobre los campos de arroz.

Por estas razones se consideró de importancia trascendental estudiar de forma sistemática la factibilidad de una aplicación de Azolla en los cultivos de arroz en nuestro país.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la aplicación de la simbiosis diazotrófica entre *Azolla* y *Anabaena* como abono verde para el cultivo de arroz en el Litoral Ecuatoriano.

5.2. OBJETIVOS INMEDIATOS (Metas)

- 5.2.1. Identificar taxonómicamente a los componentes de sistema simbiótico *Azolla Anabaena* de los ecosistemas de la Región de Estudio.
- 5.2.2. Conocer las características existentes en los ecosistemas en donde se hallaron las muestras de azolla nativa, sobre todo en lo que se refiere al clima y a la composición química de los cuerpos de agua y suelos.
- 5.2.3. Conocer y comparar las características y requerimiento de las azollas nativas y de una azolla introducida (recomendada por IRRI) en cultivo a nivel de invernadero.
- 5.2.4. Determinar y comparar la capacidad fijadora de nitrógeno de las azollas a nivel de laboratorio.
- 5.2.5. Producir en forma masiva la azolla más eficiente en crecimiento y fijación, a nivel de lagunas experimentales en el campo.
- 5.2.6. Optimizar el sembrío de dos variedades (INIAP) de arroz con azolla, de acuerdo a la zona y determinar la eficiencia de azolla sobre la base de un estudio de rendimiento en la producción de arroz.
- 5.2.7. Transferir datos a los arroceros y agrónomos. Difundir los resultados de esta investigación y capacitar al agricultor para el empleo de azolla.

6. ACTIVIDADES DESARROLLADAS

6.1. OBJETIVO 1. Identificar taxonómicamente a los componentes de sistema simbiótico *Azolla Anabaena* de los ecosistemas de la Región de Estudio.

Para lograr el objetivo 1, se realizaron tres actividades que se detallan a continuación:

ESTUDIOS BIBLIOGRÁFICOS

Esta actividad se efectuó principalmente entre enero y marzo del 2001. Consistió en revisar la mayor cantidad de información sobre el tema mediante consultas de biblioteca, entrevistas a consultores nacionales y extranjeros y a través de internet.

MUESTREOS DEL HELECHO AZOLLA

Esta actividad fue precedida de un taller de capacitación sobre la metodología del muestreo. En el 2001 se realizaron los primeros muestreos entre enero y marzo, y otros entre junio y agosto, de preferencia en sectores cultivados con arroz y en humedales.

En Milagro, Chanduy y Las Maravillas la *Azolla* presentaba coloración rojiza; en otros lugares crecían asociadas al cultivo del arroz, con malezas acuáticas y adheridas al suelo.

En Montalvo, Mocache, Quevedo, El Triunfo, Puerto Inca, Naranjal y la Troncal no se encontró *Azolla*.

Se reconoce que el helecho *Azolla* se ajusta a un amplio rango de condiciones climáticas, desde climas fríos hasta subtropicales y tropicales, como se muestra en el Cuadro 7.1.

Los muestreos de *Azolla* incluyeron la recolección de sedimentos y aguas, que fueron posteriormente analizadas en el laboratorio (ESPOL, INIAP-Bolicho, Dr. Fuentes). Las muestras de suelos fueron tomadas a una profundidad de 20 cm y las de agua se recogieron de la superficie. En las muestras de suelos se determinó, textura, color, pH, materia orgánica, capacidad de intercambio de cationes, conductividad eléctrica, con objeto de conocer la fertilidad de estos suelos.

ANÁLISIS DE IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

A medida que se recolectaban las muestras se procedió a identificarlas de la siguiente forma: primero se realizó un corte histológico longitudinal (Anexo. Foto 1), con el uso del microscopio se observó la presencia de la cianobacteria *Anabaena azollae* y de microsporangios.

El tamaño de una hoja de *Azolla* normalmente desarrollada es de 0.5 mm de largo aproximadamente y su borde está cubierto por células transparentes como se indica en la Foto 2 (Anexo). Las células transparentes están llenas de aire (Anexo. Foto 3).

A consecuencia del corte longitudinal se observó filamentos de la cianobacteria *Anabaena azollae* (Anexo. Foto 4). En la Foto 5 (Anexo) se aprecia la presencia de cianobacterias *Anabaena azollae* en forma de rosario.

Para la clasificación se tomaron, según los más recientes estudios sistemáticos (taxonómicos), las principales categorías que se usan de manera general para la clasificación del helecho, lo que incluye:

DIVISIÓN:

CLASE:

ORDEN:

FAMILIA:

GENERO:

ESPECIE:

N C:

6.2. OBJETIVO 2. Conocer las características existentes en los ecosistemas en donde se hallaron las muestras de *Azolla* nativa, sobre todo en lo que se refiere al clima y a la composición química de los cuerpos de agua y suelos.

Para lograr el objetivo 2, se realizó la actividad que se detalla a continuación:

CARACTERIZACION ECOLOGICA DE LOS SITIOS MUESTREADOS

Esta actividad se llevó a cabo en el primer trimestre del 2001. Consistió primeramente en hacer un levantamiento cartográfico de las zonas de estudio, en relación con las áreas de muestreo, así como organizar información a cerca del relieve, aire, aguas, suelo y medio biótico de dichas zonas; a continuación, durante el muestreo, se tomaron los datos geográficos y ecológicos de los hábitat en donde se recolectaron las muestras, lo mismo que se recogieron muestras de suelo y agua en los sitios de mayor importancia para esta investigación.

Las muestras de sedimento y de agua fueron analizadas en los laboratorio de ESPOL, INIAP-Bolicho y Dr. Fuentes. En las muestras de suelos se determinó, textura, color, pH, materia orgánica, capacidad de intercambio de cationes, conductividad eléctrica, N, P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Zn, Cu. En las muestras de agua se analizó pH, conductividad eléctrica, iones mayores incluyendo cationes (Ca^{++} , Mg^{++} , N^+ y K^+) y aniones (Cl^- , $\text{SO}_4=$ y CO_3H^-). Estos análisis estuvieron dirigidos a establecer la fertilidad, los balances de carga eléctrica y otras características del medio en relación con el desarrollo de la *Azolla*.

Los sitios de estudio más importantes correspondieron a Daule, Lomas de Sargentillo, Las Maravillas, Samborondón, Yaguachi, Babahoyo, Catarama, 3 Postes, Santa Lucía, Laurel y Milagro.

Dentro de esta actividad se revisó y procesó información de distintas fuentes, entre ellas, del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (www.inamhi.gov.ec), Centro

de Levantamientos integrados de Recursos Naturales por Sensores Remotos-CLIRSEN (www.clirsen.com), Instituto Geográfico Militar (IGM) del Ecuador (www.igm.gov.ec), Proyecto SICA-BM (www.sica.gov.ec) y Banco Mundial.

6.3. OBJETIVO 3. Conocer y comparar las características y requerimiento de la *Azolla* nativa y de una *Azolla* introducida (recomendada por el IRRI, International Rice Research Institute) en cultivo a nivel de invernadero.

Para lograr el objetivo 3, se realizaron tres actividades que se detallan a continuación:

CLASIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS ESPECIES NATIVAS E INTRODUCIDAS

Especies Nativas

En el Ecuador se ha reportado la existencia de 4 variedades de *Azolla*: *micropylla* Kaulf, *caroliniana* Willd, *filiculoides* Lam y *mexicana* C. Presl (Jorgensen y León-Yáñez, 1999). Dentro del proyecto, los muestreos centrados en el Ecosistema Guayas (Proyecto *Azolla-Anabaena*, Boletín informativo #2) permitieron encontrar una especie nativa, que corresponde a la *Azolla caroliniana*. En el año 2001 fue necesario volver a muestrear (Anexo. Foto 6) ya que en invierno y por la escasa experiencia inicial no se logró mantener el material vegetativo.

Gran parte del trabajo del primer año (2001) se dirigió a mantener viva y hacer crecer a la *Azolla caroliniana*. La aclimatación de las muestras de campo a las condiciones de laboratorio se consiguió superando dos problemas principales: calor e insolación. En el invernadero que se construyó en el campus “Gustavo Galindo” de la ESPOL para el desarrollo de la *Azolla* (Azollario) se constató inicialmente que la *Azolla* moría por el calor, por lo que se optó por colocar hojas de palma sobre la cubierta del azollario, que inicialmente fue plástica, y alternativamente se estableció un área de cultivo en el patio del bloque de laboratorios del Instituto de Ciencias Químicas (ICQ), con buenas condiciones de clima. En este lugar se construyeron mesones para bandejas de crecimiento y una piscina (P5). El problema de insolación fue investigado mediante pruebas de crecimiento a diferentes condiciones de exposición a la luz solar, con el mejor resultado cuando la *Azolla* se exponía a un 50% de la luz solar (Anexo. Foto 7) equivalente a 320 luxes. Los detalles de esta investigación se describen en el documento EVALUACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LUZ EN EL CRECIMIENTO DE AZOLLA (Anexo. Productos: Documentos Científicos).

Debido a los intensos aguaceros del invierno-2002 el azollario se desplomó y las piscinas P1-P4 del área del azollario se colmataron. Al reconstruir esta infraestructura se elevó más el techo del Azollario y se cubrió con hojas de bijao hasta que dé un 50% de exposición de luz. Asimismo se construyó sobre las piscinas P1-P4 un techado de protección de luz y se sembró banano a sus alrededores a fin de conseguir un ambiente más temperado.

Una vez construidas estas mejoras, todo el esfuerzo se dirigió a propagar *Azolla caroliniana* nativa en el azollario y patio del ICQ-Laboratorios, teniendo que enfrentar

varios otros problemas conforme se fueron presentando, entre ellos:

- Crecimiento competitivo de lentejilla. Este problema es difícil de superar. A nivel de laboratorio no hay manera de eliminar la lentejilla cuando comienza a crecer junto con la *Azolla*, a la que termina desplazándola.
- Crecimiento competitivo de algas. Las algas se pueden controlar con la luz. A altos niveles de intensidad de luz las algas aventajan en desarrollo a la *Azolla*, que las eliminan. Otra forma de control es mediante el uso de Microorganismos Eficientes (EM), como se explica más adelante.
- Presencia de renacuajos (*Bufo bufo*). No se han podido eliminar los renacuajos cuando aparecen. Se ensayó controlarlos con insecticida Furadán, sin resultado.
- Presencia de insectos. Son controlables con insecticida Actelít a una dosis de 10 mL en 5 L de agua.

Especies Introducidas

Uno de los objetivos del proyecto fue realizar una ínter comparación entre la *Azolla* nativa e introducida; por esta razón se gestionó el envío de una especie del International Rice Research Institute (IRRI) de Filipinas.

Mediante internet se contactó en el IRRI con Teresita Ventura (Assistant Scientist 1, Biofertilizer Germplasm Collection Crop, Soil and Water Sciences Division) a quien se solicitó el envío de *Azolla*, comenzando trámites para esta operación en marzo-2002. Para esto y cumpliendo el pedido del IRRI, se envió información sobre las condiciones climáticas, edafológicas y ecológicas del Ecosistema Guayas, con lo que el IRRI recomendó las azollas más indicadas para estas condiciones. A fines de agosto-2002 llegaron 7 cajas petri conteniendo 20 g de las siguientes especies:

Azolla caroliniana 3001
Azolla caroliniana 3514
Azolla microphylla 4018
Azolla microphylla 4021
Azolla microphylla 4024
Azolla microphylla 4030
Azolla microphylla 4504

Las azollas llegaron estropeadas por el viaje, desprendidas la mayoría de sus raíces (Anexo. Fotos 8). Inmediatamente fueron inoculadas en la solución nutritiva para *Azolla*, con esperanza de que se recuperen. En el Cuadro 7.6 se incluye información resumida de la evolución de estas Azollas y los detalles de esta experiencia se describen en el documento INTRODUCCIÓN DE AZOLLA DE FILIPINAS-IRRI (Anexo. Productos: Documentos Científicos). Asimismo se efectuó una serie de análisis de suelos y aguas para establecer las condiciones donde se desarrollan las Azollas (Cuadro 7.5).

ADAPTACIÓN DE AZOLLA A NIVEL DE LABORATORIO. USO DEL MEDIO DE CULTIVO HOAGLAND

Una vez muestreadas las Azollas fueron trasladadas al Laboratorio de Cromatografía de la ESPOL, para adaptarlas al Laboratorio, una vez ahí, se procedió a lavarlas e inocularlas en el medio de cultivo Hoagland H-40. Después de observar una propagación adecuada con el medio de cultivo, se continuó con la siembra de *Azolla* en piscinas de propagación en la ESPOL y posteriormente en San Gabriel-Daule, sitio donde se llevaron a cabo los experimentos de campo.

La *Azolla caroliniana* nativa y las variedades introducidas de Filipinas en general crecen bien con la solución nutritiva Hoagland H-40 (Cuadro 6.1). Esta solución ha sido recomendada para el cultivo de *Azolla*. En el proyecto se preparó frecuentemente esta solución con el fin de propagar *Azolla* a nivel de laboratorio utilizando tanto agua destilada como agua de condensado de los sistemas de aire acondicionado.

Cuadro 6.1. Solución nutritiva Hoagland H-40. Componentes

Macronutrientes	Conc. (mol/L)	Micronutrientes	Conc. (g/L)	Fe-EDTA	Cantidad (g)
CaCl ₂ .2H ₂ O	4.0	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.040	FeSO ₄ . 7H ₂ O	2.00
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.6	H ₃ BO ₃	1.425	EDTA-Na ₂	2.68
NaCl	1.0	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.020	H ₂ O	200.00
KH ₂ PO ₄	0.7	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.110		
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0.1	Na ₂ MoO ₄ . H ₂ O	0.125		
KCl	2.0	MnSO ₄ . H ₂ O	0.765		

En este punto del trabajo se presentó la necesidad de evaluar las bondades del agua y suelo a usarse normalmente en el desarrollo de la *Azolla*. Para esto se efectuó un estudio del crecimiento de la *Azolla* en distintos medios de cultivo, teniendo como referencia de base la solución Hoagland. Utilizando recipientes plásticos o bandejas se dispuso en ellos 1 L del medio de cultivo con 5 g de *Azolla* fresca. Aparte del medio Hoagland H-40 se probaron otros en los que se suprimió un elemento nutritivo por vez, ya sea P, K, Mg, Mn, Co, Zn o Fe (Anexo. Foto 9). Este experimento se reporta en forma detallada en el documento EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE MICRO Y MACRO ELEMENTOS NURIENTES EN EL DESARROLLO DE AZOLLA-ANABAENA (Anexo. Productos: Documentos Científicos).

CONSTRUCCIÓN DEL INVERNADERO (AZOLLARIO) Y PRUEBAS DE PROPAGACIÓN DE AZOLLA A NIVEL DE AZOLLARIO

En esta fase de la investigación se construyó un invernadero (Azollario) en el campus Prosperina de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), km 30.5 vía Perimetral (Anexo. Foto 10).

Las muestras de *Azolla* recolectadas se colocaron en bandejas plásticas con 6 kg de

suelo y una lámina de agua de 4 cm aproximadamente. Las bandejas plásticas se ubicaron inicialmente en el Laboratorio de Servicios Generales del ICQ y posteriormente se llevaron al invernadero (Anexo. Foto 11).

A fin de contar con suficiente material vegetativo de *Azolla* para los trabajos posteriores se construyeron, en la zona del azollario, cuatro piscinas de 4.6 m de longitud, 2.6 m de ancho y 20 cm de profundidad, denominadas P1, P2, P3, y P4.

6.4. OBJETIVO 4. Determinar y comparar la capacidad fijadora de nitrógeno de las azollas a nivel de laboratorio

Para lograr el objetivo 4, se realizó la actividad que se detalla a continuación:

ANÁLISIS BROMATOLÓGICO Y CROMATOGRÁFICO

Para determinar el nivel de fijación de nitrógeno se efectuaron trabajos en los campos de bromatología y cromatografía. El análisis de la fijación de nitrógeno mediante el método de reducción de acetileno (ARA) está basado en técnicas cromatográficas que no han sido desarrolladas aún en el país. Este proyecto se propuso implementar esta técnica debido a que se contaba con equipo de cromatografía, vidriería y gases etileno y acetileno.

Se revisó tecnología seguida por el Laboratorio de Ecología y Fisiología de Cianobacterias de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid (España) y por el Centro de Biología Ambiental de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Lisboa (Portugal). También se recibió asesoría sobre este tema de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada (José Olivares Pascual).

Finalmente se prepararon mezclas de etileno-acetileno en el laboratorio pero no se consiguió la separación de estos compuestos. La compañía AGA de Guayaquil que dispone de un cromatógrafo en su planta de producción de acetileno se sumó al trabajo de detección de la mezcla, pero tampoco se obtuvo el resultado esperado.

Ante esta situación, se realizaron análisis bromatológicos principalmente en el Laboratorio de Bromatología del ICQ y otros de validación se cumplieron en los laboratorios del PROTAL (Programa de Tecnología de Alimentos) de la ESPOL y de INIAP-Estación Boliche. Estos análisis cumplieron el propósito alternativo de medir la fijación de nitrógeno.

6.5. OBJETIVO 5. Producir en forma masiva la azolla más eficiente en crecimiento y fijación, a nivel de piscinas experimentales en el campo.

Para lograr el objetivo 5, se realizaron dos actividades que se detallan a continuación:

CULTIVOS DE EXPERIMENTACIÓN CUALITATIVA

El cultivo de *Azolla* en el campo estuvo dirigida a determinar la respuesta de la *Azolla caroliniana* nativa y *Azolla microphylla* 4504 procedente del IRRI-Filipinas a la fertilización mineral y orgánica en la zona de Daule y a estudiar el crecimiento de estas especies.

Para estudiar el crecimiento de la *Azolla* a nivel de campo se diseñó inicialmente un cultivo experimental cualitativo en la Cooperativa San Gabriel perteneciente al Plan América del Cantón Daule (Anexo. Foto 12). Se construyeron 6 parcelas de 6.72 m² y se techaron con paja para dejar pasar un 50% de luz (Azollario). Se utilizaron *Azolla* nativa y una variedad de las introducidas, la *Azolla microphylla* 4504, que fue la que mejor se adaptó a las condiciones del invernadero (Anexo. Foto 13).

Un siguiente experimento tuvo como objetivo determinar el efecto de las aplicaciones de los fertilizantes nitrógeno (N), fósforo (P₂O₅), potasio (K₂O) y materia orgánica (MO), en la *Azolla caroliniana* nativa. Los tratamientos del experimento fueron decididos en base a los resultados de los análisis de suelo efectuados en San Gabriel. Para este experimento se construyeron 24 parcelas de dimensiones 1.20 m*1.40 m y se aplicó un diseño experimental de bloques al azar con 6 tratamientos y 4 repeticiones, como se indica en el Cuadro 6.2.

Cuadro 6.2. Tratamientos aplicados a las piscinas experimentales de cultivo de azolla en San Gabriel-Daule

Tratamiento	Dosis de nutriente (kg/ha)			
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	MO
Fósforo-Potasio	0	60	80	0
Nitrógeno-Fósforo-Potasio	50	60	80	0
Nitrógeno-Fósforo-Potasio	100	60	80	0
Fósforo-Potasio-MO	0	60	80	5000
Materia Orgánica (MO)	0	0	0	5000
Testigo	0	0	0	0

MO = Materia orgánica

Los detalles de este estudio constan en el documento EVALUACIÓN DEL CULTIVO DE AZOLLA EN EL CAMPO (Anexo. Productos: Documentos Científicos). En la Foto 14 (Anexo) se muestra el efecto de la materia orgánica.

A pesar de proporcionarle al cultivo los nutrientes recomendados, se advirtió la presencia de insectos perjudiciales para la *Azolla*, por lo que se aplicó una vez por semana actelit (10 mL en 5 L de agua) para controlarlos.

A más de insectos, en la época de invierno hubo presencia de renacuajos (*Bufo bufo*), que resultaron muy difíciles de combatir, ocasionando una serie de dificultades que en muchas parcelas de cultivo terminaron con la muerte de la *Azolla*.

CULTIVO DE EXPERIMENTACIÓN CUANTITATIVA

Mediante un diseño experimental de tipo Factorial Exploratorio sin réplicas, se estudió el crecimiento de la azolla nativa (*Azolla caroliniana*) y la azolla introducida del IRRI (*Azolla microphylla* 4504). Se utilizaron combinaciones “entra (1) no entra (0)” de los tratamientos con insecticida (I), fósforo (P), nitrógeno (N) y materia orgánica (MO).

Para desarrollar este experimento se prepararon 32 piscinas de cultivo de 0.56 m² cada una, disponiéndose los tratamientos mediante sorteo al azar. El peso inicial de *Azolla* sembrada en cada piscina fue de 20 g. Luego de transcurrido el tiempo (T) en días, en que la *Azolla* cubrió la superficie de cada piscina (Anexo. Foto 15) se la recogió y pesó (m₂), estableciéndose la producción (P) mediante la siguiente fórmula:

$$P \text{ (t/ha/mes)} = (0.6)(m_2 - 20)/0.56T$$

Con asesoría técnica del PROMSA (Leonardo Corral, Raúl Estrada) y un miembro del Grupo de Referencia (Carlos Rolando) se procedió finalmente a efectuar la evaluación estadística de la información levantada en el experimento.

6.6. OBJETIVO 6. Optimizar el sembrío con *Azolla* de dos variedades (INIAP) de arroz que más se utilicen en la zona y determinar la eficiencia de *Azolla* sobre la base de un estudio de rendimiento en la producción de arroz.

Para lograr el objetivo 6, se realizó la actividad que se detalla a continuación:

DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL CULTIVO DE ARROZ CON AZOLLA EN LA COOPERATIVA SAN GABRIEL-DAULE. PLANTACIONES DE INVIERNO Y VERANO 2003

Para establecer la bondad de la *Azolla* como fertilizante del arroz se realizaron dos siembras de arroz, una en invierno (enero-junio) y otra en verano (julio-diciembre). Una de las razones de esto fue comparar los efectos del clima sobre la producción y desarrollar experiencia del uso y manejo del bioabono en estas condiciones.

El cultivo experimental de campo se desarrolló mediante un diseño de “parcelas divididas” con el objeto de estudiar el rendimiento de las variedades de arroz INIAP 12 e INIAP 14. Las parcelas principales fueron subdivididas en 6 subparcelas que incorporaron 4 réplicas (I, II, III, IV) de los subtratamientos fertilizantes que se indican a continuación:

Testigo

100 kg N-Urea/ha

40 000 kg AF(*Azolla* fresca)/ha+50 kg N-Urea/ha

20 000 kg AF/ha+ 50 kg N-Urea/ha

20 000 kg AF/ha

40 000 kg AF/ha

Los principales resultados obtenidos en los experimentos y que se evaluaron estadísticamente, correspondieron a los parámetros: rendimiento (t/ha) del arroz, macollamiento (macollos/planta) y espigamiento (espiguillas/m²).

Fase Invierno. Para determinar los valores de los parámetros se contabilizó el número de plantas en cada parcela unitaria y el número de macollos por cada planta. De esta manera se calcularon los valores promedio de macollos por planta. A la cosecha se seleccionaron al azar 10 plantas de cada parcela unitaria y se procedió a contar las espiguillas y pesar los granos de arroz.

Fase Verano. En la fase de verano se usó el mismo diseño experimental que en la fase de invierno. Para determinar los valores de los parámetros en esta vez se cosecharon al azar 5 plantas-macollo de cada parcela, procediéndose luego en el laboratorio a contar y pesar los granos y a calcular el macollamiento y espigamiento.

Las distintas actividades que se cumplieron en estos cultivos se indican a continuación.

Búsqueda y establecimiento del sitio experimental. El sitio experimental quedó establecido en el Recinto San Gabriel del Cantón Daule, en los terrenos de propiedad de Leonardo Mejía. El área asignada al Proyecto Azolla-Anabaena fue de 1/4 de hectárea.

Diseño experimental. El diseño experimental fue determinado luego de discusiones técnicas con asesores del PROMSA (Leonardo Corral, Raúl Estrada) y del Grupo de Referencia (Carlos Rolando). Otras consideraciones se derivaron principalmente de los trabajos de Carrapiço *et al.* (2000) y Lumpkin y Walker (1979).

Semillero. Se ubicó el semillero a un costado del camino entre las piscinas de propagación de azolla y las parcelas experimentales del arroz. Esta ubicación estuvo principalmente relacionada con la provisión y manejo del agua. Se usaron semillas INIAP 12 e INIAP 14, ambas certificadas (Anexo. Foto 16). Estas variedades son preferidas por los agricultores arroceros, además son variedades de referencia porque se pueden cosechar a los 115 días, lo cual implica un menor costo de producción, menor inversión en herbicidas para el control de malezas y de insecticidas para el control de insectos, además se prefieren porque se pueden obtener 2.5 cosechas al año, por esta razón fueron las variedades objeto de esta investigación. El semillero se abonó durante todo su período con bioles y EM, con el objeto de fortalecer la planta y evitar la presencia de plagas.

Preparación del terreno. La preparación del suelo para la siembra del arroz se realizó con una fanguadora que incorporó el material de la siembra anterior. Asimismo se aplicó EM para producir la descomposición rápida del material vegetal de la siembra anterior con lo que quedó listo el terreno.

Incorporación de Azolla. Se realizó la incorporación de la azolla de forma manual. Se hicieron dos aplicaciones de azolla en diferentes momentos del crecimiento de la planta, acoplado a la disponibilidad de producción de *Azolla* del azollario de San Gabriel. La primera incorporación se efectuó tres días antes del trasplante del arroz, esto para que la *Azolla* cumpla su proceso de descomposición y libere el nitrógeno fijado. La segunda

aplicación se realizó a los 76 días de la siembra de arroz para completar la dosis recomendada de acuerdo a cada tratamiento, esta segunda aplicación se hizo en crecimiento dual con el arroz, es decir que a medida que el arroz continuaba su proceso de macollamiento le proporcionaba a la azolla mayor cantidad de sombra lo cual provocó la muerte del helecho.

En el cultivo de verano se aplicó una sola dosis de *Azolla* debido a que se contó con suficiente disponibilidad para suplir las necesidades de nitrógeno en cada tratamiento en el arroz (Anexo. Foto 17).

Siembra de arroz en parcelas. La siembra experimental se diseñó y estableció en parcelas en las que por sorteo se dispusieron los distintos tratamientos. Las parcelas se delimitaron con piola, no utilizando muros de separación, a fin de replicar de la manera más cercana posible la realidad del campo (Anexo. Foto 18).

Control de plagas y malezas. El control de las malezas se hizo de forma manual, con la participación de trabajadores de la Cooperativa San Gabriel. Las plagas se controlaron aplicando extracto botánico que es un concentrado de varias plantas, las cuales tienen propiedades repelentes para ciertos insectos; se usó 3 kg de cada planta: hierba luisa (*Aloysia tripillia*), mastrante (*Lippia* sp), ají (*Capsicum frutescens*), marigol (*Tagetes patula*), neen (*Azadirachta indica* A. juss), ajo (*Allium sativum*), menta (*Mentha spicata*) y jazmín (*Jasminum revolutum*); este material fue licuado con agua hasta alcanzar 6 litros del producto final, después de 24 horas se aplicó al cultivo colocando 1 litro de repelente con 19 litros de agua y fumigando las veces que fueron necesarias, generalmente tres veces semanales (Anexo. Foto 19).

Toma de datos de espigas y macollos. Después del florecimiento del arroz, se empezó a hacer el conteo de espigas y macollos por planta.

Datos de Producción. Concluidos los conteos y pesajes, con la participación de estudiantes de la Universidad Agraria del Ecuador y de la ESPOL, se obtuvieron los datos de productividad, que se muestran más adelante en el numeral respectivo de resultados.

6.7. OBJETIVO 7. Transferir la tecnología desarrollada a arroceros y agrónomos. Difundir los resultados de esta investigación y capacitar al agricultor para el empleo de *Azolla*.

DIFUSIÓN DEL CULTIVO DE AZOLLA Y APLICACIÓN EN EL CULTIVO DE ARROZ

Las actividades de difusión se realizaron en diferentes formas, incluyendo principalmente:

Informativos ESPOL (2 informativos). Dirigidos al público en general.

CD de cultivo de Arroz-Azolla. Dirigido a ingenieros y técnico.

Revista Azolla. Manual de cultivo de Azolla. Dirigido a ingenieros y técnicos.

Folleto gráfico. Dirigido a campesinos y agricultores de arroz.

Productos: Documentos Científicos. Diez, dirigidos a académicos y asesores agrícolas.

Días de Campo. Cosecha invierno (1 de junio 2003) y cosecha verano (31 de diciembre 2003). Dirigidos a agricultores y técnicos.

Tesis de grado: una de maestría y dos de ingeniería, que se detallan en el capítulo siguiente de resultados. Dirigido al área académica.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO

BIBLIOGRAFÍA

Como resultado de los estudios de taxonomía y en general sobre el tema del Proyecto se cuenta con libros, folletos, documentos e información electrónica, en un número aproximado de 80 títulos. Este material se encuentra en la ESPOL, Instituto de Ciencias Químicas, Laboratorio de Cromatografía.

En este sitio se ha acumulado la información dura mencionada, pero sobre todo el grupo de trabajo que ejecutó el proyecto cuenta con conocimientos, experiencia y contactos que se pueden aplicar a desarrollar el recurso *Azolla Anabaena* dentro de un plan estratégico del estado, tal como sugirió Carrapiço (2003). Por estas razones, en las mesas de diálogo promovidas por el Gobierno y Participación Ciudadana (2003) se propuso el desarrollo estratégico de recursos naturales del país (Ejemplo *Azolla Anabaena*) como tema alternativo a los tradicionales de salud, educación, telecomunicaciones y energía.

AZOLLA RECOLECTADA Y CONOCIMIENTOS

La *Azolla* nativa encontrada presentaron un aspecto saludable, color verde natural y mejor desarrollo cuando el suelo asociado al sitio de muestreo estuvo provisto de nutrientes, materia orgánica y una lámina fina de agua. En el Cuadro 7.0 se indican las condiciones en que se encontró la *Azolla* en los distintos sitios de muestreo. La mejor *Azolla* correspondió a Laurel, Daule (Ciudad) y Colimes.

IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS MUESTRAS DE AZOLLA

La clasificación se basó en las características botánicas de la planta. Se observa una planta pequeña, acuática y flotante con tendencia a aglomerarse y formar masas compactas en la superficie del agua cuando está flotando (Anexo. Foto 20).

La coloración de las hojas cambia de verde claro a intenso, dependiendo del grado de sombra y disponibilidad de nutrientes; en algunos sitios donde estuvieron expuestas directamente a la luz solar presentaron coloración rojiza.

Esta planta vive asociada a otras plantas acuáticas como la lentejilla, jacinto de agua y diversos tipos de algas verde azules.

El tallo es rastrero, suave y crece como un tricoma. Las raíces alcanzan longitudes de 3 a 4 cm, son ramificadas y nacen de cada ramificación del tallo subdicótoma.

Las hojas son diminutas de aproximadamente 0.5 mm de largo y cerca de las partes apicales de los tallitos están sobrepuestas como escamas. Cada hoja consiste de dos lóbulos: el lóbulo superior posee muchas papilas, es de color verde claro y flota, en su

borde se encuentran de 2 a 4 hileras de células sin clorofila, las hojas no tienen nervadura; el lóbulo inferior de aspecto transparente–parduzco mide aproximadamente 0.7 a 0.8 mm de largo.

Cuadro 7.0. Lugares de muestreo y condiciones de las plantas de *Azolla*

Lugar\Condición	Cantidad	Color	Flotando/ adherida	Fertilidad	Cultivo asociado	Características del sector
Daule-campo	Abundante	Verde intenso	Adheridas al suelo	Rica en nutrientes	Arroz	Sector arrocero con materia orgánica
Daule-ciudad	Abundante	Verde intenso	Flotando	Rica en nutrientes	Ninguno	Desechos domésticos
Brisas de Daule	Escasa	Verde parduzco	Flotando	Deficiencia de nutrientes	Ninguno	Sector arrocero
Petrillo (Puente Lucía)	Escasa	Verde intenso	Flotando	Rica en nutrientes	Arroz	Sector arrocero con materia orgánica
Lomas de Sargentillo	Escaso	Verde intenso	Adheridas al suelo	Con nutrientes	Arroz	Embanque de río
Las Maravillas	Abundante	Café rojizo	Flotando	Escasa	Arroz	Sector arrocero muy húmedo
Plan América	Abundante	Verde	Flotando	Mediana	Arroz	Sector arrocero
Colimes	Abundante	Verde intenso	Adherida al suelo	Buena	Arroz	Sector arrocero y ganadero
Samborondón	Escasa	Verde	Flotando	Mediana	Arroz	Sector arrocero
Yaguachi	Abundante	Verde	Flotando	Buena	Ninguno	Humedal
Babahoyo	Abundante	Verde intenso	Flotando	Materia orgánica	Arroz	Humedal. Sector arrocero
Catarama	Abundante	Verde intenso	Adherida al suelo	Buena	Arroz	Sector arrocero
3 Postes	Escasa	Café rojizo	Adherida al suelo	Buena	Arroz	Sector arrocero
Jujan	Escasa	Verde	Adherida al suelo	Buena	Arroz	Sector arrocero
Santa Lucía	Mediana	Verde	Flotando/ Adherida	Buena	Arroz	Sector arrocero
Laurel	Abundante	Verde intenso	Flotando/ Adherida	Materia orgánica	Arroz	Sector arrocero
Milagro	Abundante	Verde intenso	Adherida	Buena	Banano	Sector bananero
Chanduy	Abundante	Verde claro	Flotando	Mediana	Ninguno	Humedal

La reproducción observada más frecuente es vegetativa, se lleva a cabo a través de periódicas fragmentaciones del tallo en segmentos pequeños, que rápidamente aumentan su tamaño para repetir este proceso.

En la parte interior de un lóbulo inferior se observó un megasporangio. En la parte derecha se reconoció el indusio en forma de “gorrito”; debajo del indusio se reconocieron tres flotadores y por debajo de ellas se ubicaba una sola megáspora.

De acuerdo a los análisis reportados por Carrapiço (2003) se estableció que las muestras

de azolla encontradas en los muestreos en la Costa corresponden a la especie de *Azolla caroliniana* Willd y su clasificación corresponde a las categorías:

HELECHO *Azolla*
DIVISIÓN: Pteridophyta
CLASE: Filicopsida
ORDEN: Salviniales
FAMILIA: Azollaceae
GENERO: *Azolla*
ESPECIE: *caroliniana*
N.C: *Azolla caroliniana*

CIANOBACTERIA *Anabaena azollae*
DIVISIÓN: Cyanophitas
CLASE: Cyanophyceae
SUBCLASE: Hormogonophycideae
ORDEN: Nostocales
FAMILIA: Nostocaceae
GENERO: *Anabaena*
ESPECIE: *azollae*
N.C: *Anabaena azollae*

7.2. CONOCER LAS CARACTERÍSTICAS EXISTENTES EN LOS ECOSISTEMAS EN DONDE SE HALLARON LAS MUESTRAS DE AZOLLA NATIVA, SOBRE TODO EN LO QUE SE REFIERE AL CLIMA Y A LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS CUERPOS DE AGUA Y DE LOS SUELOS

CARACTERÍSTICAS ECOLÓGICAS DE LOS SITIOS MUESTREADOS

Las zonas de exploración de florecimientos de *Azolla* se circunscribieron principalmente a áreas arroceras de las provincias de Guayas y Los Ríos, que abarcan el 92% de la superficie arroceras del país (GTZ-IICA-INIAP-CIAT, 2001). En base de los criterios de Köppen el INAMHI (www.inamhi.gov.ec) identifica perfectamente 23 áreas climáticas en el Ecuador (Figura 7.1); de ellas, las áreas 5, 6 y 7 correspondieron al ámbito de este proyecto.

Area 5: Interior Centro. Abarca al norte Santo Domingo, El Carmen, Puerto Ila, Pichilingue, Ventanas y Babahoyo, al este, hasta las estribaciones de la cordillera Occidental, y al sur hasta las localidades de Milagro y Bucay.

Area 6: Península de Santa Elena. Abarca la península de este nombre hasta el Río Daule por el este alcanzando la estación de Daule en la Capilla.

Area 7: Golfo de Guayaquil. Incluye principalmente las localidades de Guayaquil y Milagro, limitando al norte con la estación Daule en la Capilla, al este con Isabel María, bordeando Manuel J. Calle, y al sur con Naranjal.

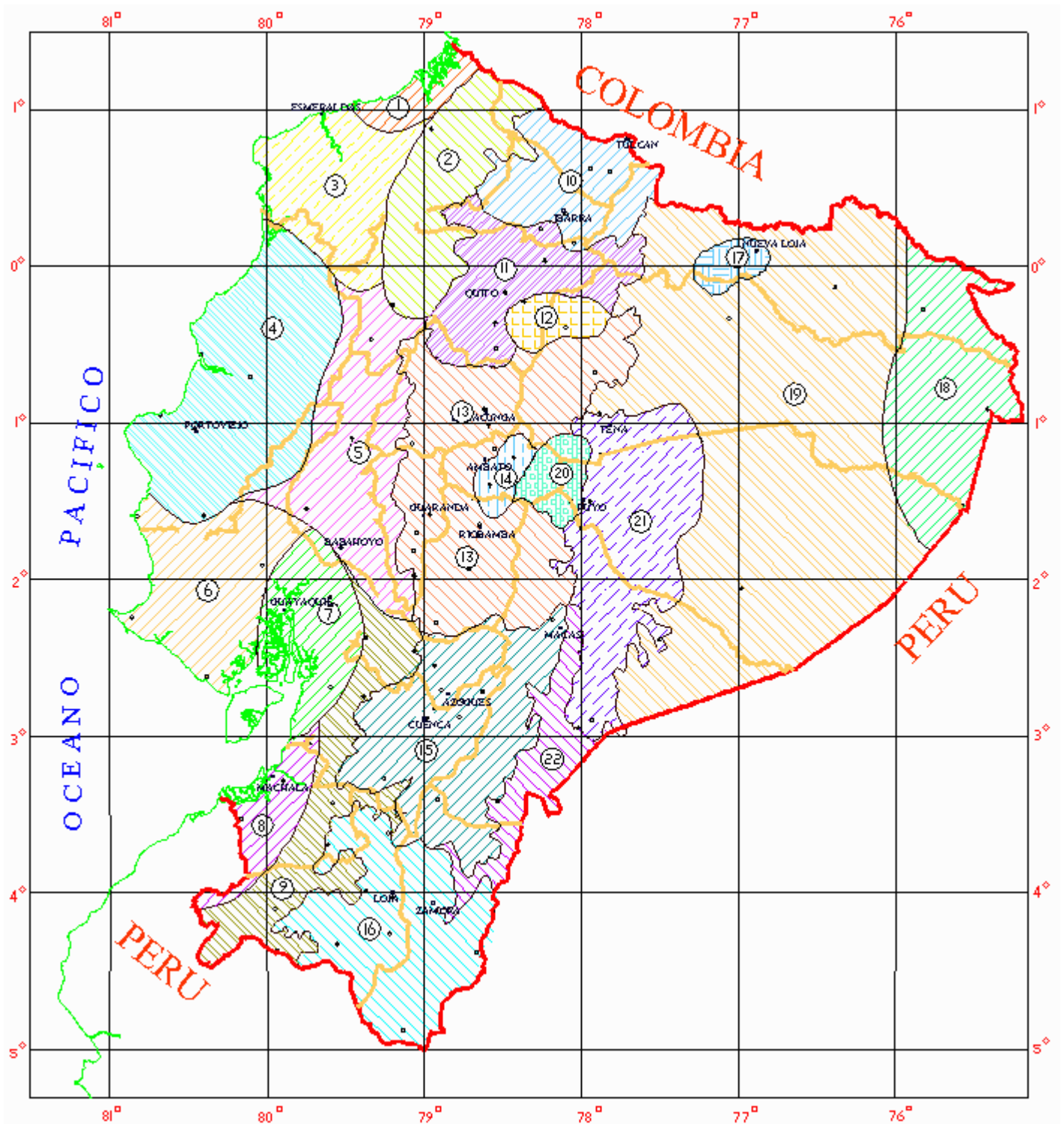


Figura 7.1. Areas climáticas en el Ecuador (www.inamhi.gov.ec)

Las precipitaciones anuales en la Región Litoral aumentan de Oeste a Este. Los valores más bajos corresponden al corredor Manta-Península de Santa Elena con registros de 250 mm, mientras que hacia el Este, hasta alturas de 1500 m en la cordillera occidental de Los Andes, llegan a producirse precipitaciones anuales superiores a 3000 mm. En la provincia del Guayas la precipitación varía de 1000 a 1500 mm y en la de Los Ríos de 1800 a 2200 mm anuales; el régimen de lluvias se produce entre diciembre y abril,

siguiéndole un período seco que va de mayo hasta noviembre. De otro lado, las principales zonas arroceras están por debajo de los 10 msnm. En estas áreas la temperatura oscila entre 22 y 26 °C y la humedad relativa es de 75% o superior (GTZ-IICA-INIAP-CIAT, 2001).

En la llanura litoral, hasta una altura de 500 m en la ladera de la cordillera occidental, el promedio de brillo solar fluctúa entre 600 y 1700 horas anuales, contabilizándose los más períodos de brillo en las zonas más secas (www.inamhi.gov.ec).

Una muestra puntual del clima de las zonas arroceras se presenta en el Cuadro 7.1, que incluye los registros a frecuencia mensual en el año 2000 en la estación meteorológica Daule, en donde se tiene de precipitación 1 067 mm, de temperatura media 25 °C, de humedad relativa 79 % y de radiación solar 539 cal/cm²/d.

Cuadro 7.1. Información meteorológica. Estación Daule (Año 2000)

Mes	Precipitación (mm)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Temperatura Media (°C)	Humedad Relativa (%)	Radiación Solar (cal/cm ² /d)
Enero	242	31.4	17.4	24.4	81	535
Febrero	226	31.0	20.3	25.7	84	577
Marzo	261	31.4	20.7	26.1	85	627
Abril	173	31.7	20.4	26.1	82	677
Mayo	82	30.7	20.2	25.5	81	568
Junio	23	29.4	19.1	24.3	81	455
Julio	9	29.7	18.2	24.0	80	480
Agosto	1	29.7	18.4	24.1	80	456
Septiembre	1	30.8	18.2	24.5	77	589
Octubre	2	30.8	19.2	25.0	74	464
Noviembre	1	31.0	19.1	25.1	73	526
Diciembre	46	32.2	20.0	26.1	74	514
Anual	1067	30.8	19.3	25.0	79	539

Fuente: GTZ-IICA-INIAP-CIAT, 2001.

En las zonas de estudio la radiación fotosintéticamente activa, RFA, presenta valores promedio anuales de 3.25 a 3.90 MJ/m²/d en tanto que la iluminación da isohelias de 880 a 1200 horas de brillo solar (Rolando, 2003; GTZ-IICA-INIAP-CIAT, 2001).

Los suelos donde se muestreó *Azolla* presentan la característica común de ser agrícolas. Estos suelos pertenecen predominantemente al orden de los vertisoles, arcillas tipo 2:1 expansivas, del grupo de las esmectitas, de textura arcillosa, estructura laminar con poros pequeños y numerosos, los cuales retienen gran cantidad de agua y demandan cuidados para mantener una aireación adecuada (Rolando, 2003).

La mayoría de los suelos estudiados dentro del proyecto, como se muestra en el Cuadro 7.2, son planos, de inclinación menor a 2 %; únicamente los suelos de Santa Lucía

tienen inclinaciones entre 5 y 25 % . Asimismo la mayor parte de los suelos presentan elevados niveles de arcillas que les comunican la limitación de pesados.

Cuadro 7.2. Características físicas de los suelos

Zona \ Caracterización	Inclinación	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Textura	Limitantes
Daule	0%-2%	18	32	50	Arcilloso a muy arcilloso	Pedregosidad
Lomas de Sargentillo	Llanuras aluviales con terrazas altas	10	45	45	Arcillosos limoso	Suelos pesados
Las Maravillas	0-2%	22	32	46	Franco - arcillosos a muy arcillosos	Pedregosidad
Samborondón	0-2%	15	30	55	Franco - arcillosos a muy arcillosos	Suelos pesados
Yaguachi	0-2%	22	40	38	Franco – arcillosos profundos	Salinidad
Babahoyo	0-2%	14	29	57	Altamente arcilloso	Inundaciones posibles
Catarama	0-2%	60	15	25	Franco- arcillosos o franco- arenosos	Posibles inundaciones
Tres Postes	0-2%	35	15	50	Arcilloso limosos	Posibles inundaciones
Santa Lucía	5-25%	30	25	45	Areno-arcillosos profundos	Suelos pesados
Milagro	0-2%	16	50	34	Limo arcillosos profundos	No existen

Análisis y elaboración: Proyecto

Otras características físicas y químicas de los factores suelo y agua del medio ambiente relacionado con el proyecto, en sitios considerados importantes, se presentan en los Cuadros 7.3, 7.4 y 7.5. De acuerdo a la información incluida en el Cuadro 7.3 el pH de los suelos va de ligeramente ácido a neutro, con excepción de Yaguachi que es ligeramente alcalino, debido a la influencia estuarina del río Guayas, especialmente en la época de verano. Por otro lado, estos suelos son de muy bajo contenido de nitrógeno (N), que se correlaciona con niveles pobres de materia orgánica (MO), excepto en Babahoyo, que se explica por su baja cota y recurrentes eventos de inundación. El fósforo (P) se encuentra en niveles medios; el calcio (Ca) y magnesio (Mg) presentan valores normales, así como su relación Ca/Mg de 3/1; las concentraciones de hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn) y cobre (Cu) se encuentran a niveles de normal a medio elevado. La sumatoria de la variedad de metales en el suelo, representada por la CIC (Capacidad de Intercambio Catiónico) superior a 10 indica alta fertilidad.

Cuadro 7.3. Características químicas de los suelos

Zona \ Características	pH	Cond. eléctrica (mmho/cm)	N (%)	P (ppm)	K (meq/100g)	Materia Orgánica (%)	CIC (meq/100g)	Ca (meq/100g)	Mg (meq/100g)	Na (meq/100g)	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Cu (ppm)
Colimes	6.5	0.94	0.14	15.9	0.68	2.39	49	28	11.9	1.52	174	78	4.5	11.5
Daule	6.5	0.1	0.08	22	0.87	1.72	42	23	16	1.1	62	26	2.2	7.5
Las Maravillas	6.6	3.7	0.07	24	1.59	2.4	37	19	9.9	6.4	102	50	3.0	6.6
Yaguachi	7.8	3.9	0.12	19.7	0.60	2.0	52	33	8.6	14	22.7	7	3	7
Milagro	6.7	0.25	0.09	3.2	0.55	1.55	38	16	8.2	0.68	92	56	23	13
Babahoyo	6.0	4.73	0.30	35	0.84	5.06	50	23	5.3	5.12	258	111	13.5	23
Chanduy	6.5	0.20	0.10	13.8	0.50	1.73	12	5	2.9	0.9	201	46.8	1.5	4.3

Análisis y elaboración: Proyecto

En el Cuadro 7.4. se presenta información del agua recogida en un pantano de Chanduy. Este importante lugar supone un referente extremo del medio ambiente del proyecto debido a su cercanía al mar, sin embargo se trata de una agua de buena calidad para agricultura.

En la estación San Gabriel, finalmente, se tomaron muestras de suelo y de agua para análisis de laboratorio, con los resultados que constan en la Cuadro 7.5. El balance iónico del agua se encuentra en los mismos niveles que en Chanduy y se considera de calidad buena para agricultura. Asimismo las concentraciones de N y MO en el suelo son bajas, aunque la configuración de cationes reproduce una CIC (Capacidad de Intercambio Catiónico) indicativa de buena fertilidad.

Cuadro 7.4. Resultados de los análisis de agua de Chanduy

Zona\ Características	pH	Cond. eléctrica (mcmhos/cm)	Ca ⁺⁺ (meq/L)	Na ⁺ (meq/L)	Mg ⁺⁺ (meq/L)	K ⁺ (meq/L)	CO ₃ H ⁻ (meq/L)	SO ₄ ⁻⁻ (meq/L)	Cl ⁻ (meq/L)	RAS	PSI
Chanduy	6.2	249	0.51	1	0.59	0.39	2	0.31	0.18	1.35	0.75

Clase CI S1 = Agua de buena calidad
Análisis y elaboración: Proyecto

MO = Materia Orgánica
CIC = Capacidad de Intercambio Catiónico
CE = Conductividad Eléctrica
RAS = Relación de Absorción de Sodio
PSI = Porcentaje de Sodio Intercambiable

Cuadro 7.5. Resultados de análisis de suelo y agua de la estación San Gabriel (Daule)

Suelo	Agua		
Ph	7.9	pH	7.3
Conductividad Eléctrica, CE (mmhos)	0.7	CE (mhos)	250
Materia Orgánica, MO (%)	1.3	CATIONES	
Nitrógeno, N (%)	0.08	Ca ⁺⁺ (meq/L)	0.90
Capacidad Intercambio Catiónico, CIC (meq/100g)	29	Mg ⁺⁺ (meq/L)	0.74
K (meq/100g)	0.32	Na ⁺ (meq/L)	0.86
Ca (meq/100g)	29.9	K ⁺ (meq/L)	0.10
Mg (meq/100g)	6.7		
P (ppm)	7.5	ANIONES	
Fe (ppm)	8.1	CO ₃ H ⁻ (meq/L)	2.10
Mn (ppm)	0.9	SO ₄ ⁻⁻ (meq/L)	0.20
Zn (ppm)	1.9	Cl ⁻ (meq/L)	0.36
Cu (ppm)	3.9	CLASE C ₂ S ₁	Buena

En las zonas de estudio y en los sectores aledaños al sitio experimental se pudo establecer que la ecología se encuentra afectada por prácticas agrícolas inapropiadas en las labores de preparación del suelo, así como por el uso de fertilizantes químicos y plaguicidas. El uso inapropiado de maquinaria agrícola ha contribuido a abatir los niveles de producción en varias zonas arroceras, debido a la destrucción de la estructura

natural de las arcillas, aumento de la compactación y creación de zonas químicamente reducidas.

La compactación reduce los niveles de oxígeno afectando las reacciones redox asociadas a la actividad microbiana. La disminución de la población microbiana y la desactivación del suelo, impiden un comportamiento eficiente de los microorganismos en la actividad química y bioquímica y en los procesos de solubilidad de nutrientes.

Asimismo debido a los continuos programas empíricos de aplicación de fertilizantes químicos y plaguicidas, que nacen de la iniciativa de los expendedores de agroquímicos, sin tomar en consideración lo que ofrece el suelo y los requerimientos que demanda el cultivo, los suelos arroceros presentan desbalances nutricionales lo mismo que disminución de la población microbiana (macrofauna-flora, mesofauna y microfauna), afectando así los procesos físicos, bioquímicos y fisiológicos que ocurren normalmente en el suelo. En 5 gramos de suelo fértil, no afectado por el uso de químicos, se pueden encontrar alrededor de 50 nemátodos, 62 000 algas, 72 000 amebas, 111 000 hongos, 3 000 000 de actinomicetos y 25 000 000 de bacterias dispuestas a colaborar con la nutrición y el bienestar de las plantas (Rolando, 2003).

7.3. CONOCIMIENTO Y COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS Y REQUERIMIENTOS DE LAS AZOLLAS NATIVAS Y DE UNA AZOLLA INTRODUCIDA (RECOMENDADA POR IRRI) EN CULTIVO A NIVEL DE INVERNADERO

EVALUACIÓN DE ESPECIES NATIVAS E INTRODUCIDAS

En el Cuadro 7.6 se incluye información resumida de la evolución de las azollas introducidas de Filipinas hasta septiembre del 2003. En general estas azollas no se aclimataron al medio local, puesto que murieron, la primera a los 4 días de llegada y la 6ta a los 161 días. La de mayor duración remontó los 430 días. La descripción a detalle de este de este evento se presenta en el documento INTRODUCCIÓN DE AZOLLA DE FILIPINAS-IRRI (Anexo. Productos: Documentos Científicos).

Cuadro 7.6. Evolución de las variedades de *Azolla* del IRRI

Azolla variedad	Fecha	Observación	Sobrevivencia (d)
Microphylla 4030	26-1g-02	No resistió la tensión del viaje	4
Microphylla 4021	16-oc-02	No se adaptó a las condiciones de clima	54
Microphylla 4018	4-nv-02	No se adaptó a las condiciones de clima	72
Caroliniana 3514	20-fb-03	Aceptaron propagación en piscinas pero fueron muy susceptibles al ataque de renacuajos	149
Microphylla 4024	26-fb-03	Aceptaron propagación en piscinas pero fueron muy susceptibles al ataque de renacuajos	155
Caroliniana 3001	4-mz-03	Aceptaron propagación en piscinas pero fueron muy susceptibles al ataque de renacuajos	161
Microphylla 4504	sp-03	Se mantiene en buen desarrollo	430+

Con el propósito de dominar el cultivo en invernadero de las azollas nativas e introducidas, se efectuaron análisis de base de suelo de las piscinas P1-P5 de propagación (ESPOL), con los resultados se presentan en la (Cuadro 7.7).

Cuadro 7.7. Resultados de análisis de suelos del ensayo de propagación

Parámetro	Piscina P1	Piscina P5
pH	6.6	6.3
N (ppm)	12	12
P (ppm)	5	4
S (ppm)	8	9
K (meq/100ml)	0.17	0.15
Ca (meq/100ml)	25	25
Mg (meq/100ml)	8	8
B (ppm)	0.02	0.02
Materia Orgánica, MO (%)	0.8	0.8
Textura	Franco arenoso	Franco arenoso

De estos análisis se concluyó que los suelos de las piscinas tenían bajos contenidos de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K) y materia orgánica (MO). Asimismo la textura franco-arenosa del suelo no era favorable para un buen desarrollo del cultivo, porque no permitía retener el agua en las piscinas. Por esto, la propagación se continuó añadiendo a las piscinas superfosfato triple (60 kg/ha) y muriato de potasio (30 kg/ha) y colocando en el fondo de cada piscina una lámina plástica que evitó que el agua se filtre. Otra mejora del desarrollo de las azollas se consiguió techando las piscinas P1 a P4. Los problemas surgidos, como se han descrito en el numeral 6.3, tuvieron que ver principalmente con el crecimiento competitivo de algas.

Un mejor desarrollo de las azollas se consiguió con la aplicación del producto de origen japonés denominado EM (Microorganismos Eficientes). El producto se preparó dejando reaccionar por 10 días 1 L de solución madre de EM con 1 L de melaza y 18 L de agua libre de cloro. Seguidamente se añadieron 20 L de melaza y 180 L de agua, dejando encubar esta mezcla por 10 días más, con lo cual estuvo lista para su utilización. Las piscinas tratadas con EM exhibieron unas azollas de saludable coloración verde característica de esta planta, y por otro lado el EM logró controlar las algas verdes.

El trabajo de propagación efectuado a nivel de las piscinas P1-P5 se presenta en el Cuadro 7.8, en donde constan los tipos de azolla, las fechas de siembra y la productividad de las azollas en las fechas de cosecha, en toneladas frescas por hectárea y mes (t/ha/m). En la Foto 21 (Anexo) se muestran las azollas con estos tratamientos.

Cuadro 7.8. Evolución de la propagación de azolla con EM frente a una testigo sin EM

Fecha	Piscina P1-Nativa (EM)	P2-Nativa (EM)	P3 -Nativa (Testigo)	P4-IRRI (EM)	P5-Nativa (EM)
27 ag-02					Siembra
23 sp-02	Siembra	Siembra			
16 oc-02			Siembra	Siembra	
22 nv-02	11 t/ha/m		4.66 t/ha/m		
	Siembra		Siembra		
29 nv-02		5.87 t/ha/m			
3 dc-02				5.87 t/ha/m	
				Siembra	
17 dc-02	18.87 t/ha/m				10.76 t/ha/m
18 dc-02		14.29 t/ha/m			
19 dc-02			5.66 t/ha/m		
27 dc-02				2.29 t/ha/m	

La información del Cuadro 7.8 muestra el efecto benéfico del EM, consiguiéndose en todo caso mayor producción con la *Azolla* nativa que con la *Azolla* introducida (*microphylla* 4504); la azolla sin EM (P3-testigo) mostró menos productividad así como aspecto clorótico.

El desarrollo satisfactorio de las azollas tratadas con EM, se manifestó principalmente en el alto contenido foliar de nitrógeno y potasio (Cuadro 7.9) y se debió a las mejoras de las propiedades del suelo que se aprecian en el Cuadro 7.9 y del agua (Cuadro 7.10), desde el punto de vista agrícola. Los análisis de muestras se realizaron después que se había concluido un primer ciclo de comparación del tratamiento con EM y sin él.

Cuadro 7.9. Resultados de análisis de suelos y foliar de azolla del ensayo con EM

	Suelo		Material Foliar	
	Piscina P3 (Testigo)	Piscina P1 (EM)	Piscina P1 (EM)	
pH	7.3	7.3	N (%)	5.02
CE (mmho)	0.35	3.98	P (%)	0.35
MO (%)	0.5	2	K (%)	4.30
N (%)	0.03	0.12	Ca (%)	0.46
CIC (meq/100g)	61.5	48.2	Mg (%)	0.84
K (meq/100g)	0.54	1.05	Zn (ppm)	70
Ca (meq/100g)	32	26.5	Cu (ppm)	31
Mg (meq/100g)	29.7	27.4	Fe (ppm)	488
P (ppm)	12.1	18.3	Mn (ppm)	635
Fe (ppm)	32.5	65.6		
Mn (ppm)	28.5	194.3		
Zn (ppm)	1.1	3.6		
Cu (ppm)	2.8	9		
N-NH ₄ (ppm)	15.3	4.4		
N-NO ₃ (ppm)	46.5	35		

Cuadro 7.10. Resultados de análisis de agua después del tratamiento con EM

Parámetro	Piscina P3 (Testigo)	Piscina P1 (EM)
pH	7.6	7.5
CE (µmhos)	480	920
CATIONES		
Calcio, Ca ⁺⁺ (meq/L)	2	3.34
Magnesio, Mg ⁺⁺ (meq/L)	1.84	4.96
Sodio, Na ⁺ (meq/L)	0.61	0.80
Potasio, K ⁺ (meq/L)	0.18	0.28
Amonio, NH ₄ ⁺ (meq/L)	4.63	9.38
ANIONES		
Bicarbonato, CO ₃ H ⁻ (meq/L)	3.4	5
Sulfato, SO ₄ ⁻⁻ (meq/L)	0.23	2.22
Cloruro, Cl ⁻ (meq/L)	1.0	3.20
Nitrato, NO ₃ ⁻ (meq/L)	4.63	10.42
CLASE	C ₂ S ₁ (Buena)	C ₃ S ₁ (Condicionada)

ESTABLECIMIENTO DE ENSAYOS DE AZOLLA (INOCULACIÓN)

Las azolla recolectada se inoculó a la solución nutritiva Hoagland-40 para adaptarla al laboratorio, produciendo en todos los casos buenos resultados. Con el conocimiento de

los elementos macro y micronutrientes que intervienen en la solución nutritiva completa Hoagland-40, se consideró importante investigar el desarrollo de la planta ante la falta de algún elemento de los señalados, con el supuesto de que el ambiente contiene estos elementos. El Cuadro 7.11 contiene la evolución de los pesos obtenidos y la productividad conseguida en distintos medios de cultivo. En este cuadro se puede observar que la ausencia de varios elementos nutritivos en el medio de cultivo no afecta al desarrollo de la azolla, excepto en el caso de ausencia del Fe, Mn, K y Mg, donde la productividad es menor a la promedia general de 20 t/ha/m. Estos resultados hacen suponer que nuestro medio ambiente (agua y suelo) contienen algunos micronutrientes en cantidades apropiadas para el desarrollo de la *Azolla*. Los detalles de este experimento se presentan en el documento EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE MICRO Y MACRO ELEMENTOS NUTRIENTES EN EL DESARROLLO DE AZOLLA-ANABAENA (Anexo. Productos: Documentos Científicos).

Cuadro 7.11. Evolución del peso y productividad a diferentes medios de cultivo

Medio cultivo	Peso (g) 8-my	Peso (g) 15-my	Peso (g) 22-my	Peso (g) 29-my	Peso (g) 05-jn	Productividad (t/ha/m)
Sin Zn	2.4	8.3	16.2	63.3	154.3	36.46
Sin B	2.4	8.0	22.9	76,5	153.2	36.19
Sin Mo	2.4	8.7	16.0	63.5	146.3	34.54
Sin Co	2.4	6.3	14.7	65.6	142.0	33.50
Completo	2.4	5.3	13.6	56.3	132.2	31.15
Sin Cu	2.4	8.4	16.6	64.3	129.0	30.38
Sin Ca	2.4	8.7	13.9	46.8	124.5	29.30
Sin Cl	2.4	4.1	7.7	35.5	94.1	22.01
Sin P	2.4	4.0	7.8	29.3	82.8	19.30
Sin Fe	2.4	5.1	8.7	30.3	69.2	16.03
Sin Mn	2.4	2.9	4.6	18.4	55.5	12.74
Sin K	2.4	5.4	7.6	15.4	23.2	4.99
Sin Mg	2.4	8.0	7.3	6.5	0.2	-0.52

RESULTADOS DEL FUNCIONAMIENTO DEL AZOLLARIO Y PISCINAS

El azollario permitió la fase siguiente de pruebas de propagación de las azollas después de que se adaptaron al laboratorio. Las plantas mostraron diferente desarrollo dependiendo de la ubicación dentro del azollario. Empleando suelo de los sitios de muestreo se observó que el de Yaguachi permitió a la azolla mantener por más tiempo su coloración verde natural. De acuerdo al análisis, este suelo tuvo alto contenido de materia orgánica, nitrógeno y fósforo.

El desarrollo general de la *Azolla* en el azollario mejoró ostensiblemente cuando se colocó una cubierta de paja, para evitar la incidencia directa de los rayos solares. Un experimento destinado a determinar la iluminación y productividad a distintas condiciones de sombra se presentan en las Figuras 7.2 y 7.3. En conclusión se estableció que el mejor crecimiento de la *Azolla* ocurre alrededor del 50 % de sombra, es decir a una intensidad luminosa media diaria de 400 foot-candles.

Figura 7.2. Luminosidad promedio diaria a distintos niveles de sombra

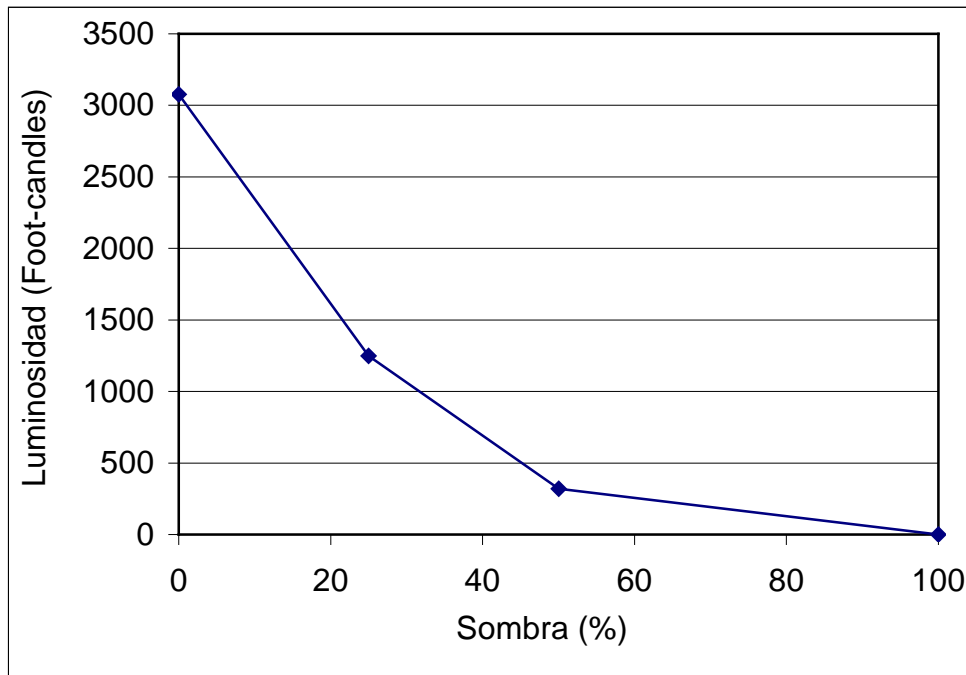
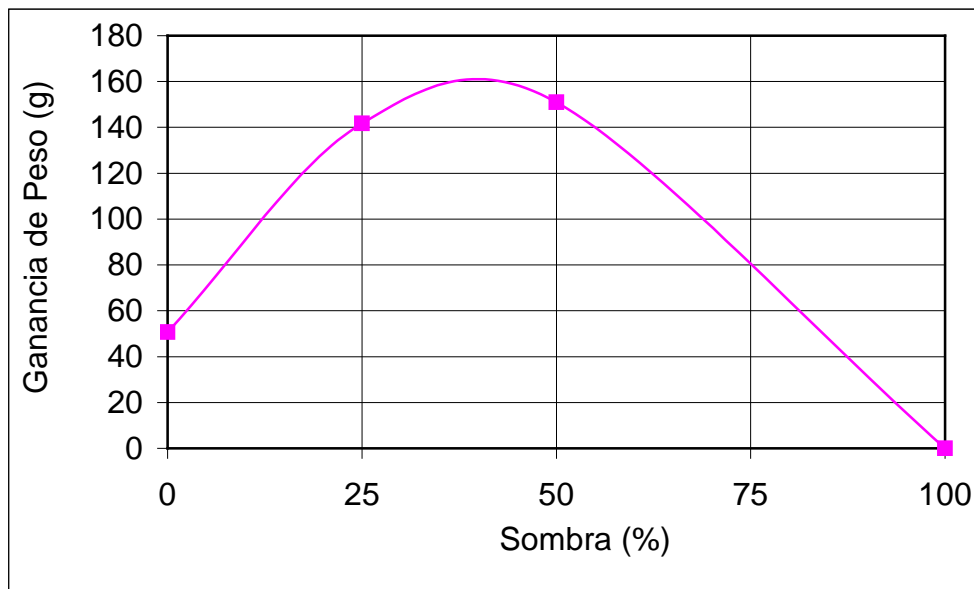


Figura 7.3. Aumento de biomasa a distintas luminisidades



Por otro lado las piscinas construidas en el sector del azollario (Anexo. Foto 22) presentaron inicialmente problemas de filtración por lo que se optó por colocar un plástico en el fondo. Esto produjo buen resultado y se adoptó como práctica de trabajo.

7.4. DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO DE LAS AZOLLAS A NIVEL DE LABORATORIO

ANÁLISIS BROMATOLÓGICO Y CROMATOGRÁFICO

Los análisis bromatológicos por el método Kjeldhall en tejido foliar dieron 7.02 % (ESPOL-ICQ) y 5.02 % (INIAP-Bolicho) de nitrógeno, que representa un 37.5 % de proteína. Estos datos equivalen ideal y aproximadamente a la fijación por parte de la Azolla de 600 kgN/ha/a. Estos resultados concuerdan con estudios de cepas de azolla capaces de acumular en su biomasa aproximadamente un 8 % de N (Navas et al., 2000). Asimismo un perfil de aminoácidos de azolla nativa de invernadero desarrollado en los laboratorios del INIAP-Santa Catalina dio los resultados que se muestran en la Cuadro 7.12.

Cuadro 7.12. Perfil de aminoácidos de azolla nativa de invernadero

Aminoácido	%
Acido aspártico	2.14
Treonina	0.93
Serina	0.94
Acido glutámico	2.75
Prolina	0.88
Glicina	1.23
Alanina	1.52
Valina	1.18
Metionina	0.29
Isoleucina	0.92
Leucina	1.67
Tirosina	0.70
Fenilalanina	1.16
Histidina	0.45
Lisina	0.89
Arginina	1.10
Triptofano	0.42

Los resultados presentados constituyen pruebas indirectas de fijación de nitrógeno. Investigaciones sobre fijación biológica de nitrógeno de distintos microorganismos reportan valores en el rango de 60 a 770 kg/ha/a (Campillo et al., 2003; Baca et al., 2000; Navas et al., 2000; Urquiaga et al., 1992).

No se consiguió implementar la técnica cromatográfica para determinar la fijación de nitrógeno, a pesar del esfuerzo desplegado en esta dirección. La expectativa de este análisis partió de la existencia del cromatógrafo Shimadzu del Instituto de Ciencias Químicas (ICQ) que finalmente no produjo resultados; posteriormente se integró al trabajo un equipo Hewlett Packard prestado por la Compañía PERLISA, en donde no se logró separar etileno de acetileno; por su lado la Compañía AGA probó varias mezclas de etileno-acetileno en un equipo Perkin Elmer, sin que se separen satisfactoriamente. Resta por trabajar en el ajuste de la tecnología para que, en primer lugar se separe etileno de acetileno en el análisis, y en segundo lugar, se barra una gama extensa de

concentraciones relativas de estos componentes, que permita inferir con certeza la reacción de fijación de nitrógeno.

7.5. PRODUCCIÓN MASIVA DE LA AZOLLA MÁS EFICIENTE EN CRECIMIENTO Y FIJACIÓN, A NIVEL DE PISCINAS EXPERIMENTALES EN EL CAMPO

EVALUACIÓN PERMANENTE DE MUESTRAS PERIÓDICAS

Nivel de invernadero-laboratorio

La producción de la azolla nativa fluctuó entre 36.46 t/ha/m cuando se propagó en bandejas con la solución Hoagland eliminado Zn, hasta 4.99 t/ha/m eliminado K, en el mismo experimento (Cuadro 7.11). Utilizando EM hubieron producciones de 18.87 t/ha/m en el mejor de los casos y de 5.87 t/ha/m, en el peor (Cuadro 7.8). Las azollas del IRRI, aplicándoles EM, rindieron desde 2.29 hasta 5.87 t/ha/m (Cuadro 7.7).

Nivel de campo. Prueba cualitativa

A nivel de campo, en la estación San Gabriel, la *Azolla caroliniana* nativa nuevamente mostró el mejor desarrollo. La *Azolla microphylla* 4504 que tuvo el mejor crecimiento inicialmente en el invernadero, no prosperó en San Gabriel.

Un experimento subsiguiente se realizó para evaluar la respuesta de la *Azolla caroliniana* nativa a distintos tratamientos de fertilización. Dichos tratamientos contuvieron, en kg/ha, los componentes N-nitrógeno, P₂O₅-Superfosfato Triple, K₂O-Muriato de Potasio y MO-Materia Orgánica, en las cantidades que se indican en el Cuadro 7.13. Para cada tratamiento se probaron 4 réplicas, distribuidas al azar en el campo de experimentación. Como resultado se halló que el mejor aspecto y coloración verde oscura intensa correspondió a la aplicación de 5 000 kgMO/ha representada por estiércol de ganado. De otro lado las azollas que no recibieron fertilizantes (0-0-0-0) mostraron una pronunciada clorosis.

Cuadro 7.13. Pruebas de fertilización de azolla en el campo

Tratamiento (kg/ha)	Réplica				Suma	Xprom
	a	b	c	d		
N-P ₂ O ₅ -K ₂ O-MO						
0-60-80-0	2	2	2	2	8	2
50-60-80-0	3	2.5	2	2.5	10	2.5
100-60-80-0	2.5	2	2	2	8.5	2.1
0-0-0-0	1	1.5	1	1	4.5	1.1
0-0-0-5000	4	4	4	4	16	4
0-60-80-5000	4	4	4	4	16	4

Escala arbitraria

- | | |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Malo (Clorótico) | 3. Bueno (Ligeramente clorótico) |
| 2. Regular (Medianamente clorótico) | 4. Muy Bueno (Normal) |

Por las evaluaciones, aunque someras, que anteceden se concluye que el mejor crecimiento de la azolla se produce utilizando sólo materia orgánica representada por estiércol de ganado.

Nivel de campo. Prueba cuantitativa

Los resultados de producción obtenidos en el experimento de tipo Factorial Exploratorio, sin réplicas, se presentan en el Cuadro 7.14, en el cual las columnas de tratamientos indican la presencia (1) o no (0) de insecticida (I) y fertilización con fósforo (P), nitrógeno (N) o materia orgánica (MO).

Cuadro 7.14. Producción de *Azolla* a distintos tratamientos. Diseño factorial exploratorio

Prueba	Tratamientos				Producción de <i>Azolla</i> (t/ha/m)	
	I	P	N	MO	Nativa	Introducida
1	0	0	0	0	4.98	5.91
2	0	0	0	1	19.67	16.17
3	0	0	1	0	1.92	5.75
4	0	1	0	0	15.05	20.20
5	1	0	0	0	12.71	8.30
6	0	0	1	1	2.08	1.03
7	0	1	0	1	19.97	17.42
8	1	0	0	1	18.15	26.29
9	0	1	1	0	21.01	16.68
10	1	0	1	0	6.19	6.81
11	1	1	0	0	21.55	27.00
12	0	1	1	1	27.66	18.58
13	1	1	0	1	24.23	28.77
14	1	0	1	1	45.87	31.94
15	1	1	1	0	31.09	22.06
16	1	1	1	1	33.63	47.31

Los análisis estadístico de los resultados se muestra en los Cuadros 7.15 y 7.16.

Cuadro 7.15. Análisis de la varianza para el rendimiento

Tratamiento	Cuadrado Medio	Prueba Fisher (F)	Probabilidad	Significancia Estadística (SE)
Azolla (A)	0.95911	0.02	0.8910	ns
Insecticida (B)	988.124	19.96	0.0004	**
Nitrógeno (C)	34.5281	0.70	0.4159	ns
Materia Orgánica (D)	717.826	14.50	0.0015	**
Fósforo (E)	995.026	20.10	0.0004	**
A*B	7.66361	0.15	0.6992	ns
A*C	34.1138	0.69	0.4186	ns
A*D	0.12005	0.00	0.9613	ns
A*E	5.44500	0.11	0.7444	ns
B*C	213.005	4.30	0.0545	ns
B*D	249.761	5.05	0.0392	*
B*E	12.1032	0.24	0.6277	ns
C*D	54.1320	1.09	0.3112	ns
C*E	92.5480	1.87	0.1904	ns
D*E	134.890	2.73	0.1183	ns
A*B*C*D*E	49.4969			

ns = no significativo

* $p = 0.05$ Significativo

** $p \leq 0.01$ Altamente Significativo

Cuadro 7.16. Análisis de las medias de los tratamientos significativos

Tratamiento	Aplicación	Resultado (t/ha/m)
I	0	13.380
	1	24.494
MO	0	14.201
	1	23.673
P	0	13.361
	1	24.513
I O	0 0	11.438
	0 1	15.322
	1 0	16.964
	1 1	32.024

De acuerdo al análisis de la varianza de los resultados experimentales se concluye lo siguiente:

- No se observó diferencia estadística significativa ($p = 0.05$) en producción, entre las azollas nativa e introducida.
- Entre los tratamientos de utilización o no de fósforo (P) y materia orgánica (MO) en el experimento se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas

($p = 0.01$). La presencia en niveles adecuados P y MO influyeron definitivamente en el crecimiento de la *Azolla*.

- (c) La aplicación del insecticida Actelit (I) produjo elevada mejora ($p = 0.01$) en el rendimiento de las azollas.
- (d) La presencia de nitrógeno no tiene significación en el rendimiento de las azollas. La materia orgánica (MO), de acuerdo a ese análisis, estaría compuesta de elementos distintos del nitrógeno.
- (e) Como se presenta en el Cuadro 7.16, la interacción I-MO en relación a rendimiento alcanzó niveles significativos ($p = 0.05$). A bajos niveles de materia orgánica el insecticida Actelit mejoró el rendimiento ligeramente, con mayor presencia de MO y sin I no se observó mejora en rendimiento, sin embargo al aplicar I la respuesta fue significativa.
- (f) No se observó efecto de sinergismo entre N y MO, así como entre P y MO, y entre N y P.
- (g) La producción promedio o rendimiento fue de 18.94 t/ha/m.

7.6. APLICACIÓN DE AZOLLA AL CULTIVO DE DOS VARIEDADES INIAP DE ARROZ MAS UTILIZADAS EN LA ZONA Y DETERMINACION DE LA EFICIENCIA DE AZOLLA SOBRE LA BASE DE UN ESTUDIO DE RENDIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ARROZ

DESARROLLO EXPERIMENTAL DE UTILIZACIÓN DE AZOLLA EN EL CULTIVO DEL ARROZ

Fase Invierno

Los resultados obtenidos de rendimiento expresado en toneladas por hectárea (t/ha), macollamiento en macollos/planta y espigamiento en espiguillas/m², así como la evaluación estadística con la prueba de Duncan se presentan en el Cuadro 7.17. El Cuadro 7.18 muestra el cuadrado medio y la significancia estadística de los resultados indicados.

Cuadro 7.17. Rendimiento, macollamiento y espigamiento del arroz. Cultivo de invierno

Subtratamiento	Rendimiento (t/ha)			Macollamiento (macollos/planta)			Espigamiento (espiguillas/m ²)		
	INIAP 12	INIAP 14	Prom	INIAP 12	INIAP 14	Prom	INIAP 12	INIAP 14	Prom
	Testigo	3.89	4.99	4.44c	19	21	20ab	1936	2351
100 kg N-Urea/ha	4.35	4.99	4.67c	19	22	21ab	2068	2348	2208c
40 000 kg AF/ha+50 kg N-Urea/ha	4.34	5.85	5.10c	21	22	22a	2052	2753	2403c
20 000 kg AF/ha+ 50 kg N-Urea/ha	3.71	5.03	4.37c	20	23	22a	1882	2395	2139c
20 000 kg AF/ha	6.15	6.42	6.29b	19	22	21ab	2974	3084	3029b
40 000 kg AF/ha	7.06	7.77	7.42a	18	19	19b	3304	3447	3376a

AF = Azolla fresca

Promedios con igual letra son estadísticamente iguales ($p=0.05$) de acuerdo a Duncan.

Cuadro 7.18. Valores estadísticos de rendimiento, macollamiento y espigamiento (Invierno)

Fuente de variación	Rendimiento			Macollamiento		Espigamiento	
	GL	CM	SE	CM	SE	CM	SE
Bloque	3	0.98	ns	5.04	ns	55595	ns
Variedad	1	10.29	ns	48.40	ns	1557496	ns
Error a	3	1.55		4.86		529442	
Subtratamiento	5	11.90	*	16.24	*	2214745	*
Variedad*subtratamiento	5	0.43	ns	7.82	ns	103212	ns
Error b	30	0.22		3.21		63960	
Total	47						
CVb (%)			11		8.6		9.9

ns = no significativo

* = significativo

GL = grados de libertad

SE = significancia estadística

CM = cuadrado medio

(a) Evaluación del rendimiento

La prueba de Duncan indica que no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.05$) entre las variedades de arroz INIAP 12 e INIAP 14.

En relación a los subtratamientos, la aplicación de 40 t/ha de azolla fresca contribuyó a producir un rendimiento de 7.42 t/ha, el cual resultó superior estadísticamente a los demás subtratamientos. De igual forma la abonadura con 20 t/ha de azolla fresca, alcanzó un promedio de 6.49 t/ha de arroz paddy, valor estadísticamente superior a los

cuatro restantes. La combinación de 20 t/ha de azolla con 50 kg/ha de N-Urea, la fertilización de 100 kg Urea/ha y el testigo resultaron estadísticamente iguales ($p=0.05$), lo que se debería a la características de alta CIC (Capacidad de Intercambio Catiónico) del suelo donde se llevaron a cabo los experimentos.

(b) Evaluación del macollamiento

El análisis de los subtratamientos para la variable macollos por planta indica que fueron estadísticamente iguales ($p= 0.05$) la fertilización convencional y el testigo; asimismo la fertilización combinada de azolla de 20 y 40 t/ha con 50 kg/ha de nitrógeno fueron estadísticamente iguales ($p= 0.05$).

Igualmente se observó que el abonamiento con 40 t/ha de azolla fresca fue estadísticamente inferior ($p= 0.05$) al efecto producido por la combinación de 40 t/ha de azolla y 50 kg de N/ha.

(c) Evaluación del espigamiento

El abonamiento con 40 t/ha de azolla fresca incrementó el número de espiguillas por metro cuadrado en las variedades de arroz, siendo este valor estadísticamente superior a los subtratamientos restantes ($p=0.05$).

El mismo efecto se observó pero en menor proporción, con la aplicación de 20 t/ha de azolla fresca cuyo valor superó estadísticamente a los subtratamientos combinados de azolla con nitrógeno, a la fertilización convencional y al testigo.

La fertilización combinada de azolla y nitrógeno, la fertilización convencional y el testigo se comportaron estadísticamente igual a la probabilidad de $p=0.05$.

Fase Verano

Los resultados del trabajo de cultivo de verano y evaluaciones se presentan en los Cuadros 7.19 y 7.20.

Cuadro 7.19. Rendimiento, macollamiento y espigamiento del arroz. Cultivo de verano

Subtratamiento	Rendimiento (t/ha)			Macollamiento (macollos/planta)			Espigamiento (espiguillas/m ²)		
	INIAP	INIAP	Prom	INIAP	INIAP	Prom	INIAP	INIAP	Prom
	12	14		12	14		12	14	
Testigo	4.16	4.35	4.26ns	31	30	31ns	4496	5374	4935ns
100 kg N-Urea/ha	4.20	3.88	4.04ns	30	26	28ns	4629	4399	4514ns
40 000 kg AF/ha+50 kg N-Urea/ha	4.70	4.03	4.37ns	30	30	30ns	5094	4792	4943ns
20 000 kg AF/ha+ 50 kg N-Urea/ha	4.79	4.00	4.39ns	33	29	31ns	5254	5230	5242ns
20 000 kg AF/ha	3.71	4.09	3.90ns	29	28	29ns	4461	5051	4756ns
40 000 kg AF/ha	3.69	4.45	4.07ns	31	29	30ns	4674	4865	4770ns

Cuadro 7.20. Valores estadísticos de rendimiento, macollamiento y espigamiento (Verano)

Fuente de variación	Rendimiento			Macollamiento		Espigamiento	
	GL	CM	SE	CM	SE	CM	SE
Bloque	3	0.53	ns	28.58	ns	225946	ns
Variedad	1	0.07	ns	426.02	ns	404021	ns
Error a	3	0.87		154.69		988216	
Subtratamiento	5	0.31	ns	77.99	ns	475419	ns
Variedad*subtratamiento	5	0.76	ns	3.32	ns	439214	ns
Error b	30	0.79		67.83		865879	
Total	47						
CVb (%)	21			33		46	

(a) Evaluación del rendimiento

De acuerdo con la prueba de Duncan, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.05$) entre las variedades de arroz INIAP 12 e INIAP 14 utilizadas en el experimento.

No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.05$) entre los diferentes subtratamientos utilizados en el experimento.

(b) Evaluación del macollamiento

No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.05$) entre los diferentes tratamientos utilizados en el experimento. Tampoco se encontró diferencias significativas entre las variedades de arroz INIAP 12 e INIAP 14.

(c) Evaluación del espigamiento

No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.05$) entre los diferentes tratamientos utilizados en el experimento. Tampoco se encontró diferencias significativas entre las variedades de arroz INIAP 12 e INIAP 14.

7.7. TRANSFERENCIA DE INFORMACION A ARROCEROS Y AGRÓNOMOS. DIFUSION DE RESULTADOS DE ESTA INVESTIGACIÓN Y CAPACITACION AL AGRICULTOR PARA EL EMPLEO DE LA AZOLLA

La transferencia y difusión del proyecto tuvo los siguientes resultados:

- (a) *Informativos ESPOL*. En dos informativos que publica la ESPOL (27 abril 2001, 8 agosto 2002) se presentó al público relacionado con la ESPOL el proyecto Azolla-Anabaena y su ejecución.

- (b) *Publicación*. “Muestreos del helecho Azolla e identificación de la presencia o ausencia en los diferentes sitios visitados”. Boletín del centro de investigación Científica Tecnológica (CICYT). Septiembre 2002, N° 10.
- (c) *Publicación*. “En el cultivo del arroz, aplican azolla-anabaena como abono verde”. EL AGRO noviembre 2002, N° 78. Esta publicación fue resultado de ESPOL-CIENCIAS 2002.
- (d) *CD de cultivo de Arroz-Azolla*. El CD contiene el resumen del trabajo realizado en la estación experimental del campo (San Gabriel-Plan América-Daule). En él se puede observar la propagación del helecho en las piscinas del campo y su posterior aplicación como bioabono en el cultivo del arroz. El contenido de este CD está dirigido a personal técnico, profesionales y estudiantes.
- (e) *Revista Azolla. Manual de cultivo de Azolla*. El material que está incluido en esta revista va dirigida a personal técnico, profesionales y estudiantes. Su contenido entrega fundamentos de biología de la azolla (ontogenia, reproducción, taxonomía), así como las características climáticas, factores físicos, simbiosis con la cianobacteria *Anabaena azollae*, fijación, uso como bioabono y fertilización para el helecho.
- (f) *Folleto gráfico*. Este folleto está dirigido (Anexo Final) a campesinos y agricultores de arroz conteniendo de una manera sencilla la descripción de la azolla y su utilización en la fertilización del arroz.
- (g) *Productos: Documentos Científicos*. Diez documentos de esta clase dirigidos a académicos, asesores agrícolas se incluyen en el Anexo Final de este Informe Técnico y se listan a continuación:

1. Distribución y muestreo *Azolla Anabaena* en el Ecuador.
2. Uso de extractos vegetales como repelentes orgánicos.
3. Evaluación del cultivo de azolla en el campo.
4. Evaluación de la influencia de micro y macro elementos nutrientes en el desarrollo de *Azolla-Anabaena*.
5. Evaluación de la intensidad de luz en el crecimiento de azolla.
6. *Azolla* de Filipinas del centro internacional de investigación de arroz (IRRI). Ensayos de adaptación.
7. Parque de cultivo de azolla en la ESPOL-Instituto de Ciencias Químicas (AZOLLARIO).
8. AZOLLA: biofertilizante de arroz. experimento San Gabriel.
9. Microorganismos Efectivos (EM, "Effective Microorganisms"). Desarrollo y aplicación al cultivo de azolla y arroz.
10. Preparación de muestras de *Azolla Anabaena* para herbario.

Días de Campo. Se realizaron dos con ocasiones de la cosecha invierno (1 de junio 2003) y cosecha verano (31 de diciembre 2003)

La primera tuvo como objetivo hacer la presentación del cultivo de arroz con Azolla, participando como invitados el grupo meta (GM), Cooperativa San Gabriel, Maestría en Agricultura Tropical Sostenible, ESPOL, Universidad Agraria del Ecuador, Medios de Comunicación, PROUNID y PROMSA (Anexo. Fotos 23 y 24)

El segundo día de campo se realizó a la cosecha del arroz contando con la participación de alumnos de la Universidad Agraria del Ecuador, PROUNID y la Cooperativa San Gabriel.

Tesis de grado: Se desarrollaron dos tesis de grado directamente incorporadas al proyecto, una de Maestría en Agricultura Tropical Sostenible (Tejada Elisa) y otra de Ingeniería Comercial y Empresarial especialización Finanzas (Franco Imer). En el primer caso, este proyecto del área de investigación agropecuaria enlazó con otro proyecto que impulsó PROMSA en el área académica. Este trabajo representa un elemento de difusión sobre todo en sector docente e investigativo.

Con la tesis AZOLLA ANABAENA COMO UN ABONO ALTERNATIVO EN LA PRODUCCION DE ARROZ EL LITORAL ECUATORIANO. ANALISIS ECONOMICO-FINANCIERO (Franco Imer, 2003), el sector empresarial encontrará los juicios de soporte para invertir.

Una tesis indirectamente relacionada con el proyecto fue una de Acuicultura (ESPOL) titulada “Estudio preliminar comparativo de la eficiencia de la *Azolla sp.* En la alimentación del híbrido rojo de tilapia en la etapa de precría” (Recalde Renato, 2004). En este trabajo se encuentran otras aplicaciones económicamente útiles de la *Azolla*.

8. SITUACIÓN INICIAL Y SITUACIÓN FINAL DEL GRUPO META

8.1. SITUACIÓN INICIAL

El concepto de Grupo Meta (GM) que se manejó en el proyecto hacía referencia a todo pequeño productor de arroz de inundación, con fincas menores a 10 ha. Por otro lado el proyecto buscó un prototipo de GM que llenara algunas requisitos, como: (a) dar cabida al desarrollo de pruebas experimentales de cultivo de arroz con el bioabono *Azolla*; (b) disponer de infraestructura para esta finalidad (terreno, acceso, sistemas de provisión y drenaje de aguas); (c) estar localizado cerca de Guayaquil y en una zona típica de agricultura de inundación de arroz, que pueda recibir transferencia de conocimientos y técnicas mientras se realizan los experimentos; y (d) ser un grupo flexible, receptivo y abierto.

El GM de referencia con las características señaladas fue ubicado en la Cooperativa San Gabriel de Daule, constituyendo el grupo de participación directa en el desarrollo experimental del proyecto y en su transferencia. Durante el proceso de ejecución del proyecto se han producido varios cambios en el grupo, que inicialmente presentó algunas características, como se mencionan en las Memorias del Primer Foro Técnico del cultivo del arroz en las provincias del litoral ecuatoriano (Rolando, 2003). Entre estas características se incluyen:

- *Falta de organización.* Este inconveniente fundamental empieza por la inseguridad jurídica que se deriva de no contar con escrituras de propiedad de los terrenos. Le siguen los préstamos de usura, los intermediarios, la ausencia de infraestructura y la ausencia de ahorro y de créditos, entre otros. Si bien estos problemas no tienen que ver directamente con la parte técnica del cultivo, sin embargo lo rozan de todas maneras.
- *Baja competitividad.* Los agricultores adolecen de baja competitividad principalmente por el desconocimiento de la naturaleza de su actividad y de técnicas aplicables a los distintos segmentos del ciclo de producción y comercialización del arroz.
- *Elevada y muchas veces incorrecta utilización de plaguicidas y fertilizantes.* Estas prácticas no han considerado principalmente la recuperación del recurso suelo y la protección del agua y de la salud de las personas. Esta situación ha generado, entre otros problemas, desequilibrios en las poblaciones de insectos benéficos y contaminación del ambiente en general.
- *Bajo índice de producción de arroz.* En el mejor de los casos el rendimiento de arroz se ha ubicado en 3.75 t/ha por cosecha en la zona de ubicación del GM de referencia.
- *Desconocimiento de la existencia y bondades de la Azolla.* Ha habido un desconocimiento absoluto de la *Azolla* entre los agricultores. Algunos testimonios recogidos de los sectores de muestreo indicaron que la consideraban incluso una maleza y por tanto procuraban deshacerse de ella aplicándole herbicida.

8.2. SITUACIÓN FINAL

Cabe resaltar que el grupo de agricultores de San Gabriel (Daule) recibió atención del Componente de Transferencia de Tecnología Agropecuaria (CTTA) del PROMSA. En este sentido, la ejecución de este proyecto, apalancó de forma adicional las acciones del CTTA, produciéndose los siguientes cambios:

- *Mejor organización.* La programación del proyecto coadyuvó a consolidar la organización, principalmente por las reuniones de planificación, el cumplimiento de trabajos y el fortalecimiento de los roles de autoridad y de subordinación.
- *Conocimiento de la Azolla y mejora de competitividad.* El dominio del manejo de azolla y su utilización en abonamiento de arroz le ha provisto al grupo meta referencial de elementos de especial competitividad. La *Azolla* comienza a conocerse, distinguirse, apreciarse y utilizarse, con ventajas económicas y de todo género frente a los fertilizantes químicos comerciales.
- *Manejo ambiental amigable del cultivo de arroz.* Los agricultores relacionados con la ejecución de este proyecto han añadido al uso de bioles, EM, repelentes naturales y bocachi, el de *Azolla*. Con ésta se proyecta cubrir un amplio espectro de aplicaciones ambientales amigables, en relación al suelo, el agua, los microorganismos y la química agrícola.
- *Mejora del rendimiento de arroz.* En el grupo meta de referencia de San Gabriel, el rendimiento de arroz con fertilización de *Azolla* produjo en el mejor de los casos, 7.77 t/ha en la cosecha de invierno y 4.45 t/ha en la cosecha de verano.

9. ESTIMACIÓN DE EFECTOS E IMPACTOS

9.1. TECNOLÓGICOS

Desarrollo de recursos. Al parecer el uso de los agroquímicos tradicionales en el campo ha afectado la expansión de la *Azolla*. Pero debido a las buenas condiciones del suelo, agua y clima del país, es posible desarrollar este recurso hasta conseguir stocks. La *Azolla Anabaena* constituye un recurso estratégico para la agricultura y el país. Este recurso se tiene que desarrollar dentro de una política de estado, como repetidamente lo manifestó el Dr. Francisco Carrapiço, asesor internacional del proyecto, constatando la aptitud de la Costa para este propósito. Este proyecto constituyó un paso de inicio demostrando que existe el recurso y que se puede desarrollarlo.

Agricultura orgánica. Se puede usar para el arroz y para la agricultura en general al helecho *Azolla* como fertilizante orgánico.

Otros paquetes tecnológicos. Basados en *Azolla* se puede dirigir esta actividad a la preparación de piensos para chanchos, patos y peces. A este respecto se han llevado a cabo dos tesis de acuicultura (ESPOL) relacionadas con balanceados de peces a base de *Azolla*. Asimismo se pueden encontrar aplicaciones de *Azolla* en colorantes vegetales, en extractos de ácidos grasos y en la construcción de sistemas de filtros para depuración de aguas residuales.

9.2. ECONÓMICOS

Sustitución de la urea. El mercado nacional de la urea en arroz es de unos US\$ 6 millones anuales. *Azolla Anabaena* sustituyendo alternativamente este fertilizante producirá ventajas económicas para el país. De acuerdo a la tesis de Ingeniería Comercial y Empresarial-ESPOL de Franco (2003) la producción de *Azolla Anabaena* es un negocio rentable

Externalidades positivas. El beneficio económico ambiental del uso de la *Azolla* se puede contabilizar, y de hecho debería tomarse en cuenta en la evaluación de los proyectos relacionados con *Azolla*.

9.3. SOCIALES

El desarrollo del cultivo de *Azolla Anabaena* activa el trabajo y la participación de los campesinos de la Costa, produciendo beneficios en los cultivos. Esta actividad, aún a escala industrial, es un negocio rural, ya que las piscinas de cultivo de *Azolla* solo se pueden establecer en zonas rurales. Se evita de este modo la emigración del campo.

Nuevos negocios. Sobre todo en áreas no explotadas de agricultura integral y nuevos productos pueden dar cabida a un empresariado joven, creativo y con motivaciones actuales. Es esta perspectiva pueden abrirse positivas expectativas sociales.

9.4. AMBIENTALES

Mantenimiento de la fertilidad de los suelos. Es un hecho reconocido que la *Azolla* produce materia orgánica rica en nitrógeno que mantiene la fertilidad de los suelos así como la textura, debido a las ligaduras químicas con las partículas de arcilla (OTA, 1985).

Supresión del crecimiento de malezas acuáticas. El crecimiento de la *Azolla* cubriendo el espejo de agua de los arrozales evita el uso de herbicidas para el control de malezas (Nierzwicki-Bauer, 1990). Esto representa un impacto positivo en la conservación de la calidad del agua y del medio ambiente.

Evitar la contaminación del agua subterránea. Los nitratos utilizados como abono son muy ineficientes, alrededor de un 50 % no se incorporan a las plantas y quedan en el suelo donde una parte se filtra a los mantos de agua subterránea contaminándolos (www.nap.edu). La *Azolla* en su función de abono evita este problema.

Efecto invernadero. Los nitratos de la fertilización química que quedan en el suelo se denitrifican en parte a óxido nitroso (N₂O) al que se le atribuye, junto con el CO₂, la responsabilidad del efecto invernadero (www.nap.edu). La *Azolla* no tiene este problema ya que produce un nitrato natural altamente asimilable. Además fabricas de urea emiten CO₂.

9.5. GENERO

El cultivo de *Azolla* está fuertemente ligada a la cuestión de género. El trabajo de mantener la *Azolla* y aplicarlas al cultivo de arroz o la crianza de animales puede ser encargado a mujeres, niños y ancianos, es decir personas que permanecen en el hogar. De esa manera la sociedad como un todo y a largo plazo obtiene beneficios de esta actividad. Puede citarse como ejemplo que en Napo existen criaderos de tilapia en donde los niños son normalmente encargados de su alimentación con *Azolla*.

10. PRODUCTOS DEL PROYECTO

10.1. DOCUMENTOS TÉCNICOS

Se produjeron 10 documentos técnicos que se incluyen en un solo cuerpo como anexo final. Se encuentran detallados en el numeral 7.7.g de este informe, en donde se indica la temática y la audiencia.

10.2. AFICHE

Un afiche conteniendo el resumen del proyecto se presentó en la ESPOL con motivo evento ESPOLCIENCAS del 2002. También se presentó en la Feria Agropecuaria de Durán en octubre-2002.

10.3. VIDEO

Se preparó un video (CD) general de presentación de la *Azolla*. Se incluye como anexo final.

10.4. BOLETINES Y ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

En el numeral 7.7 de este informe se detallan los boletines, que se listan a continuación.

- Informativos ESPOL (2)
- Revista EL AGRO (1)
- Boletín del Centro de Investigación Científica Tecnológica (CICYT) (1)

10.5. MANUAL DE CULTIVO DE AZOLLA

- Revista *Azolla*. Se incluye como anexo final.

10.6. FOLLETO GRÁFICO

- Es un folleto con caricaturas, y se incluye como anexo final.

10.7. TESIS

Franco Magues Imer, 2003. *Azolla-Anabaena* como un abono alternativo en la producción de arroz en el Litoral Ecuatoriano. Análisis Económico-Financiero, Tesis del Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas, Ingeniería Comercial y Empresarial, especialización Finanzas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil.

Tejada Elisa, en ejecución. Utilización de *Azolla* en el cultivo de arroz. Maestría en Agricultura Tropical Sostenible, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil.

10.8. CAPACITACION

- Cooperativa San Gabriel. 14 agricultores con conocimiento sobre la *Azolla*.
- Profesionales técnicos. 9 de diferentes especializaciones (Agronomía, Química, Biología, Acuicultura, Economía).
- Maestranes de Agricultura Tropical Sostenible. 12 que recibieron un seminario del Dr. Carrapiço.

11. LOGROS ADICIONALES

11.1. CAPACITACIÓN INTERNACIONAL Y DESARROLLO DE CONTACTOS

Se recibió capacitación internacional de los siguientes expertos internacionales:

Dr. Francisco Carrapiço, Facultad de Biología, Universidad de Lisboa, Portugal. Se desempeñó como asesor internacional. Se anexa a este capítulo el informe de su asesoría (Anexo 11).

Dr. Eduardo Fernández Valiente, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid. Los temas abordados fueron: análisis de fijación de nitrógeno y utilización de *Azolla* en el cultivo de arrozales.

Dr. José Olivares, Estación Experimental de El Zaidín (CSIC, España). Brindó capacitación al proyecto a través de internet, principalmente en los temas: Biología de la *Azolla Anabaena* y Análisis de Reducción del Acetileno (ARA).

Ing. Teresa Ventura, IRRI. El Proyecto recibió capacitación y asesoría en la determinación de las cepas de *Azolla* y en el manejo de la donación de dichas especies del International Rice Research Institute-IRRI, Filipinas.

11.2. TESIS DE ACUICULTURA

Recalde Renato (2003). Estudio preliminar comparativo de la eficacia de la *Azolla sp.* en la alimentación del híbrido rojo de tilapia en la etapa de precría, Tesis de grado, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, ESPOL, Guayaquil.

Ordóñez Javier, en ejecución. Estudio comparativo del engorde del híbrido rojo de tilapia (*Oreochromis sp.*) utilizando dieta de *Azolla* y Soya, Tesis de grado, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, ESPOL, Guayaquil.

11.3. COLECCIÓN DE HERBARIO

Se prepararon muestras de *Azolla* con el fin de enviarlas a herbarios, incluyendo el Herbario de la Universidad Católica de Quito.

11.4. FORTALECIMIENTO DE RELACIONES INSTITUCIONALES

Este proyecto fue ejecutado en una unidad académica de Química (ICQ-ESPOL). Su desarrollo ha contribuido para establecer aplicaciones prácticas de este campo del conocimiento a problemas de agricultura. Por esto se han producido relaciones intrainstitucionales para trabajos colaborativos con la carrera de Agropecuaria (ESPOL).

Se fortalecieron los lazos de colaboración entre la ESPOL y la Universidad de Guayaquil, entre las áreas que manejaron proyectos PROMSA.

En San Gabriel (Daule), sitio de experimentación de cultivo de *Azolla* y arroz, convergieron y se apoyaron los dos componentes del PROMSA. Estuvieron, en la parte académica la realización de una tesis de Maestría en Agricultura Tropical Sostenible, en investigación el proyecto Azolla y en transferencia, PROMSA-TTA.

11.5. ADQUISICIONES

El Laboratorio de Cromatografía se fortaleció con distintas adquisiciones relacionadas con la ejecución del proyecto. Entre las principales se incluyen: Altímetro, Termómetro, GPS, Luxómetro, Anemómetro, pHmetro, Vidriería, Equipos de oficina (computadora, impresoras, xerocopiadora), Reactivos y materiales, y Bibliografía.

12. LIMITACIONES EN EL DESARROLLO DEL PROYECTO Y SOLUCIONES

Una limitación grande fue no poder efectuar las pruebas cromatográficas de fijación de nitrógeno. Esto, en todo caso, no impidió el desarrollo del cultivo experimental de arroz y azolla. Esta determinación puede permitir una comprensión más fina del funcionamiento del simbiote.

Este proyecto se puede considerar muy nuevo. No hay experiencia nacional sobre azolla. Esto contribuyó a que se trabaje casi constantemente en condiciones de prueba y error, que de otro lado produjo una alta inercia en el avance. El apoyo del PROMSA en la parte técnica y de la ESPOL en el manejo financiero fueron elementos clave de su éxito.

13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

13.1. CONCLUSIONES

La *Azolla* introducida del IRRI no prosperó a las condiciones ecológicas de la Costa.

En el Ecuador crecen de forma natural distintas especies de *Azolla Anabaena* aunque en pequeños afloramientos. La variedad que se encuentra en la Costa es *Azolla caroliniana*. Al parecer el uso de los agroquímicos en el campo como urea, herbicidas ha afectado su expansión. Pero debido a las buenas condiciones del suelo, agua y clima del país, es posible desarrollar este recurso hasta conseguir almacenamientos (stocks), permitiendo mejoras en la actividad agropecuaria y en la economía así como la protección del medio ambiente.

La *Azolla* nativa crece normalmente con fertilización de materia orgánica y manejando el parámetro intensidad de luz, al 50 % de la luz natural, y realizando control de plagas. Con buen cuidado, la productividad de la *Azolla* puede superar las 20 t/ha/mes de materia fresca (AF). En general la humedad de la *Azolla* es del 95 % y su contenido de nitrógeno es 5 % en base a muestra seca.

El uso de la *Azolla* como bioabono en el cultivo de arroz evita la contaminación ambiental, abarata costos de producción debido al bajo uso de fertilizantes químicos (Franco, 2003). El rendimiento económico de esta aplicación puede alcanzar altos niveles sobre todo si se ubican los nichos apropiados para esta actividad. Por ejemplo, el desarrollo de provisiones de *Azolla* fresca y paquetes tecnológicos de aplicación, representa una atractiva actividad.

Sembrar arroz de la variedad INIAP 12 o INIAP 14 con *Azolla* como fertilizante, sustituyendo completamente la urea, en la cantidad de 40 tAF/ha aumenta la producción de arroz del nivel de promedio mundial de 2.57 t/ha (Parson, 1988) a 7.42 t/ha, en el experimento de invierno. En verano los resultados son más dispersos y a la misma condición de abonamiento de invierno produce 2.82 t/ha.

Producir *Azolla* es un negocio rentable, produciendo una Tasa Interna de Retorno del orden de 50.60 % (Franco, 2003), lo que resulta mayor a la tasa de descuento del costo de capital.

A través de sencillos procedimientos técnicos se puede cultivar la *Azolla* para fines inicialmente agrícolas, pudiéndose extender su aplicación a alimentación animal, salud y tratamiento de residuos.

13.2. RECOMENDACIONES

Realizar otras pruebas experimentales con el fin de aclarar al mayor grado posible la certeza del rendimiento de arroz utilizando *Azolla* como fertilizante a lo largo de todo el año, y en los principales sitios de cultivo de arroz, como Samborondón, Yaguachi y Babahoyo. También se requiere estudiar diferentes métodos de aplicación de *Azolla* al cultivo de arroz.

Profundizar en el estudio biológico de la *Azolla Anabaena* nativa, con el fin de proponer otras alternativas de manejo y aplicación. En esto un tema que se recomienda estudiar a fondo es la reproducción; se conocen y se han detectado en el proyecto dos procesos: esporulación y fragmentación. Cada uno de ellos tiene sus especiales particularidades y aplicaciones.

Difundir la tecnología disponible. Para eso se necesitaría ejecutar un proyecto específico, para que el campesino agricultor arrocero acepte cultivar *Azolla* y la use.

14. LECCIONES APRENDIDAS

Llevar a cabo un proyecto siempre de cara al usuario (Grupo Meta) y con apoyo del intelecto nacional (Grupo de Referencia) ha sido la mejor lección. De esta forma los proyectos se transforman en realidades prácticas y se agranda la frontera de conocimientos de la sociedad.

Reconocer que las dificultades se superan hablando y encontrando acuerdos.

La administración de un proyecto llega a ser exitosa cuando se empata de manera ágil y sostenida a la infraestructura de las instituciones relacionadas con el proyecto.

Ha sido reconfortante conocer que hay un gran número de compatriotas profesionales concursando por la generación de conocimientos y aplicaciones tecnológicas que tanto hacen falta en el país.

Este trabajo ha representado un elemento peculiarmente positivo de mejoramiento personal y de la institución a la que se pertenece.

15. LITERATURA CONSULTADA

1. Arroz, 1988. Manuales para educación agropecuaria. Editorial Trillas, México.
2. Baca Beatriz Eugenia, Lucía Soto Urzua y Ma. Patricia A. Pardo Ruiz, 2000. Fijación biológica de nitrógeno, Elementos No. 38 Vol. 7, Puebla.
3. Campillo R, Ricardo and Urquiaga C, Segundo and Pino N, Inés and Montenegro B, Adolfo, 2003. ESTIMACIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS FORRAJERAS MEDIANTE LA METODOLOGÍA DEL 15N. *Agricultura Técnica (Chile)* 63(2):169-179, www.bioline.utsc.utoronto.ca.
4. Carrapiço Francisco, 1991. Are bacteria the bird partner of the Azolla-Anabaena symbiosis?. *Plant and Soil*, Netherland.
5. Carrapiço Francisco, Teixeira G., Diniz A., 2000. Azolla as a biofertiliser in Africa. A Challenge for the future. *Revista de Ciencias Agrarias*.
6. Carrapiço Francisco et al., 2001. Azolla as a Greenmanure. From the article Azolla as a biofertilizer in Africa. In press *Revista de Ciencia Agraria*, V 23.
7. Carrapiço Francisco, 2003. Comunicación personal, Reporte.
8. Fans, C.S. 1992. The biological nitrogen fixation system adapted in rice paddy fields in China. In *The Nitrogen Fixation and its Research in China*, edited by Guo-Fan Hong. Springer-Verlag Heidelberg, Germany.
9. Franco Magues Imer, 2003. "Azolla-Anabaena como un abono alternativo en la producción de arroz en el Litoral Ecuatoriano. Análisis Económico-Financiero", Tesis del Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas, Ingeniería Comercial y Empresarial, especialización Finanzas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil.
10. Gresshoff, Peter M., 1990. The importance of biological nitrogen fixation to new crop development. p. 113-119. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), *Advances in new crops*. Timber Press, Portland, OR.
11. GTZ-IICA-INIAP-CIAT, 2001. *Manual de Producción de Arroz de Calidad en el Ecuador*, Guayaquil.
12. Icaza Torres Luis, 1991. Respuestas a las aplicaciones de abonos orgánicos y minerales sobre el desarrollo de la azolla y efectos de su incorporación en el cultivo de arroz en la zona de Urbina Jado, Prov. Guayas, Universidad de Guayaquil.
13. INEC y Proyecto SICA-BM/MAG, 2001 - Ecuador (www.sica.gov.ec).
14. Jorgensen Peter M and Susana León-Yanez, 1999. *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*, NHBS Mailorder Bookstore UK, Missouri BG, USA 1181 pages.
15. Ladha, J.K. and P.M. Reddy, 1995. Extension of nitrogen fixation to rice: necessity and possibilities, *GeoJournal* 35.3: 363-372.

16. Lumpkin, T. & Walker, J., 1979. Azolla for Agriculture in the Americas, prepared for the Interamerican Development Bank 801 17th Street NY, Washington D.C.
17. National Academy of Science, 1979. Nitrogen fixing in microbial processes. Promising technologies for developing countries, Washington.
18. Navas Mariela, Ramón Gutiérrez y Evelín Cabrera de Bisbal, 2000. EVALUACION DE VARIAS CEPAS NATIVAS DE AZOLLA EN SUELOS VENEZOLANOS CON VOCACIÓN DE USO PARA EL CULTIVO DE ARROZ, *Agronomía tropical* 50(1):83-97. 2000. www.redpav-fpolar.info.ve.
19. Nierzwicki-Bauer, S.A. 1990 . Use of Azolla-Anabaena in Agriculture. A.N. Rai (ed.), Handbook of Symbiotic Cyanobacteria, CRC Press Inc., Boca Raton. pp. 119-136.
20. OTA (Office of Technology Assessment) 1985. *Innovative Biological Technologies for Lesser Developed Countries, Workshop Proceedings*, U.S. Congress, Washington, DC.
21. Palacios Anzules Italo, 1992. La azolla y sus usos como fuente nitrogenada en arroz (*Oriza sativa*) cultivado bajo condiciones de inundación, Prov. Guayas, Universidad de Guayaquil.
22. Peters G.A., 1986. Lichenes to Gunnera with emphasis on Azolla. *Plant Soil* 90, pp. 17-34.
23. Peters, G.A., 1983. The Azolla-Anabaena relationship Plant. Phys. Elsevier. Holanda.
24. Peters, G.A., 1985. Aspects of nitrogen and carbon interchange in the Azolla-Anabaena symbiosis. Elsevier Sc. Publ.
25. Ramírez Gaibor Hugo, 1986. Identificación de algas verdes azules fijadoras de nitrógeno en suelos inundados y sus efectos en el cultivo de arroz en la zona del subproyecto de Riego América, Prov. Guayas, Universidad de Guayaquil.
26. Roger, P.A. 1991. Reconsidering the utilization of blue-green algae in wetland rice cultivation. In *Biological Nitrogen Fixation Associated with Rice Production*, edited by S.K. Dutta and Charles Sloger. Howard University Press, Washington, DC.
27. Rolando Carlos (Editor), 2003. MEMORIAS DEL PRIMER FORO TECNICO DEL CULTIVO DEL ARROZ EN LAS PROVINCIAS DEL LITORAL, Consorcio Pronid-Proexant-Universidad de Florida-Idea, Componente de Transferencia de Tecnología Agropecuaria, PROMSA, Guayaquil.
28. SICA-BIRF/MAG, 2002. ARROZ Para que coma todo el mundo, www.sica.gov.ec.
29. Sprent, J.I., 1979. The biology of nitrogen fixing organisms. Mac-Graw-Hill, London.
30. Submaranian, G., 1986. Sewage Utilization and Waste Recycling by Cyanobacteria, *Indian J. Env. Hlth.* Vol. 28.
31. Urquiaga, S., Cruz, K.H.S., Boddey, R.M. *Soil Sci Soc Am J* 56: (1) 105-114 (1992).

32. Watanabe Iwao, 2000. Biological Nitrogen Fixation and its Use in Agriculture, JICA, Cantho University, www.asahi-net.or.jp.
33. Yoneyama, T., 1987. Nodule bacteroid in Anabaena. Natural nitrogen enrichment in the legum rhizobium and Azolla-Anabaena symbiotic system, Journal of Plant Physiology, V127.
34. Zimmermann, B.J. 1987. Growth, nitrogen fixation and mass cultura of Anabaena Azolla. Biotech. Vol 9, No.1.
35. www.inamhi.gov.ec, Características generales del clima en el Ecuador.
36. www.fao.org, El arroz es vida.
37. www.nap.edu, Biological Nitrogen Fixation, Global Investment and Research Needs.

15. LITERATURA CONSULTADA

1. Baca Beatriz Eugenia, Lucía Soto Urzua y Ma. Patricia A. Pardo Ruiz, 2000. Fijación biológica de nitrógeno, Elementos No. 38 Vol. 7, Puebla.
2. Campillo R, Ricardo and Urquiaga C, Segundo and Pino N, Inés and Montenegro B, Adolfo, 2003. ESTIMACIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS FORRAJERAS MEDIANTE LA METODOLOGÍA DEL 15N. *Agricultura Técnica (Chile)* 63(2):169-179, www.bioline.utsc.utoronto.ca.
3. Carrapiço Francisco, 1991. Are bacteria the bird partner of the Azolla-Anabaena symbiosis?. Plant and Soil, Netherland.
4. Carrapiço Francisco, Teixeira G., Diniz A., 2000. Azolla as a biofertiliser in Africa. A Challenge for the future. *Revista de Ciencias Agrarias*.
5. Carrapiço Francisco et al., 2001. Azolla as a Greenmanure. From the article Azolla as a biofertilizer in Africa. In press *Revista de Ciencia Agraria*, V 23.
6. Carrapiço Francisco, 2003. Comunicación personal, Reporte.
7. Fans, C.S. 1992. The biological nitrogen fixation system adapted in rice paddy fields in China. In *The Nitrogen Fixation and its Research in China*, edited by Guo-Fan Hong. Springer-Verlag Heidelberg, Germany.
8. Franco Magues Imer, 2003. “Azolla-Anabaena como un abono alternativo en la producción de arroz en el Litoral Ecuatoriano. Análisis Económico-Financiero”, Tesis del Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas, Ingeniería Comercial y Empresarial, especialización Finanzas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil.
9. Gresshoff, Peter M., 1990. The importance of biological nitrogen fixation to new crop development. p. 113-119. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), *Advances in new crops*. Timber Press, Portland, OR.
10. GTZ-IICA-INIAP-CIAT, 2001. *Manual de Producción de Arroz de Calidad en el Ecuador*, Guayaquil.
11. Icaza Torres Luis, 1991. Respuestas a las aplicaciones de abonos orgánicos y minerales sobre el desarrollo de la azolla y efectos de su incorporación en el cultivo de arroz en la zona de Urbina Jado, Prov. Guayas, Universidad de Guayaquil.
12. INEC y Proyecto SICA-BM/MAG, 2001 - Ecuador (www.sica.gov.ec).
13. Jorgensen Peter M and Susana León-Yanez, 1999. *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*, NHBS Mailorder Bookstore UK, Missouri BG, USA 1181 pages.
14. Ladha, J.K. and P.M. Reddy, 1995. Extension of nitrogen fixation to rice: necessity and possibilities, *GeoJournal* 35.3: 363-372.
15. Lumpkin, T. & Walker, J., 1979. *Azolla for Agriculture in the Americas*, prepared for the Interamerican Development Bank 801 17th Street NY, Washington D.C.

16. National Academy of Science, 1979. Nitrogen fixing in microbial processes. Promising technologies for developing countries, Washington.
17. Navas Mariela, Ramón Gutiérrez y Evelín Cabrera de Bisbal, 2000. EVALUACION DE VARIAS CEPAS NATIVAS DE AZOLLA EN SUELOS VENEZOLANOS CON VOCACIÓN DE USO PARA EL CULTIVO DE ARROZ, *Agronomía tropical* 50(1):83-97. 2000. www.redpav-fpolar.info.ve.
18. Nierzwicki-Bauer, S.A. 1990 . Use of Azolla-Anabaena in Agriculture. A.N. Rai (ed.), Handbook of Symbiotic Cyanobacteria, CRC Press Inc., Boca Raton. pp. 119-136.
19. OTA (Office of Technology Assessment) 1985. *Innovative Biological Technologies for Lesser Developed Countries, Workshop Proceedings*, U.S. Congress, Washington, DC.
20. Palacios Anzules Italo, 1992. La azolla y sus usos como fuente nitrogenada en arroz (*Oriza sativa*) cultivado bajo condiciones de inundación, Prov. Guayas, Universidad de Guayaquil.
21. Parson David, 1988. Manuales para educación agropecuaria. ARROZ, Editorial Trillas, México.
22. Peters G.A., 1986. Lichenes to Gunnera with emphasis on Azolla. *Plant Soil* 90, pp. 17-34.
23. Peters, G.A., 1983. The Azolla-Anabaena relationship Plant. Phys. Elsevier. Holanda.
24. Peters, G.A., 1985. Aspects of nitrogen and carbon interchange in the Azolla-Anabaena symbiosis. Elsevier Sc. Publ.
25. Ramírez Gaibor Hugo, 1986. Identificación de algas verdes azules fijadoras de nitrógeno en suelos inundados y sus efectos en el cultivo de arroz en la zona del subproyecto de Riego América, Prov. Guayas, Universidad de Guayaquil.
26. Roger, P.A. 1991. Reconsidering the utilization of blue-green algae in wetland rice cultivation. In *Biological Nitrogen Fixation Associated with Rice Production*, edited by S.K. Dutta and Charles Sloger. Howard University Press, Washington, DC.
27. Rolando Carlos (Editor), 2003. MEMORIAS DEL PRIMER FORO TECNICO DEL CULTIVO DEL ARROZ EN LAS PROVINCIAS DEL LITORAL, Consorcio Prounid-Proexant-Universidad de Florida-Idea, Componente de Transferencia de Tecnología Agropecuaria, PROMSA, Guayaquil.
28. SICA-BIRF/MAG, 2002. ARROZ Para que coma todo el mundo, www.sica.gov.ec.
29. Sprent, J.I., 1979. The biology of nitrogen fixing organisms. Mac-Graw-Hill, London.
30. Submaranian, G., 1986. Sewage Utilization and Waste Recycling by Cyanobacteria, *Indian J. Env. Hlth.* Vol. 28.
31. Urquiaga, S., Cruz, K.H.S., Boddey, R.M. *Soil Sci Soc Am J* 56: (1) 105-114 (1992).

32. Watanabe Iwao, 2000. Biological Nitrogen Fixation and its Use in Agriculture, JICA, Cantho University, www.asahi-net.or.jp.
33. Yoneyama, T., 1987. Nodule bacteroid in Anabaena. Natural nitrogen enrichment in the legum rhizobium and Azolla-Anabaena symbiotic system, Journal of Plant Physiology, V127.
34. Zimmermann, B.J. 1987. Growth, nitrogen fixation and mass cultura of Anabaena Azolla. Biotech. Vol 9, No.1.
35. www.inamhi.gov.ec, Características generales del clima en el Ecuador.
36. www.fao.org, EL ARROZ ES VIDA.
37. www.nap.edu, Biological Nitrogen Fixation, Global Investment and Research Needs.

16. FECHA Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

Guayaquil,

.....
Mariano Montaña Armijos, Ing. Quím., MAE, Ph.D. (Candidate)
Investigador Principal

ANEXO

Unidades y símbolos

a	año
m	mes
d	día
t	tonelada
m ²	metro cuadrado
ha	hectárea
kg	kilogramo
g	gramo
meq	miliequivalente
t/ha/a	tonelada por hectárea por año



Foto 1. Corte histológico longitudinal



Foto 2. Borde células transparentes

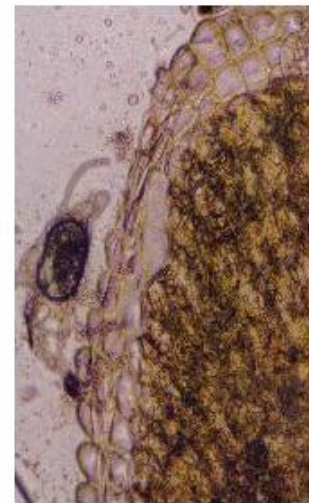


Foto 3. Células transparentes con aire

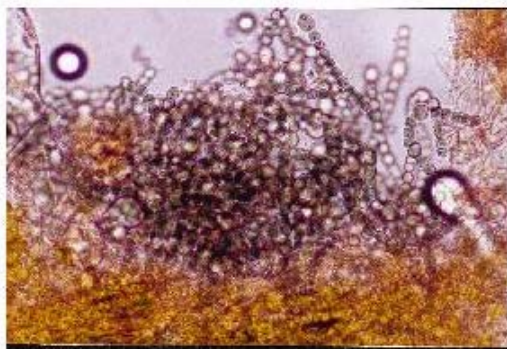


Foto 4. Filamentos del alga



Foto 5. Anabaena azollae-rosario.



Foto 6. Muestreo



Foto 7. Azolla con 50% de luz solar



Foto 8. Llegada Azola IRRI



Foto 9. Crecimiento de Azolla. Influencia del magnesio



Foto 10. Azollario-ESPOL



Foto 11. Bandeja con Azolla



Foto 12. Cultivo de Azolla. Coop. San Gabriel



Foto 13. Microphylla 4504



Foto 14. Cultivo de Azolla con materia organica



Foto 15. Cultivo de Azolla. Preparación de piscinas



Foto 16. Semillero



Foto 17. Incorporación de Azolla al cultivo de arroz



Foto 18. Siembra de arroz en parcelas



Foto 19. Control de plagas y malezas



Foto 20. Azolla en su medio natural



Foto 21. Azolla con uno de los tratamientos



Foto 22. Piscina del Azollario



Foto 1. Corte histológico longitudinal

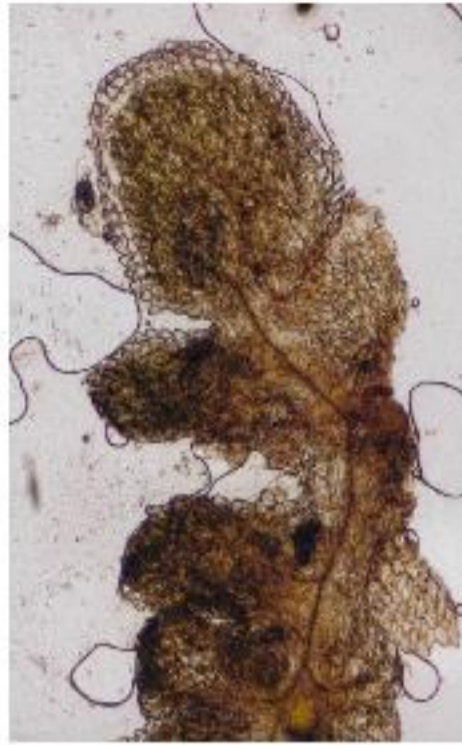


Foto 2. Borde células transparentes

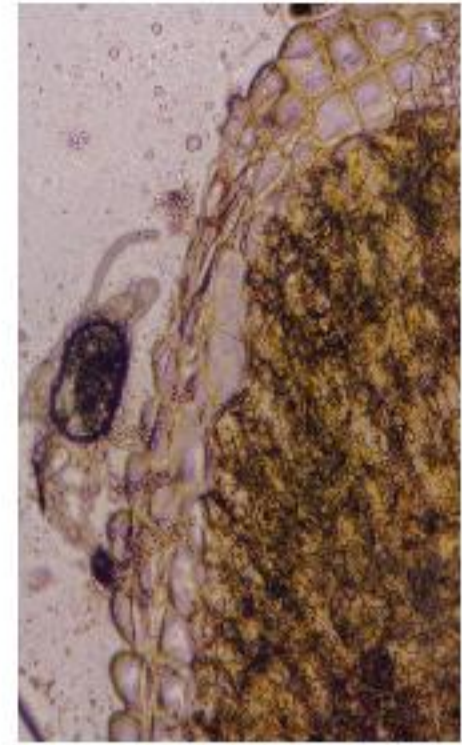


Foto 3. Células transparentes con aire

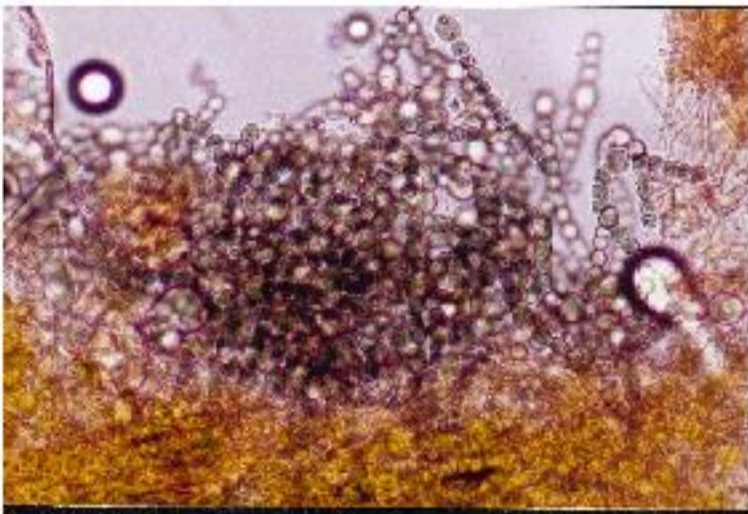


Foto 4. Filamentos del alga

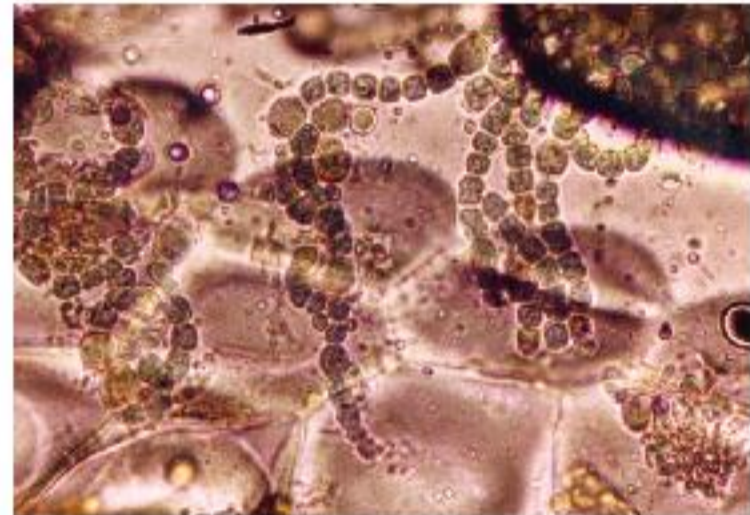


Foto 5. Anabaena azollae-rosario.



Foto 6. Muestreo



Foto 7. Azolla con 50% de luz solar

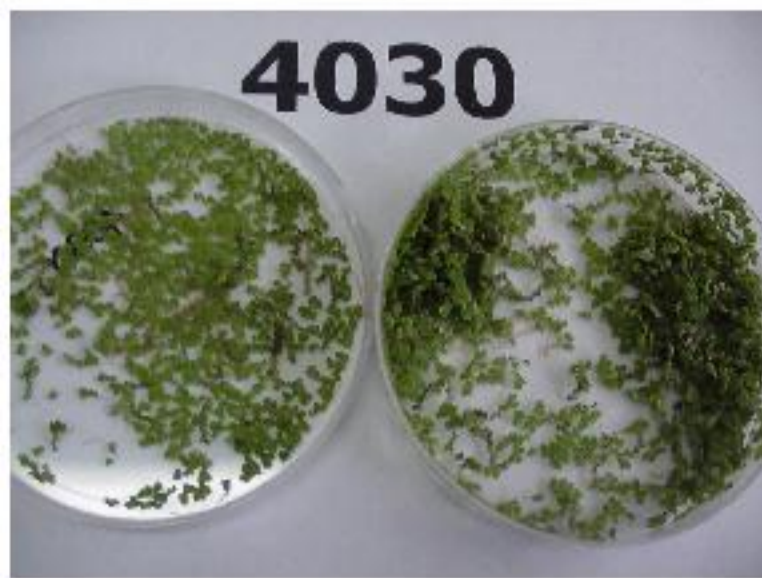


Foto 8. Llegada Azola IRRI



**Foto 9. Crecimiento de Azolla.
Influencia del magnesio**



Foto 10. Azollario-ESPOL



Foto 11. Bandeja con Azolla



**Foto 12. Cultivo de Azolla.
Coop. San Gabriel**



Foto 13. Microphylla 4504



**Foto 14. Cultivo de Azolla
con materia organica**



**Foto 15. Cultivo de Azolla.
Preparación de piscinas**



Foto 16. Semillero



Foto 17. Incorporación de Azolla al cultivo de arroz



Foto 18. Siembra de arroz en parcelas



Foto 19. Control de plagas y malezas



Foto 20. Azolla en su medio natural



Foto 21. Azolla con uno de los tratamientos



Foto 22. Piscina del Azollario



REPORT

Francisco José do Nascimento Carrapiço, Prof. of the Faculty of Sciences of the University of Lisbon, Portugal (FCUL) / Department of Plant Biology (DBV) and Researcher of the Centre of Environmental Biology (CBA) and International Scientific Consultant of Proj. A-A, has visited the Escuela Superior Politecnica del Litoral (ESPOL) in Guayaquil, Ecuador, from January 11th to the 19th 2003, as I was invited by the Coordinator of the Project "Aplicacion de la simbiosis diazotrófica entre *Azolla* y *Anabaena* como abono verde para el cultivo del arroz en Litoral Ecuatoriano", Eng. Mariano Montaña Armijos. During my stay it was possible to have contact with the reality and aims of the project, thus developing several theoretical as well lab workshops for researchers and representatives of public and private institutions studying the applicability of *Azolla-Anabaena*-bacteria symbiotic system. These workshops were namely focused on *Azolla* biology, on lab and field culture management and the use of this fern in rice culture. Likewise, other areas of applicability were developed, namely phytoremediation, in particular the domestic and industrial wastewater treatment.

As a scientific consultant, I was able to observe and assert the well structured and committed management of the project, both at a technical-scientific level, and at human resources level. The

Azolla-Anabaena system was adopted as the main object of study as a biological alternative or complement to the use of chemical fertilizers in rice culture. A problem associated with the use of chemical fertilizers is the adverse effects on long term soil fertility, soil productivity and environmental safety. A new strategy for increasing rice production, particular in developing countries should be taken into account for programmes to use the biofertilizers which will not only increase the rice productivity, but also improve the long term soil fertility. We must draw your attention to the fact that the *Azolla-Anabaena* system is the only fern-cyanobacteria association which presents agricultural interest for the nitrogen input that this plant can introduce in the fields and for this reason it has been used in several tropical and subtropical countries in different continents.

Ecuador presents adequate ecological and climatic conditions for the development of the genus *Azolla*. In the country four species are described:

1. *Azolla caroliniana* Willd.
2. *Azolla filiculoides* Lam.
3. *Azolla mexicana* C. Presl
4. *Azolla microphylla* Kaulf.

The species chosen by the Project team was *Azolla caroliniana* Willd., and confirmed by our lab, which is native of the Guayaquil region. This option was the correct one since it is the best species for local farmers to use and also to avoid stress environmental conditions. In conclusion, *Azolla* is a good option as a green fertilizer, namely in South-American countries that present a low cost of labour force. In industrial countries or regions, the potential of *Azolla* as a symbiotic nitrogen-fixing system should continue to be exploited for a more

developing environmentally-friendly agricultural system, namely, in particular segments of this important economical activity. Other uses of the *Azolla-Anabaena* system are now in progress, such as the control of aquatic weeds, the use as animal feed and the concentration of mineral elements, namely its use as biofilter in industrial and domestical effluents.

At last but not least, *Azolla* must be considered as an important natural resource and included in the sustainable Ecuador agricultural and industrial development strategies for the country in this century. To develop and implement this strategy we must reinforce the scientific knowledge on this symbiotic system and integrate it in the *curricula* of the Universities and Polytechnic Schools allowing the development and establishment of human and technical resources that are the main base for Ecuador's development in this area.

Lisbon, 14 December 2003

A handwritten signature in black ink that reads "Francisco Carrapico". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping underline.

Francisco J. Nascimento Carrapico, PhD
(CBA/DBV/FCUL)

email: f.carrapico@fc.ul.pt

Photos

