

**Evaluación de sustratos para la producción
de inoculantes de micorriza
vesículo-arbuscular**

Daniel Fernando Suárez Quimí

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Noviembre de 2001

Evaluación de sustratos para la producción de inoculantes de micorriza vesículo-arbuscular

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Daniel Fernando Suárez Quimí

Zamorano, Honduras

Noviembre de 2001

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

Daniel Suárez

Zamorano, Honduras
Noviembre de 2001

Evaluación de sustratos para la producción de inoculantes de micorriza vesículo-arbuscular

Presentado por

Daniel Suárez

Aprobada:

Pablo Emilio Paz, Ph. D.
Asesor Principal

Alfredo Rueda, Ph. D.
Coordinador de Área Temática

Juan Carlos Rosas, Ph. D.
Asesor

Jorge Iván Restrepo, M.B.A.
Coordinador, Carrera de
Ciencia y Producción Agropecuaria

Aracely Castro, M. Sc.
Asesor

Antonio Flores, Ph. D.
Decano Académico

Pablo Emilio Paz, Ph. D.
Coordinador PIA-Fitotecnia/CCPA

Keith L. Andrews, Ph. D.
Director General

DEDICATORIA

A **Dios** por haberme dado la fuerza suficiente durante mis estudios en Zamorano.

A mis queridos padres, Moisés Suárez y Nelly Quimí.

A mis queridos hermanos Eduardo y Jaime.

A mis tíos, Sonia, Edith, Delia, Winston y Daniel.

A mi querido abuelo Dámaso.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por estar a mi lado y hacer de mí una persona capaz de luchar contra los obstáculos que se me presentaron durante los años vividos en Zamorano.

A mis padres por su amor y comprensión en todo momento durante estos años.

A mis hermanos por haber confiado siempre en mí y por el apoyo incondicional en todo momento.

A Jessica Arreaga por ser una persona especial en mi vida y saberme comprender en todo momento.

A Jodie Darquea por ser amiga de toda la vida.

Al Dr. Pablo Paz por sus consejos y enseñanzas impartidas durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Juan Carlos Rosas por su tiempo y el apoyo en la conducción de este trabajo.

A la Ing. Aracely Castro por su tiempo, consejos, atención y comprensión prestada durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Erich Raddatz por el apoyo en la conducción de este trabajo.

A la Ing. Hilda Flores por su tiempo y sus consejos durante este año.

A los ingenieros Byron Reyes y Luwbia Aranda por su amistad y apoyo.

A Luis Danilo, Luis Alberto, Luis Fernando, Eli Roberto por su amistad durante estos cuatro años.

A Tomasa Colindres por su amistad y colaboración en el trabajo.

A los trabajadores del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) por su amistad.

A Zamorano por sus enseñanzas.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A Zamorano y al fondo RAPACO por el financiamiento parcial de mis estudios durante el Programa de Agrónomo.

A la Fundación Popenoe por la contribución realizada para llevar a cabo mis estudios en el Programa Agrónomo.

Al Monseñor John Moriarte por el financiamiento otorgado para continuar mis estudios en el Programa de Ingeniero Agrónomo (PIA).

A los señores Ing. Com. Walter Reyes, Sra. María Quimí, Ing Agr. Jimmy Candell, Econ. Eduardo Espinoza, por su ayuda brindada para culminar mis estudios.

Al Proyecto de Micorrizas del Área de Biotecnología Aplicada de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria de Zamorano, auspiciado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (Donación USDA/FAS/ICD No. 59-3148-1-014), por el apoyo brindado en la ejecución de esta investigación.

RESUMEN

Suárez Q., Daniel F. 2001. Evaluación de sustratos para la producción de inoculantes de micorriza vesículo-arbuscular. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 39 p.

En la actualidad, se buscan sistemas agrícolas que incluyan hongos que mejoren las características orgánicas y químicas de la micorrizósfera. Estos hongos pueden mejorar la eficiencia de los procesos biológicos en el suelo y en las plantas. El objetivo del estudio fue determinar una combinación apropiada de medio de crecimiento y sistema para la producción comercial de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular (MVA) de alta calidad, minimizando el uso de suelo agrícola y los costos. Los tratamientos evaluados para la producción de inoculante de micorriza consistieron en dos medios, uno compuesto por suelo rojo y suelo agrícola (SR:SA), y suelo rojo y arena (SR:A), ambos en proporción 3:1; tres niveles de fósforo (10, 30 ó 60 ppm) con o sin corrección de pH con cal (1 t/ha). El testigo consistió en la mezcla utilizada por Zamorano para la producción de Mycoral[®] compuesto por suelo agrícola más arena (SA:A) en la proporción 2:1. El material experimental fue *Brachiaria decumbens*. Se utilizó un diseño de parcelas sub-subdivididas. Las variables evaluadas fueron número de esporas, infección de las raíces y el peso de la biomasa a la cosecha. Los sustratos empleando suelo rojo tuvieron efectos similares entre ellos en el desarrollo del hongo y la infección de raíces, aunque presentaron diferencias en la producción de biomasa. La adición de cal a los sustratos no aumentó la producción de esporas ni la infección de raíces, y el incremento en el contenido de fósforo disminuyó la producción del hongo. La cal y el fósforo aumentaron la producción de biomasa, con incrementos mayores con la adición de fósforo. Debido a que la calidad del inóculo evaluado fue inferior al producto comercial Mycoral[®], no se justificó el análisis económico del producto experimentado.

Palabras claves: calidad, crecimiento, suelo rojo, suelo agrícola, sustrato, niveles de fósforo.

NOTA DE PRENSA

En búsqueda de un sustrato óptimo para producir micorrizas vesículo arbuscular a bajo costo

Las micorrizas (hongos benéficos) son organismos que forman asociaciones con las plantas brindando a éstas un sinnúmero de beneficios como resistencia a la sequía mejor, absorción de nutrimentos y resistencia al ataque de patógenos.

En Zamorano se realizó un estudio para lograr determinar un sustrato adecuado para el desarrollo del hongo. El estudio buscó una combinación apropiada de medio de crecimiento y sistema para la producción comercial de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular (MVA) de alta calidad minimizando, el uso de suelo agrícola y los costos.

El estudio comprendió dos sistemas en invernadero y en camas de bambú. Para la elaboración de los sustratos a estudiar se elaboraron dos mezclas, una de suelo rojo y suelo agrícola (SR:SA) en proporción 3:1 y la otra suelo rojo y arena (SR:A) en la misma proporción, evaluando al mismo tiempo tres niveles de fósforo (10 30 y 60 ppm), y la corrección de pH al suelo; se utilizó el pasto *Brachiaria decumbens* para evaluar el desarrollo del hongo. Las variables evaluadas fueron número de esporas, infección de raíz, y la biomasa del pasto.

Como resultado se obtuvo que el medio y la corrección de pH al suelo no tuvo mayor incidencia sobre el desarrollo del hongo en cuanto a la infección de raíz se refiere. Sin embargo, se encontró que éste si favoreció al incremento de la biomasa del pasto en ambos sistemas.

El nivel de fósforo, si influyó en el desarrollo del hongo logrando una mayor producción de esporas con el nivel más bajo de fósforo (10 ppm), mientras que con los dos niveles restantes de este elemento (30 y 60 ppm) la producción de esporas disminuyó. Por otro lado, con el nivel de fósforo alto se obtuvo la mayor cantidad de biomasa para el medio con la mezcla de SR:SA.

CONTENIDO

	Portadilla	i
	Autoría	ii
	Páginas de firmas	iii
	Dedicatorias	iv
	Agradecimiento	v
	Resumen	vi
	Nota de Prensa	vii
	Contenido	viii
	Índice de cuadros	ix
	Índice de anexos	xiii
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	GENERALIDADES	1
1.2.	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	2
1.3.	ANTECEDENTES	3
1.4.	JUSTIFICACIÓN	4
1.5.	OBJETIVOS	4
1.5.1.	General	4
1.5.2.	Específicos	4
2.	REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1.	MICORRIZAS	5
2.2.	LA AGRICULTURA Y LAS MICORRIZAS.....	5
2.3.	FUNCIONES DE LAS MICORRIZAS.....	7
2.2.1.	Absorción de nutrimentos.....	7
2.2.2.	Absorción de agua.....	8
2.2.3.	Estabilización del suelo.....	8
2.2.4.	Protección contra enfermedades.....	9
2.2.5.	Alteraciones fisiológicas.....	10
2.4.	PRODUCCIÓN DE INÓCULO.....	10

2.4.1	Slurries y geles	11
2.4.2.	Pellets.....	11
2.4.3.	Pellets de multise­millas.....	12
2.5.	POTENCIAL DE LA INOCULACIÓN	12
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1.	UBICACIÓN	13
3.2.	MATERIAL EXPERIMENTAL.....	13
3.3.	METODOLOGÍA	14
3.3.1.	Primera fase	14
3.3.2	Segunda fase.....	15
3.3.2.1	Tratamientos	15
3.3.2.2	Sistema de producción	15
3.3.2.3	Siembra	15
s3.4.	MUESTREOS Y VARIABLES.....	16
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
3.6.	ANÁLISIS ECONÓMICO.....	17
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1.	PRIMERA FASE	18
4.2.	SEGUNDA FASE	20
4.2.1.	Primer muestreo	20
4.2.1.1	Invernaderos	20
4.2.1.2	Camas de infección	20
4.2.2.	Segundo muestreo	22
4.2.2.1	Invernaderos	22
4.2.2.2	Camas de infección.....	25
4.4.	ANÁLISIS ECONÓMICO.....	27
5.	CONCLUSIONES.....	28
6.	RECOMENDACIONES.....	29
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
8.	ANEXOS.....	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Resumen de las características y diferencias entre endomicorrizas y ectomicorrizas.....	6
2.	Parámetros indispensables para la selección de un hongo micorrízico efectivo.....	12
3.	Mezclas de suelo y otros componentes empleados en la conformación del sustrato para la producción de inoculante micorrízico en Zamorano, Honduras, 2001.	14
4.	Cantidad requerida de fósforo para los tratamientos de las mezclas evaluadas para la producción de inoculante micorrízico. Zamorano, Honduras 2001.....	16
5.	Contenido de fósforo de mezclas de suelo y otros componentes empleados en la preparación de sustratos para la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.	18
6.	Análisis químico de tres mezclas de suelo rojo y suelo agrícola evaluadas como sustratos para la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.....	19
7.	Análisis físico-químico de las mezclas evaluadas como sustratos para la producción de inoculante de micorrizas. Zamorano, Honduras, 2001.	19

8.	Efecto del sustrato, aplicación de cal y de fósforo en el número de esporas, infección de raíces por vesículas e hifas en el primer muestreo en invernaderos y camas. Zamorano, Honduras, 2001.	21
9.	Efecto de los tres niveles de fósforo sobre el número de esporas en sustratos para la producción de inoculante de micorriza en invernadero. Zamorano, Honduras, 2001.	22
10.	Efecto de la interacción cal x fósforo en el porcentaje de infección de raíces por hifas en sustratos para la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.	22
11.	Efecto del sustrato, aplicación de cal y de fósforo en el número de esporas, infección de raíces por vesículas e hifas y peso de la biomasa en el segundo muestreo en invernaderos y camas de bambú. Zamorano, Honduras, 2001.....	23
12.	Comparación del efecto del fósforo sobre el número de esporas en el primer y segundo muestreo. Zamorano, Honduras, 2001.	24
13.	Efecto del fósforo sobre la producción de biomasa de <i>Brachiaria decumbens</i> en la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.....	24
14.	Efecto de la interacción entre el sustrato x aplicación de cal sobre el peso de la biomasa durante la producción de inoculante de micorriza en Zamorano. 2001.	24
15.	Efecto de la interacción cal x fósforo en el peso de la biomasa en la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.	25
16.	Efecto de los tres niveles de fósforo sobre el porcentaje de infección de raíces en la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras 2001.	26
17.	Efecto de los tres niveles de fósforo sobre el peso de la biomasa en la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.	26
18.	Efecto de la interacción cal x fósforo para el porcentaje de infección de la raíz en la producción del inoculante micorrízal en Zamorano, Honduras, 2001.....	26
19.	Efecto de la interacción sustrato x cal x fósforo en la infección de raíces por vesículas. Zamorano, Honduras, 2001.	27

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos

1.	Detalles experimentales	32
2.	Distribución de los tratamientos en las camas de producción de inóculo de micorrizas.....	33
3.	Distribución de tratamientos para la producción de inóculo de micorrizas en maceteros bajo invernadero.....	34
4.	Método para clarificar y teñir muestras de raíces.....	35
5.	Método para el aislamiento de esporas.....	37

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES

En la actualidad, la producción agrícola busca alternativas al uso intensivo de insumos inorgánicos y el desarrollo de sistemas que incluyan la contribución de organismos que mejoren las características orgánicas y químicas del suelo. Uno de estos organismos benéficos son los hongos micorrizales, los que pueden mejorar la eficiencia de ciertos procesos biológicos que ocurren tanto en el suelo como en la planta.

Las micorrizas son asociaciones entre hongos benéficos y raíces de plantas, que formando una simbiosis que puede generar beneficios para las plantas incluyendo un mejor crecimiento debido a la mayor absorción de agua y minerales, al estimularse el crecimiento de las raíces; mejor absorción de fosfatos y otros nutrimentos; mayor protección de los efectos tóxicos provocados por elevadas concentraciones de ciertos minerales; mejor agregación del suelo en torno a la raíz; mejor resistencia a la falta de agua y al exceso de sales; y mayor protección contra el ataque de parásitos. Recíprocamente, el hongo logra obtener nutrimentos (carbohidratos, iones y fosfatos) de la planta y un nicho ecológico protegido, completando un ciclo de natural interdependencia.

Las micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) están presentes en la mayoría de las plantas. Una vez establecidos, los cultivos funcionan como trampa en la cual ocurre la esporulación del hongo, etapa necesaria para su diseminación y sobrevivencia. Algunos factores ambientales que podrían limitar o impedir la esporulación son la alta fertilización; y los extremos de pH del suelo, de temperaturas y de la cantidad de agua disponible (Read *et al.*, 1992). Posteriormente y debido a su naturaleza simbiótica, el hongo forma una unión endógena con las raíces colonizándolas hasta generar hifas, que son estructuras externas a las plantas (Barea, 2001).

La existencia de estos hongos en el suelo hace que se produzcan una serie de interacciones con otros microorganismos que conviven en ese hábitat. La micorrizósfera es la rizósfera de una planta micorrizada, y en ella se producen las interacciones con microorganismos benéficos con funciones específicas, y con los patógenos (Hernández, 2001).

En la agricultura, la maximización de los beneficios de esta simbiosis incluye la producción de inoculantes de calidad, compuestos por cepas altamente infectivas y efectivas; y el manejo de prácticas de cultivo que no afecten la relación micro-macrosimbionte. La producción y distribución de inoculantes comerciales de hongos

MVA es muy reducida, lo que limita la disponibilidad de esta tecnología para los agricultores; y en los casos en que existe esta oferta en el mercado, no existe una alta demanda por que se desconocen sus beneficios o los precios son muy elevados.

Hasta el año 1991, en todo el mundo solo existían dos compañías comerciales productoras de inóculo de MVA; la empresa Native Plants Inc. (Salt Lake City, USA), que contaba con una producción anual de 35 metros cúbicos de suelo de inóculo de micorrizas a partir de un sistema de producción en potes, utilizados principalmente en la industria hortícola, cítricos, ornamentales, transplante de vegetales y árboles forestales y cultivos de follaje. La segunda era la compañía Jira-Agroindustrias Cia. & Ltda. (Tuluá, Colombia), que contaba con una producción anual de 150 toneladas de suelo de inóculo de micorrizas destinadas principalmente al uso hortícola y en viveros (Sieverding, 1991).

Los sistemas de producción de inoculantes de micorrizas se basan principalmente en materiales estériles y libres de patógenos que puedan afectar el desarrollo del inoculante, como la turba, vermiculita, perlita y arcilla expandida. Actualmente se están realizando investigaciones para utilizar métodos menos complicados con relación al manejo de volúmenes del sustrato, y que sean agronómica y económicamente eficientes en la producción del inóculo. Entre los principales métodos existentes que requieren un mayor manejo está la técnica de la película nutritiva (NFT), aeroponía y el cultivo *in vitro* de raíces transformadas (cultivos axénicos). Otros sistemas utilizados para la producción de inóculo son el de potes en invernaderos, camas a la intemperie y el de producción directa en el suelo, que actualmente esta desapareciendo.

1.2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Una de las principales objeciones para el uso agrícola de hongos micorrízicos está relacionada con la producción de inoculante de buena calidad, referida a la cantidad de propágulos infectivos y efectivos contenidos, y a su estado sanitario. Este sustrato puede ocasionar a las micorrizas ciertos trastornos en su desarrollo debido a factores del suelo como la textura, residuos de agroquímicos, altas concentraciones de fósforo y presencia de elementos pesados e hidrocarburos, entre otros, los que pueden afectar su calidad y efectividad (Ferrera-Cerrato, 2000).

Con relación al fósforo, su concentración en el suelo es variable y se encuentra mayormente en forma no disponible; sin embargo, la parte disponible puede inhibir el crecimiento y desarrollo de la micorriza, dependiendo de su concentración. En los sustratos para la producción de inoculante micorrízico, el contenido de materia orgánica de sus componentes debe ser moderado ya que esta posee altos niveles de fósforo que podrían afectar el crecimiento del hongo. El desarrollo de la micorriza es también afectado por altos contenidos de sales en la arena que se utiliza como componente del medio, por lo que esta debería lavarse para eliminar este exceso.

Factores como la acidez del suelo ayudan a regular la germinación de las esporas y parcialmente a explicar los diferentes grados de adaptación de las MVA a una amplia diversidad de suelos. El rango de pH para lograr el óptimo desarrollo de las micorrizas es

muy variado y depende del género de micorriza presente, sugiriéndose un pH de 6-8 para *Glomus* sp. y un pH de 5-6 para *Gigaspora* sp, que son dos géneros de las especies más importantes.

En la producción de inóculo es muy importante considerar el manejo del hongo, del hospedero y del sustrato o medio de crecimiento en que se va a desarrollar el hongo. En Zamorano, actualmente se utiliza como componente principal del sustrato suelo agrícola con bajo contenido de fósforo; sin embargo, este presenta algunos inconvenientes como el deterioro de la fuente cuando se manejan grandes volúmenes para su uso en una explotación agrícola.

El suelo agrícola es un componente indispensable en explotaciones productoras de inóculo comercial de micorriza y en Zamorano no es la excepción. Este componente requiere de una selección y manejo adecuados para lograr que el sustrato reúna las condiciones físicas y químicas adecuadas para el desarrollo del hongo, y a la vez se encuentre libre de microorganismos que pueden afectar su desarrollo normal.

1.3. ANTECEDENTES

Con el fin de maximizar los beneficios de la práctica de inoculación con micorrizas, es necesario obtener inóculo de primera calidad para ofrecer un producto de excelentes características y a un costo accesible para los agricultores.

El inóculo de Zamorano, MYCORAL[®], es producido en maceteros para facilitar su manejo y mantener la pureza de las cepas que lo componen. Sin embargo, este sistema presenta la desventaja de permitir generar únicamente bajos volúmenes de inóculo a un alto costo, por lo que también se está produciendo en un sistema de bancales construidos con caña de bambú, para permitir su oferta masiva y a menor costo. El inóculo producido por Zamorano actualmente esta disponible al mercado a razón de \$ 2.50 por kg de suelo micorrizado o inóculo, el cual contiene esporas, raíces infectadas por el hongo y otras estructuras fúngicas.

Adicionalmente, la producción de inoculante de MVA en Zamorano se realiza usando como sustrato un medio compuesto por suelo agrícola y arena en proporción 2:1, que dá como resultado un producto de muy buena calidad. Sin embargo, una de las metas principales en Zamorano es producir este inóculo reduciendo o eliminando el uso de suelo agrícola como componente principal del sustrato, con el fin de evitar la presencia de características no deseadas como residuos de plaguicidas y fertilizantes en el inóculo, y para evitar dañar características favorables en los terrenos de dónde se extrae este componente.

1.4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, los sistemas de producción de biofertilizantes micorrízicos se caracterizan por ser muy eficientes en el uso de materiales de primera calidad, logrando obtener un inóculo con las características requeridas como son la facilidad de manejo, alta viabilidad del hongo y bajo costo.

Para la producción de inóculo de MVA en Zamorano, se está buscando sustratos alternos al suelo agrícola que reúnan características adecuadas para el desarrollo del hongo pero con costos de oportunidad más bajos. De manera complementaria, se está evaluando la producción de este inóculo en dos sistemas alternativos, uno en maceteros bajo invernadero y otro en bancales de bambú a la intemperie, que permite la obtención de mayores volúmenes de inóculo comercial.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. General

Determinar una combinación apropiada de medio de crecimiento y sistema para la producción comercial de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular de alta calidad minimizando el uso de suelo agrícola y los costos.

1.5.2. Específicos

1. Desarrollar un sustrato de fácil elaboración, bajo costo y con el uso mínimo de suelo agrícola, que presente características adecuadas para el crecimiento óptimo del hongo.
2. Estimar la eficiencia de dos sistemas de producción de inoculante de micorriza.
3. Evaluar el crecimiento y desarrollo de la MVA con diferentes sustratos y sistemas de producción, mediante pruebas de conteo de esporas, producción de hifas e infección de raíces de la planta hospedera.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MICORRIZAS

La palabra micorriza proviene de los vocablos griegos *mike* (hongo) y *rrhiza* (raíz). Una micorriza es una simbiosis no patogénica; una asociación permanente entre raíces de plantas y hongos especializados, los cuales pueden desarrollarse en un ambiente natural y medios de cultivo (Raina *et al.*, 1999).

En la actualidad se describen dos tipos de micorrizas, las ectomicorrizas y las endomicorrizas, claramente diferenciadas por varias características (Cuadro 1). Las primeras se caracterizan por que el crecimiento y desarrollo del hongo ocurre en la corteza de las raíces de las plantas, sin explorar los espacios intracelulares de las mismas. En el caso de las endomicorrizas, su crecimiento ocurre a nivel inter e intracelular, y debido a las finas estructuras del hongo (hifas) pueden atravesar las células corticales de las raíces.

Las ectomicorrizas forman mantos de hifas alrededor de las raíces, las que en consecuencia sufren alteraciones morfológicas, siendo estas estructuras y las modificaciones en las raíces utilizadas para la identificación de este tipo de micorriza. Sin embargo, algunas ectomicorrizas no presentan el manto de hifas mientras algunas endomicorrizas si lo hacen. Las ectomicorrizas son muy importantes en los ecosistemas forestales, volviendo disponibles nutrimentos y manteniendo el reciclaje constante de los mismos (Sieverding, 1991).

2.2. LA AGRICULTURA Y LAS MICORRIZAS

En la actualidad, las micorrizas cumplen funciones muy importantes en los ecosistemas agrícolas. Estas incluyen regular la absorción de nutrimentos del suelo por las plantas, volver disponibles múltiples elementos minerales y/o ayudar a estabilizar las partículas del suelo disminuyendo el grado de erosión.

Durante los últimos 40 años, la agricultura ha sido altamente dependiente de la aplicación de insumos sintéticos (fertilizantes y plaguicidas) cuyo uso indiscriminado ha tenido un fuerte impacto sobre los organismos naturales (hongos, bacterias, nematodos, lombrices) de éstos ecosistemas, causando serias alteraciones en sus poblaciones incluyendo la pérdida de micorrizas.

Según Blanco y Salas (1997), la agricultura sostenible sólo es posible mediante un aprovechamiento óptimo y responsable de los microorganismos y otros pobladores del suelo.

Cuadro 1. Resumen de las características y diferencias entre endomicorrizas y ectomicorrizas.

Endomicorrizas	Ectomicorrizas
Clase taxonómica: Zigomicetes	Clase taxonómica: Basidiomicetes, Ascomicetes y Ficomicetes
<ul style="list-style-type: none"> • No forma manto hifal, micelio aseptado. • Crecimiento inter e intracelular en corteza radical. • Hospederos: árboles, arbustos, hierbas. • Reproducción asexual (clamidosporas y micelio). • Diversidad: 6 géneros con 150 especies descritas, diversidad fisiológica, intraespecífica. • No hay especificidad a hospederos. • Menor selectividad a requerimientos ambientales. • Ocurren en toda clase de suelos, predominantemente en los tropicales con bajos contenidos de materia orgánica. • Absorben P, Zn y Cu que son poco móviles, y otros elementos de la solución de suelo. • No son descomponedores. 	<ul style="list-style-type: none"> • Formación de manto, micelio septado. • Crecimiento del micelio intercelular. • Hospederos: árboles maderables. • Reproducción sexual y asexual. • Diversidad: 148 géneros con 5,400 especies descritas. • Desde alta a ninguna especificidad. • Selectivos a requerimientos ambientales. • Mayor distribución en bosques de zonas templadas y en suelos con alto contenido de materia orgánica. • Absorben P y Zn. • Son descomponedores y aprovechan fuentes orgánicas de N.

Fuente: Blanco & Salas (1997).

Los hongos micorrizógenos pueden representar una fracción significativa de la biomasa del suelo, alcanzando hasta el 20% del total. Sin embargo, su función clave radica en que su abundante micelio intra y extraradical constituye un enlace o puente entre las plantas y el suelo, influyendo y conectando entre sí sus componentes bióticos y abióticos (Blanco y Salas, 1997).

Cuando se forma la micorriza, en las raíces se producen alteraciones fisiológicas y exudaciones que provocan cambios en la población microbiana circundante. Estos cambios han dado lugar a la redefinición de la rizósfera, zona de influencia directa de las raíces en la biología del suelo, como micorrizósfera. Adicionalmente, la región del micelio extraradical sirve como sustrato alimenticio a otros microorganismos, y debido a que puede llegar a medir más de 9 cm desde la raíz, permite aumentar el intercambio de compuestos de carbono hacia las plantas y la zona de influencia de la micorrizósfera. (Blanco y Salas, 1997).

Las micorrizas también han tenido efectos muy importantes sobre el establecimiento y desarrollo de innumerables plantaciones forestales en casi todo el mundo. Algunas especies leñosas y forestales (Fagáceas, Betuláceas y Pináceas, entre otras), todas las especies de interés hortícola, y muchas familias que poseen importancia ornamental (Orquidáceas y Rosáceas, entre otras), no pueden alcanzar un desarrollo óptimo en ausencia de estos hongos. Desde esta perspectiva se puede visualizar el panorama alrededor del uso de las micorrizas, ya que poseen una gran importancia ecológica y económica (Hernández, 2001)

2.3. FUNCIONES DE LAS MICORRIZAS

Al analizar las funciones de las MVA, hay que considerar las múltiples interacciones que ocurren entre ellas y con las plantas, el suelo, la microflora, la microfauna y el ambiente circundante (Blanco y Salas, 1997).

2.2.1. Absorción de nutrimentos

El beneficio que obtienen las plantas de la micorriza generalmente es diferente, probablemente relacionado con el tipo de planta sobre la que actúa la micorriza y con el tipo de micorriza que llega a colonizar las raíces de la planta. El establecimiento del hongo y la obtención de nutrimentos tiene una relación estrecha con la extensión que alcance el sistema radical de la planta y la distribución las raíces en el suelo, las que determinan el volumen de suelo explorado y en consecuencia. la absorción de nutrimentos (O'Keefe y Sylvia, 1991).

Las plantas absorben fósforo en estado soluble, pero cuando se agrega al suelo como fertilizante o mediante materia orgánica, más del 90% de éste elemento poco móvil, pasa rápidamente a formas solubles no disponibles. Así, gran parte de los fertilizantes fosfatados que se aplican en muchas explotaciones agrícolas no son utilizados inmediatamente por las plantas, si no que se almacenan en el suelo (O'Keefe y Sylvia, 1991).

El fósforo es el elemento más importante en la absorción de nutrimentos por acción de las micorrizas. Según O'Keefe y Sylvia (1991), este elemento puede ser tomado por la planta mediante una serie de mecanismos incluyendo el intercambio de aniones de ácidos orgánicos o la absorción de aniones de fosfatos; la formación de ácidos orgánicos complejos de Fe y Al (quelatos); y la alteración del pH por la excreción de cationes de hidrógeno (H^+) y de aniones de ácido carbónico (HCO_3^-).

Las micorrizas son especialmente eficientes en aumentar los niveles de abastecimiento de fósforo. Uno de los mecanismos que utilizan estos microorganismos es incrementar la capacidad de absorción a través de una alta producción de micelios, lo que permite a la planta aumentar el volumen de suelo explorado y la superficie de absorción. Adicionalmente, presentan la capacidad de acumular fósforo intracelularmente en forma

activa contra fuertes gradientes de concentración, permitiendo a las micorrizas extraer fósforo en forma más eficiente especialmente de soluciones de muy baja concentración.

Las micorrizas pueden ayudar a proteger las plantas contra la presencia de iones de metales pesados, disminuyendo el efecto de la toxicidad de manganeso en plantas de frijol y puerro; y a disminuir la incidencia de enfermedades que atacan al frijol, especialmente en suelos estériles en los que hay una tendencia a elevar los niveles de manganeso. Otros iones como el magnesio y el aluminio pueden ser acumulados por el hongo y excluidos de la planta. Las MVA pueden favorecer el crecimiento de pastos en suelos contaminados por zinc, protegiendo a la planta del efecto tóxico de este metal (Sieverding, 1991).

2.2.2. Absorción de agua

La absorción del agua es afectada por las MVA, pues estas provocan incrementos en el flujo hídrico en las plantas y en la conductividad eléctrica en las raíces. La red de micelios del hongo tiene un papel importante en la toma de agua debido al contacto de sus hifas más finas con la parte media de las raíces. Los síntomas de estrés hídrico podrían ser más marcados en cultivos con mayor dependencia de estos organismos, por ejemplo el de rosas u otros ornamentales, en relación con cultivos de baja dependencia de las MVA como el maíz y el sorgo (Jeffries y Dodd, 1991).

Adicionalmente, el desarrollo de red de hifas permite optimizar el uso del agua obteniendo beneficios para la sobrevivencia de plantas que pudieran atravesar deficiencias o excesos nutricionales, maltratos durante el transplante, suelos con bajo fósforo disponible y tolerancia a condiciones de sequía (Jeffries y Dodd, 1991).

2.2.3 Estabilización del suelo

Las MVA son importantes contribuyentes para la estabilidad del suelo, ya que los hongos producen grandes cantidades de hifas que ayudan a mantener unidas sus partículas. Los suelos erosionados tienen índices muy bajos de fertilidad, limitando el potencial benéfico de la inoculación micorrízica; pesa a lo anterior, la inoculación con hongos MVA es una alternativa para ayudar a la rehabilitación de estas áreas (Reyes-Quintana *et al.*, 2000).

La red de hifas de las MVA afecta ciertas características del suelo, mejorando su estructura y la estabilidad de sus agregados. Este beneficio es muy importante, pues podría ayudar a evitar la pérdida de grandes cantidades de suelos tropicales debido a la erosión. En suelos arenosos, las plantas que están en asocio con micorrizas pueden agregar mayor cantidad de partículas en las raíces por unidad de masa, con relación a las plantas que no poseen micorrizas (Reyes-Quintana *et al.*, 2000).

Las hifas poseen proyecciones tridimensionales que pudieran ser idóneas para retener las partículas de suelo, formando así los agregados. La concurrencia en este proceso de las raíces más finas de la planta, así como de polisacáridos producidos por las bacterias del suelo u otros organismos, que cementarían de modo más sólido las partículas, bastan para explicar la mayor agregación del suelo producida por el establecimiento de una red de micelio MVA. Dado que la agregación de partículas es un proceso fundamental en el mantenimiento del suelo (y del ecosistema) en condiciones estables, es necesaria la preservación de la red tridimensional creada por el crecimiento del micelio externo (Bago *et al.*, 2000).

2.2.4. Protección contra enfermedades

Los mecanismos con los cuales las MVA logran un control sobre los patógenos está relacionados con cambios morfológicos o fisiológicas y/o bioquímicos que se dan en la planta hospedera. Entre las alteraciones morfológicas que ocurren están la lignificación de las paredes celulares, la producción de otros polisacáridos y el incremento del sistema vascular de la planta hospedera.

Los hongos MVA pueden aumentar o disminuir, o pueden no tener efecto en la severidad de los síntomas de la enfermedad en la planta o sobre la incidencia del agente patógeno sobre el hospedero. Las MVA pueden incrementar la resistencia contra patógenos de la raíz, especialmente cuando la MVA llega a colonizarla antes del ataque del patógeno. A través de la asociación efectiva de las micorrizas, la incidencia del ataque por nematodos es reducido ya que su daño es a menudo compensado por las micorrizas (Sieverding, 1991). Los beneficios de la incidencia de enfermedades pueden ser reducida o su efecto verse disminuido debido a altos contenidos de aminoácidos (arginina, fenilalanina, serina), isoflavonoides (fitoalexinas) y a la reducción de enzimas o azúcares (quitinasa), compuestos que están presente en una asociación micorrízica bien establecida entre el hongo y la planta.

En el caso de las MVA, la infección se realiza por la formación del apresorio en la superficie de la raíz del hospedero dónde las hifas del hongo han penetrado las células epidermales, ocurriendo la asociación simbiótica que transforma las células corticales en reservas alimenticias para la planta y la red de hifas del hongo.

Las células de las raíces que han sido transformadas por el hongo son aisladas del contacto directo con el suelo por el manto de hifas. Esta estructura protege a la raíz de invasiones por patógenos como *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Sclerotinia*, *Pythium* y *Phytophthora*, que también tienen afinidad con ellas infectando los meristemas y tejidos corticales primarios e invadiendo y colonizando el resto de los tejidos, provocando una restricción o necrosis extensiva. En estados avanzados de necrosis, las hifas de los patógenos ya han invadido los tejidos vasculares (Jalali y Jalali, 1991). Generalmente, estos sistemas microbiológicos provocan alteraciones sobre la permeabilidad de las células de las raíces debido al daño en sus tejidos, a cambios en el

metabolismo de las raíces por la selectividad al hacer uso de compuestos exudados por estas, o por la excreción de toxinas.

Según Jalali y Jalali (1991), en ensayos en el cultivo de tomate la colonización de las raíces por *Glomus intraradicis* no fue afectada por la presencia del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. El número de propágulos (estructuras de reproducción) de este patógeno era considerablemente bajo en las plantas inoculadas por las MVA, concluyéndose que la simbiosis de *G. intraradicis* con las raíces de las plantas inhibieron significativamente la necrosis de las raíces causada por el patógeno.

2.2.5. Alteraciones fisiológicas

Las micorrizas son capaces de producir compuestos hormonales, pero se desconoce si estos son traslocados directamente a la planta por efecto de la simbiosis. Las fitohormonas producidas por la planta actúan como mediadoras más importantes de la infección con endomicorrizas, por ser sintetizadas primariamente en los meristemas radicales (Hernández, 2001).

En las raíces el crecimiento disminuye por la baja presencia de ciertos compuestos, principalmente el etileno, gas que la planta es capaz de producir cuando se encuentra en un período de estrés. Sin embargo, simultáneamente se promueve la actividad del hongo micorrízico en la rizósfera, minimizando el efecto estresante sobre la planta (O'Keefe y Silvia, 1991).

2.4. PRODUCCIÓN DE INÓCULO

Las MVA son organismos que se multiplican gracias a la simbiosis que forman con las plantas, por lo que existen muchas limitaciones para la producción de su inóculo en cantidades industriales. Este es uno de los principales impedimentos para lograr la difusión y uso masivo por productores de biofertilizante de MVA, principalmente para los de pequeña escala (Sieverding, 1991).

El método más común para producir inóculo es en macetas con suelo estéril. La producción de estos hongos también se puede lograr utilizando otros sustratos como la perlita, turba, corcho, arcilla expandida, vermiculita, sistema hidropónico, la técnica de película de nutrientes o cultivos axénico de órganos de raíz.

En los medios de producción de inóculo, los nutrientes deben mantener un balance de N y P durante el desarrollo del hospedante. El contenido de P debe mantenerse bajo debido a que, generalmente, las altas concentraciones inhiben el desarrollo de la MVA. Los niveles óptimos de P y N deberían mantenerse en un máximo de $70 \mu\text{g}^{-1}$ y $50 \mu\text{g}^{-1}$, respectivamente, para evitar afectar la colonización del hongo (Manjarres *et al.*, 2000).

Las cepas seleccionadas para conformar el inóculo deben reunir ciertas características para garantizar que el producto final sea de buena calidad (Cuadro 2). El inóculo como tal debe garantizar estar libre de patógenos y a la vez no se debe descuidar otros factores como el pH y los nutrientes del suelo; en caso de haber deficiencias, estas deben ser corregidas para conseguir las condiciones óptimas para el desarrollo del hongo y del hospedero. En un buen suelo un prerequisite muy importante es la aireación, por que el oxígeno juega un papel muy importante en el desarrollo de la simbiosis de las MVA. Debe poseer una capacidad de alcanzar un porcentaje de colonización del 50% en un periodo seis semanas. La planta debe poseer la capacidad de crecer bajo condiciones disponibles en invernadero.

En la mayoría de los casos, el inoculante de MVA es aplicado como un producto fresco. Para la cosecha se corta la parte aérea de a planta que contribuye a su producción, y esta es desechada. El suelo con las raíces pasa por un proceso de selección donde la tierra es picada con azadones, machetes u otras herramientas adecuadas para esta práctica. Las raíces mas gruesas y los estolones del pasto son removidos. La vía más fácil de obtener una mezcla homogénea del suelo es la de pasar el sustrato a través de un picador mecánico que usualmente es utilizado para cortar materiales orgánicos en semilleros, teniendo la precaución de hacerlo cuando este tenga un porcentaje de humedad 5 a 15%. La cantidad de inóculo producido debe ser usado en el menor tiempo posible a partir de su cosecha para que su viabilidad no disminuya, pudiéndose almacenar en lugares secos en bolsas u otros métodos como pellets, geles (Sieverding, 1991).

2.4.1. 'Slurries' y geles

La inoculación por medio de este tipo de inoculante facilita su manejo ya que se puede preparar soluciones con Carboxyl metil celulosa al 1%, la cual llevará esporas y parte de raíces infectadas. Las suspensiones en geles pueden ser aplicadas en bandas en los semilleros mezcladas con semilla de cítricos, usando bombas con suficiente presión. Los slurries son hechos de suelo colado, semilla de leguminosas forrajeras (trébol) y 4% de metil celulosa, mezcla que puede utilizar para inocular los campos. El potencial de sobrevivencia de los propágulos infectivos de MVA en geles y slurries es desconocido (Sieverding, 1991).

2.4.2. 'Pellets'

Son cadena de polímeros atrapados junto con las esporas de la MVA. Para obtener pellets se requieren 20 partes de suelo de inóculo, 1 parte de arcilla (partículas de 16 μm) y una tercera parte de arcilla sedimentada (partículas de 2-6 μm). Estos componentes son mezclados volviendo la mezcla maleable para dar la forma de pellets; estos son secados y cada uno puede llegar a pesar 1.4 g. El almacenamiento en seco de los pellets por más de un mes no afecta la viabilidad de la MVA (Sieverding, 1991).

2.4.3. Pellets de multisemillas

Las semillas finas de leguminosas (alfalfa, trébol) son incorporadas al proceso normal de producción de pellets. La semilla es mezclada con sustratos de inóculos antes de la peletización, con lo cual podemos obtener pellets multisemillas que pueden a la vez incorporar cepas de *Rhizobium*.

2.5. POTENCIAL DE LA INOCULACIÓN

Según Blanco y Salas (1997), la inoculación puede ser benéfica cuando el suelo es de pobre calidad, la cantidad de micorrizas nativas es baja, las plantas responden en forma significativa a la micorrización y/o cuando se esteriliza total o parcialmente el medio. La mayor viabilidad económica de inocular se presenta en cultivos que requieren una fase de semillero o vivero (árboles y hortalizas), en la cual los costos de inoculación son menores y la colonización de las raíces por los hongos introducidos puede mantenerse y desarrollarse en las fases posteriores.

Una vez establecida la simbiosis, el cultivo actúa como facilitador de la esporulación del hongo, siendo esta etapa muy importante para su posterior caracterización, clasificación taxonómica y preservación. Los factores que más pueden afectar de forma negativa el desarrollo del hongo, especialmente en la etapa de esporulación, son la fertilización, el pH y la temperatura del suelo, y la cantidad de agua disponible.

Cuadro 2. Parámetros indispensables para la selección de un hongo micorrízico efectivo.

Cualidad requerida	Característica relevante
Habilidad para absorber y transportar fósforo del suelo hasta la planta.	Capacidad para colonizar raíces con relación al suministro de P, a la presencia de otros hongos micorrizógenos arbusculares y microfauna, a las propiedades del suelo y al hospedante.
Habilidad para incrementar el crecimiento y desarrollo de la planta.	Capacidad para mantener estable la relación de transferencia de P con la demanda de carbohidratos en el hospedante.
Habilidad para persistir en el suelo (sí es requerido)	Producción intensa de propágulos en las raíces y el suelo.
Habilidad para soportar los métodos de producción a gran escala	Resistencia de los propágulos a la desecación y supervivencia de los mismos en el sistema productivo.

Fuente: Manjarres *et al.* (2000).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La producción de inoculantes de micorriza es una actividad que generalmente demanda un alto uso de suelo agrícola como sustrato, por lo que es necesario buscar sustratos alternos que puedan reemplazarlo. Además, los suelos agrícolas pueden presentar ciertas características indeseables, por lo que deben mezclarse con otros componentes que en algunos casos necesitan un manejo adicional, incrementando los costos de producción (ej. lavado previo de la arena).

3.1. UBICACIÓN

El ensayo se llevó cabo en el invernadero N° 5 del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana / Zamorano (CCPA-EAP/Zamorano).

3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

El material vegetal utilizado para evaluar el desarrollo de la micorriza fue el pasto *Brachiaria decumbens*, el cual desarrolla su sistema radical rápidamente y de forma abundante. Esta especie posee una buena adaptación a suelos con pH de 4.5 a 8, alcanzando buen desarrollo en suelos medianamente fértiles y con buen drenaje.

La inoculación con micorriza se realizó usando el producto comercial MYCORAL[®], compuesto por la mezcla de tres cepas de las especies *Glomus*, *Acaulospora* y *Entrophospora*, y conteniendo esporas, raicillas con hifas, hifas sueltas y vesículas como estructuras de infección. Los suelos que se evaluaron como fuentes alternativas al suelo agrícola fueron seleccionados de diferentes sectores del Valle Yeguaré. A estos suelos se les realizó análisis químicos y físicos para determinar los niveles de nutrientes y en especial la concentración de fósforo, cuyo exceso normalmente afecta el desarrollo de la micorriza.

3.3. METODOLOGÍA

El proyecto se desarrolló en dos fases. En la primera se seleccionó el suelo y las proporciones que se utilizaron en los ensayos; y en la segunda se determinó el desarrollo de la micorriza bajo dos sistemas de producción del inóculo, evaluando la mezcla resultante de la primera fase con diferentes niveles de fósforo y correcciones de acidez.

3.3.1. Primera Fase

Se recolectó una muestra de suelo rojo en áreas aledañas a la aldea del Jicarito, San Antonio de Oriente; una de suelo blanco en el municipio de Yuscarán; y muestras de otros materiales incluyendo gallinaza, compost, arena y suelo agrícola.

Después de recolectar y analizar las muestras, se procedió a elaborar diferentes mezclas con los materiales recolectados usando diferentes proporciones (Cuadro 3).

Cuadro 3. Mezclas de suelo y otros componentes empleados en la conformación del sustrato para la producción de inoculante micorrízico en Zamorano, Honduras, 2001.

Sustrato No.	Mezcla	Proporción
1	Suelo Rojo : Suelo Agrícola	1:1
2	Suelo Rojo : Suelo Agrícola	2:1
3	Suelo Blanco : Suelo Agrícola	1:1
4	Suelo Blanco : Suelo Agrícola	2:1
5	Suelo Rojo : Gallinaza	1:1
6	Suelo Rojo : Gallinaza	2:1
7	Suelo Blanco : Gallinaza	1:1
8	Suelo Blanco : Gallinaza	2:1
9	Suelo Agrícola : Arena	1:1
10	Suelo Agrícola : Arena	1:2
11	Gallinaza : Arena	1:1
12	Gallinaza : Arena	1:2
13	Suelo Rojo : Compost	1:1
14	Suelo Rojo : Compost	2:1
15	Suelo Blanco : Compost	1:1
16	Suelo Blanco : Compost	2:1

Después de haber conformado las mezclas, se analizó el contenido de fósforo de todas ellas. Utilizó el método de colorímetro con la solución extractora Mehlich I. De la mezcla seleccionada con el menor contenido de fósforo se volvieron a elaborar proporciones diferentes con los mismos compuestos, a las que se les realizó un análisis físico y químico.

3.3.2. Segunda Fase

3.3.2.1. Tratamientos

Los tratamientos evaluados para la producción de inoculante de micorriza consistieron en dos medios, uno compuesto por suelo rojo y suelo agrícola (SR:SA), y suelo rojo y arena (SR:A), ambos en proporción 3:1; tres niveles de fósforo, alto (60 ppm), medio (30 ppm) y bajo (10 ppm); y la corrección del pH mediante adición de cal (1 t/ha), (anexos 1 y 2). El testigo consistió en la mezcla utilizada por Zamorano para la producción de MYCORAL[®], compuesto por suelo agrícola y arena (SA:A) en la proporción 2:1. Todos los medios evaluados fueron esterilizados con vapor de agua por dos horas, con el fin de disminuir el contenido de microorganismos presentes al momento de la siembra.

3.3.2.2. Sistemas de producción

Los tratamientos (medios) fueron evaluados bajo dos sistemas de producción de inóculos, a granel en camas y en potes en invernadero.

Las camas consistieron en estructuras de caña de bambú, con dimensiones de 1 m ancho, 3 m de largo y 0.25 m de profundidad. Cada cama fue subdividida en seis compartimentos con dimensiones de 0.5 m de ancho y 1.0 m de largo, separados por plástico negro para evitar la contaminación entre tratamientos. Se emplearon tres repeticiones utilizando 2 bancales para cada una. El sustrato o medio testigo fue establecido en un solo bancal también dividido en seis compartimentos.

Para el sistema de producción en invernadero se utilizaron 168 potes, cada uno con capacidad de 1.41 kg de suelo. Cada tratamiento se estableció en 12 potes y 2 repeticiones por tratamiento, incluyendo el testigo.

3.3.2.3 Siembra

La siembra en las camas de bambú se realizó distribuyendo a chorro corrido la semilla de *Brachiaria decumbens*, empleando tres hileras por compartimento con una separación de 0.15 m entre hileras. La inoculación se realizó colocando 100 g/m lineal del inoculante MYCORAL[®].

La cantidad de fertilizante se calculó a partir del P disponible que había en el suelo complementando las dosis requeridas por los tratamientos (10, 30 y 60 ppm), utilizando el fertilizante superfosfato triple (0-46-0). Las cantidades de P y el requerimiento de cal para la corrección de pH se detallan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Cantidad requerida de fósforo para los tratamientos de las mezclas evaluadas para la producción de inoculante micorrízico. Zamorano, Honduras 2001.

Tratamientos (sustratos)	Fosforo disponible (ppm)	P aplicado (ppm)		
		10	30	60
M1+C1+P1	12	0		
M1+C1+P2	12		18	
M1+C1+P3	12			48
M1+C2+P1	12	0		
M1+C2+P2	12		18	
M1+C2+P3	12			48
M2+C1+P1	5	5		
M2+C1+P2	5		25	
M2+C1+P3	5			55
M2+C2+P1	5	5		
M2+C2+P2	5		25	
M2+C2+P3	5			55

Medios (sustratos)	Corrección de pH	Niveles de P
M1 = SR:A (3:1)	C1= Sin Corrección	P1= Niveles bajo (10 ppm)
M2 = SR:SA (3:1)	C2= Con Corrección	P2= Nivel medio (30 ppm)
		P3= Nivel alto (60 ppm)

En el invernadero, la siembra en potes se realizó distribuyendo aproximadamente 10 semillas de *B. decumbens* en dos posturas, e inoculando con MYCORAL[®] a razón de 10 g/postura (Anexo 3).

En ambos sistemas se procuró un manejo óptimo y uniforme de la humedad y de la incidencia de plagas, con el fin de minimizar su efecto sobre los resultados obtenidos.

3.4 MUESTREOS Y VARIABLES MEDIDAS

Se realizaron dos muestreos para evaluar el desarrollo de la MVA en los sustratos en estudio, a los 48 y a los 61 días después de la siembra (DDS).

Se procedió a evaluar el efecto de la micorriza en la planta hospedera mediante la determinación de su desarrollo y de la calidad del inóculo mediante la evaluación del medio de crecimiento. Las variables que se midieron fueron el porcentaje de raíces infectadas, determinada mediante la tinción de raíces; la cantidad de hifas utilizando el método para clarificar y teñir muestras de raíces (Jarstfer, 1970a); Anexo 4; el número de

esporas presentes en el medio (25ml/100 g suelo) utilizando el método para aislamiento de esporas (Jarstfer, 1970b); (Anexo 5); y la biomasa total acumulada en el hospedero.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis e interpretación de los datos se realizó un análisis de varianza y la separación de medias para las variables asociadas. El programa utilizado para este análisis fue el MSTAT-C V2.1.

3.6 ANÁLISIS ECONÓMICO

Se planteó un análisis económico basado en la relación costo/beneficio y la tasa de retorno marginal, comparando los tratamientos superiores con respecto al testigo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PRIMERA FASE

Se realizaron mezclas entre los suelos y demás componentes en diferentes proporciones (Cuadro 5). Entre estas se seleccionaron sustratos que reunieron las condiciones químicas adecuadas para el desarrollo del hongo en la producción de inoculante de micorriza. La evaluación de las características químicas de las mezclas sólo consistió en el análisis del contenido de fósforo, debido a que es el elemento que más inhibe el desarrollo de la micorriza.

Para las mezclas conformadas con gallinaza y compost el contenido de fósforo fue alto, por lo que fueron descartadas. El suelo blanco proveniente del municipio de Yucarán fue descartado por su bajo contenido de nutrientes. La mezcla con suelo rojo (SR) proveniente de la aldea del Jicarito y suelo agrícola (SA) fue en proporción 2:1, la que presentó menor cantidad de fósforo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Contenido de fósforo de mezclas de suelo y otros componentes empleados en la preparación de sustratos para la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.

Sustratos No.	Mezcla	Proporción	P disponible (ppm)
1	Suelo Rojo : Suelo Agrícola	1:1	8
2	Suelo Rojo : Suelo Agrícola *	2:1	6
3	Suelo Blanco : Suelo Agrícola	1:1	10
4	Suelo Blanco : Suelo Agrícola	2:1	9
5	Suelo Rojo : Gallinaza	1:1	895
6	Suelo Rojo : Gallinaza	2:1	700
7	Suelo Blanco : Gallinaza	1:1	1026
8	Suelo Blanco : Gallinaza	2:1	849
9	Suelo Agrícola : Arena	1:1	25
10	Suelo Agrícola : Arena	1:2	28
11	Gallinaza : Arena	1:1	998
12	Gallinaza : Arena	1:2	747
13	Suelo Rojo : Compost	1:1	149
14	Suelo Rojo : Compost	2:1	110
15	Suelo Blanco : Compost	1:1	188
16	Suelo Blanco : Compost	2:1	110

*: Mezcla seleccionada.

Con base en esta mezcla se formaron dos nuevas proporciones variando la concentración de suelo rojo, a las que se realizó un análisis químico y de requerimiento de cal cuyos resultados se detallan en el Cuadro 6. El requerimiento de cal se determinó para tratar de subir el pH del suelo a 5.0 y 5.5, pero debido a las altas cantidades requeridas para alcanzar estos niveles se decidió aplicar 1 t/ha (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis químico de tres mezclas de suelo rojo y suelo agrícola evaluadas como sustratos para la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.

Sustrato (Suelo)	pH (H_2O)	%		Req. Cal (kg/ha)		ppm (disponible)			
		M.O.	N _(total)	pH 5.0	pH 5.5	P	K	Ca	Mg
Suelo rojo:Suelo agrícola (2:1)	4.43	2.41	0.12	3,726	5,499	6	137	480	127
Suelo rojo:Suelo agrícola (3:1)	4.42	2.46	0.12	4,590	6,590	5.5	143	472	135
Suelo rojo:Suelo agrícola (4:1)	4.45	2.40	0.12	4,317	6,453	5	131	420	135

De estas combinaciones se seleccionó para el estudio la mezcla de SR:SA en la proporción de 3:1. Con el fin de explorar alternativas complementarias para la optimización de la mezcla, se evaluó otros sustratos consistentes en mezcla de suelo rojo y arena (SR:A) en la proporción 3:1 y mezcla de suelo agrícola y arena (SA:A) en proporción 2:1, siendo esta última la utilizada como testigo.

Se determinaron las características físico-químicas de las mezclas, incluyendo textura, pH, materia orgánica, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, hierro, magnesio, y estabilidad de los agregados, ya que este favorece la aireación del suelo y el desarrollo radicular (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis físico-químico de las mezclas evaluadas como sustratos para la producción de inoculante de micorrizas. Zamorano, Honduras, 2001.

Sustrato	pH (H_2O)	Textura	%						ppm (disponible)				
			Arena	Limo	Arcilla	M.O.	N _(total)	EA*	P	K	Ca	Mg	Fe
SR:SA (3:1)	4.12	Franco Arcillo Arenoso	54	22	24	2.07	0.10	51	5	117	337	90	17
SR:A (3:1)	4.06	Franco Arenoso	64	24	12	1.21	0.06	60	12	133	442	97	16
SA:A (2:1)	5.48	Franco Arenoso	62	20	18	2.24	0.11	21	23	213	1200	135	50

* Estabilidad de agregados

4.2. SEGUNDA FASE

4.2.1. Primer muestreo

4.2.1.1. Invernaderos. EL primer muestreo se realizó a los 48 días después de la siembra (DDS). En este muestreo no se observaron diferencias entre los sustratos (SR:A y SR:SA) evaluados; sin embargo, ambos presentan menor número de esporas (NE) e infección de raíces por vesículas (IRV) que el sustrato testigo (SA:A) usado actualmente en Zamorano para la producción de MYCORAL[®] (Cuadro 8). Por otro lado, la adición de cal sólo incrementó significativamente el NE; pero las concentraciones medias y altas (30 y 60 ppm) de fósforo afectaron la esporulación del hongo (Cuadro 9). Como se sugiere en estudios anteriores, niveles bajos de fósforo favorecen el desarrollo óptimo del hongo, y las plantas se benefician de la infección micorrízica incrementando su crecimiento cuando los niveles de P son bajos (Blanco y Salas, 1997). No se observaron efectos de interacciones en el NE ni en la IRV e infección de raíces por hifas (IRH).

4.2.1.2. Camas de infección. No se observaron efectos de los sustratos ni de las aplicaciones de cal y fósforo, en el ensayo en las camas de bambú, en el NE, IRV e IRH. En general, los valores obtenidos en estas variables fueron inferiores a los observados usando el sustrato testigo.

Sólo se observaron efectos significativos en la interacción aplicación de cal x niveles de fósforo en la IRH (Cuadro 8). La IRH fue mayor cuando se aplicó cal a los sustratos, aunque con la dosis alta de fósforo la corrección del pH redujo significativamente el porcentaje de IRH (Cuadro 10), posiblemente debido a una mayor disponibilidad del fósforo aplicado bajo este tratamiento con cal.

Cuadro 8. Efecto del sustrato, aplicación de cal y de fósforo en el número de esporas, infección de raíces por vesículas e hifas en el primer muestreo en invernaderos y camas. Zamorano, Honduras, 2001.

Factor	Número esporas (25 ml/100 g suelo)	Infección vesículas (%)	Infección hifas (%)
Invernaderos			
Sustrato (S)			
Suelo rojo :Arena (3:1)	24.3	13.0	23.6
Suelo rojo:Suelo Agrícola (3:1)	43.3	8.3	28.6
ANDEVA	ns	ns	ns
Cal (C)			
Sin	27.0	11.6	28.3
Con	41.1	9.6	24.0
ANDEVA	*	ns	ns
Fósforo (F)			
10 ppm	41.4	14.0	33.5
30 ppm	35.5	9.2	22.7
60 ppm	25.3	8.7	22.2
ANDEVA	*	ns	ns
DMS (0.05)	12.6		
Interacciones			
S*C	ns	ns	ns
S*F	ns	ns	ns
C*F	ns	ns	ns
S*C*F	ns	ns	ns
CV (%)	32.3	41.8	24.9
Testigo (Suelo agrícola:Arena)	61.0	32.0	40.0
Camas de infección			
Sustrato (S)			
Suelo rojo:Arena (3:1)	23.2	10.2	26.2
Suelo rojo:Suelo Agrícola (3:1)	46.8	10.2	31.8
ANDEVA	ns	ns	ns
Cal (C)			
Sin	37.7	10.0	31.6
Con	32.9	10.4	26.4
ANDEVA	ns	ns	ns
Fósforo (F)			
10 ppm	40.3	14.3	29.5
30 ppm	32.1	10.2	31.8
60 ppm	32.7	6.2	25.7
ANDEVA	ns	ns	ns
DMS (0.05)			
Interacciones			
S*C	ns	ns	ns
DMS (0.05)			
S*F	ns	ns	ns
DMS (0.05)			
C*F	ns	ns	*
DMS (0.05)			17.3
S*C*F	ns	ns	ns
DMS (0.05)			
CV (%)	43.2	41.9	25.9
Testigo (Suelo agrícola:Arena)	81.0	15.0	22.0

* significativo ($P \leq 0.05$)

Cuadro 9. Efecto de los tres niveles de fósforo sobre el número de esporas en sustratos para la producción de inoculante de micorriza en invernadero (primer muestreo). Zamorano, Honduras,. 2001.

Fósforo (ppm)	Número de esporas
10	41 A
30	35 AB
60	25 B

Medias con diferentes letras son diferentes significativamente (SNK, $P < 0.05$)

Cuadro 10. Efecto de la interacción cal x fósforo para el porcentaje de infección de la raíz por hifas encontrados en el inoculante micorrízal en Zamorano, Honduras, 2001.

Aplicación de Cal (1 TM/ha)	Fósforo (ppm)	Infección de raíces por hifas (%)
Sin	10	36.3 A
	30	35.3 A
	60	32.0 AB
Con	10	27.3 AB
	30	27.0 AB
	60	16.0 B

Medias con diferentes letras son diferentes significativamente (SNK, $P \leq 0.05$)

4.2.2. Segundo muestreo

4.2.2.1.. Invernaderos. El segundo muestreo se realizó a los 61 DDS. No se encontraron efectos de los sustratos en las variables que indican el comportamiento de la micorriza, pero si se observó mayor peso de la biomasa en el sustrato SR:SA (Cuadro 11). Así mismo, la adición de cal tuvo una ligera relación con la producción de biomasa de las plantas de *B. decumbens*. Por otro lado, los efectos del fósforo redujeron el NE (Cuadro 12) pero aumentaron el peso de la biomasa (Cuadro 13).

El NE y la IRV con el sustrato SA:A fue mayor, comparado con los medios SR:A y SR:SA . Por otro lado, la IRH fue mayor con el sustrato SR:SA comparado con el testigo y el sustrato SR:A (Cuadro 11).

En esta etapa hubo un incremento del NE con respecto al primer muestreo, aunque los efectos de las dosis mayores de fósforo mantuvieron la producción de esporas en los niveles más bajos (Cuadro 12).

Cuadro 11. Efecto del sustrato, aplicación de cal y de fósforo en el número de esporas, infección de raíces por vesículas e hifas y peso de la biomasa en el segundo muestreo en invernaderos y camas de bambú. Zamorano, Honduras, 2001.

Factor	Número Esporas (25 ml/100 g suelo)	Infección vesículas (%)	Infección Hifas (%)	Peso Biomasa (g/pl)
	Invernaderos			
Sustrato (S)				
Suelo rojo:Arena (3:1)	32.3	17.8	16.5	26.8
Suelo rojo:Suelo agrícola (3:1)	48.6	11.8	18.3	39.8
ANDEVA	Ns	ns	ns	*
Cal (C)				
Sin	45.2	14.8	18.3	33.7
Con	35.7	14.8	17.0	32.8
ANDEVA	Ns	ns	ns	**
Fósforo (F)				
10 ppm	49.9	18.3	23.5	26.2
30 ppm	40.0	11.3	15.0	35.3
60 ppm	31.3	15.0	14.5	38.3
ANDEVA	**	ns	ns	**
DMS (0.05)	12.9			0.1
Interacciones				
S*C	ns	ns	ns	**
DMS (0.05)				1.0
S*F	ns	ns	ns	ns
C*F	ns	ns	ns	*
DMS (0.05)				1.2
S*C*F	ns	ns	ns	ns
CV (%)	28.5	31.2	20.0	2.2
Testigo (Suelo rojo:arena)	84.0	19.0	16.0	37.0
Camas de infección				
Medio (M)				
Suelo rojo:Arena (3:1)	27.8	10.3	18.3	126.9
Suelos rojo:Suelo agrícola (3:1)	42.4	8.2	13.7	226.7
ANDEVA	ns	ns	ns	**
Cal (C)				
Sin	39.6	8.8	17.4	173.3
Con	30.6	9.7	15.1	180.2
ANDEVA	ns	ns	ns	ns
Fósforo (F)				
10 ppm	32.5	13.6	19.8	105.9
30 ppm	39.3	5.2	12.0	202.8
60 ppm	33.5	9.0	17.0	221.6
ANDEVA	ns	**	ns	**
DMS (0.05)		5.5		18.1
Interacciones				
S*C	ns	ns	ns	ns
S*F	ns	ns	ns	ns
C*F	ns	**	ns	ns
DMS (0.05)		7.7		
S*C*F	ns	*	ns	ns
DMS (0.05)		10.9		
CV (%)	54.1	36.7	32.1	12.0
Testigo (Suelo agrícola:arena)	103.0	48.0	32.0	175.0

* significativo ($P \leq 0.05$), **altamente significativo ($P \leq 0.01$)

Los únicos efectos significativos de las interacciones fueron observados en la interacción Sustrato x Cal, donde la aplicación de cal redujo ligeramente el peso de la biomasa en el sustrato SR:SA; y de ambos (con y sin) comparados con los del sustrato SR:A (Cuadro 14). El peso de la biomasa fue mayor para el sustrato SR:SA dónde no se realizó la aplicación de cal, comparado con el sustrato SA:A (Cuadro 14).

Cuadro 12. Comparación del efecto del fósforo sobre el número de esporas en el primer y segundo muestreo. Zamorano, Honduras, 2001.

Fósforo (ppm)	Número de esporas		Incremento (%)
	1 ^{er} Muestreo	2 ^{do} Muestreo	
10	41.4 A	49.9 A	20.8
30	35.5 AB	40.0 AB	12.6
60	25.3 B	31.3 B	23.7

Medias con diferentes letras son diferentes significativamente (SNK, P <0.05)

Cuadro 13. Efecto del fósforo sobre la producción de biomasa de *Brachiaria decumbens* en la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.

Fósforo (ppm)	Peso biomasa
10	26.2 A
30	35.3 B
60	38.3 C

Medias con diferentes letras son diferentes significativamente (SNK, P≤0.05)

Cuadro 14. Efecto de la interacción entre el sustrato x aplicación de cal sobre el peso de la biomasa durante la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.

Medio	Aplicación de cal (t/ha)	Peso de biomasa (g/pl)
SR:SA (3:1)	Sin	40.8 A
	Con	38.6 B
SR:A (3:1)	Sin	26.6 C
	Con	26.8 C

Medias con diferentes letras son diferentes significativamente (SNK, P≤0.05)

En la interacción cal x fósforo, se observaron incrementos similares al aumentar las dosis de fósforo bajo los tratamientos con y sin cal (Cuadro 15). La mayor biomasa se obtuvo con las dosis altas de fósforo (60 ppm), pudiendo deberse a que este elemento favorece el desarrollo radical incrementando la absorción de nutrimentos, lo que se traduce en una mayor biomasa.

Cuadro 15. Efecto de la interacción cal x fósforo en el peso de la biomasa en la producción inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.

Aplicación de cal (1 t/ha)	Fósforo (ppm)	Peso de biomasa (g/pl)	
Sin	10	27.2	D
	30	35.9	B
	60	38.0	A
Con	10	25.2	E
	30	34.5	C
	60	38.5	A

Medias con diferentes letras son diferentes significativamente (SNK, $P \leq 0.05$)

4.2.2.2. Camas de infección.

Se observó un incremento significativo de la biomasa en el sustrato SR:SA; pero no hubo efectos en la producción de esporas e infección de raíces por la micorriza. La aplicación de cal no produjo cambios en las variables; sin embargo, la adición de fósforo redujo la IRV (pero no la IRH) y aumentó la biomasa de las plantas (Cuadros 16 y 17).

Se ratifica en este sistema de producción la calidad que se obtiene al producir inóculo con el Sustrato SA:A, ya que el NE, IRV y IRH fueron superiores comparándolo con los sustratos SR:SA y SR:A evaluados en el estudio (Cuadro 11).

Los efectos de las interacciones Cal x Fósforo y Sustrato x Cal x Fósforo afectaron solamente la IRV (Cuadro 11). El incremento de fósforo afectó la IRV cuando no se aplicó cal a los sustratos, mientras la aplicación de cal produjo efectos variables del fósforo en la IRV (Cuadro 18).

Cuadro 16. Efecto de los tres niveles de fósforo sobre el porcentaje de infección de raíces en la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.

Fósforo (ppm)	Infección de raíces por vesículas (%)
10	13.6 A
30	5.2 B
60	9.0 AB

Medias con diferentes letras son diferentes significativamente (SNK, $P \leq 0.05$)

Cuadro 17. Efecto de los tres niveles de fósforo sobre el peso de la biomasa en la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.

Fósforo (ppm)	Peso de biomasa
10	105.9 C
30	202.8 B
60	221.6 A

Medias con diferentes letras son diferentes significativamente (SNK, $P \leq 0.05$)

Cuadro 18. Efecto por vesículas de la interacción cal x fósforo en el porcentaje de infección de raíces en la producción de inoculante de micorriza. Zamorano, Honduras, 2001.

Aplicación de cal (1 t/ha)	Fósforo (ppm)	Infección de raíces por vesículas (%)
Sin	10	15.6 A
	30	7.6 BC
	60	3.0 C
Con	10	11.5 AB
	30	2.6 C
	60	15.0 AB

Medias con diferentes letras son diferentes significativamente (SNK, $P \leq 0.05$)

En cuanto a la interacción Sustrato x Cal x Fósforo, se observaron reducciones variables en la IRV debido a combinaciones de los tres factores (Cuadro 19). En general, los efectos de cal y fósforo fueron mayores en el sustrato SR:SA.

Cuadro 19. Efecto de la interacción Sustrato x Cal x Fósforo en la infección de raíces por vesículas. Zamorano, Honduras, 2001.

Sustrato	Aplicación de cal (1 t/ha)	Fósforo (ppm)	Infección de raíces por vesículas (%)
Suelo rojo:Arena (3:1)	Sin	10	10.6 ABC
		30	12.0 AB
		60	2.6 BC
	Con	10	17.0 A
		30	0.6 C
		60	18.6 A
Suelo rojo:Suelo agrícola (3:1)	Sin	10	20.6 A
		30	3.3 BC
		60	3.3 BC
	Con	10	6.0 BC
		30	4.6 BC
		60	11.3 ABC

Medias con diferentes letras son diferentes significativamente (SNK, $P \leq 0.05$)

4.4. ANÁLISIS ECONÓMICO

El análisis económico no se realizó debido a que los niveles de calidad que se obtuvieron de los tratamientos fueron más bajos que el sustrato testigo, lo que no hace factible el reemplazo de este por una nueva formulación de sustrato con suelo rojo. Es necesario conducir estudios adicionales empleando proporciones que no afecten significativamente la calidad de inóculo, con respecto al que actualmente se produce empleando suelo agrícola y arena.

5. CONCLUSIONES

1. Los sustratos empleando suelo sin valor agrícola tuvieron efectos similares entre ellos en el desarrollo del hongo y la infección de raíces, aunque presentaron diferencias en la producción de biomasa.
2. La adición de cal a los sustratos no mejoró la producción de esporas ni la infección de raíces, y el incremento en el contenido de fósforo afectó la producción del hongo. Ambos, la cal y el fósforo, tuvieron efectos favorables sobre la producción de biomasa, con incrementos mayores con la adición de fósforo.
3. Los sustratos y sus modificaciones con adición de cal y fósforo, en algunos casos fueron inferiores y en otros no produjeron aumentos significativos en el número de esporas, infección de raíces y biomasa del hospedero, con relación al sustrato testigo empleado actualmente en la producción de inoculantes en Zamorano.
4. En las camas de bambú se obtiene un mayor desarrollo (biomasa) de las plantas hospederas, se produce un inóculo con mayor contenido de esporas y raíces infectadas por la micorriza, y se facilita la producción de mayores volúmenes. La producción de inóculo en invernadero facilita el manejo de cepas individuales y el mantenimiento de su pureza.

6. RECOMENDACIONES

1. Evaluar el inóculo producido en camas con la mejor combinación de sustrato, cal y fósforo, empleando otras proporciones de suelos con y sin valor agrícola para reducir el uso de suelo agrícola en la actual formulación.
2. Mantener la producción de inóculo de cepas individuales y de MYCORAL[®] de alta pureza en invernadero, y utilizar las camas de bambú para la producción comercial de este inóculo de micorrizas.
3. Mejorar el manejo de la producción en camas de bambú con respecto a la conservación de las estructuras, uniformidad en las poblaciones de las plantas hospederas, compactación del medio y drenajes, durante el período de producción de inoculante.
4. Si se decide producir masivamente se podría seleccionar una área de suelo agrícola de poco valor y cosechar de 0.5-1.0 ha a una profundidad definida por el desarrollo radicular del hospedero, este caso *Brachiaria decumbens*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGO, B.; AZCÓN-AGUILAR, C.; SHACHER-HILL, Y.; PFEFFER, P.E. 2000. El micelio externo de la micorriza arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno. *In: Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Eds. A. Alarcón; R. Ferrera-Cerrato. Estado de México, MX. MUNDI-PRENSA S.A. de C.V. p. 78-92.
- BAREA, J.M. 2001. Las micorrizas arbusculares: componente clave en la productividad y estabilidad de agroecosistemas. (En línea). Madrid, ES. Consultado 1 mayo 2001. Disponible en <http://www.csic.es/asociaciones/api/b15/micorrizas.htm>
- BLANCO, F.A.; SALAS, E.A. 1997. Micorrizas en la agricultura: contexto mundial en la investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense (Costa Rica)* 21(1): 55-67.
- FERRERA-CERRATO, R. 2000. *Ecología, fisiología y biotecnología de la Micorriza Arbuscular*. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas Montecillo. MUNDI PRENSA. México. 251 p.
- HERNÁNDEZ, A. 2001. Las micorrizas. (En línea). Cataluña, ES. Consultado 20 agosto 2001. Disponible en <http://www.terralia.com/revsita14/pagina13.htm>
- JALALI, B.L.; JALALI, I. 1991. Mycorrhiza in plant disease control. *In: Handbook of applied mycology: Soil and plants*. Edited by D. K. Arora; B. Rai; K.G. Mukerji; G.R. Knudsen. New York, US. MARCEL DEKKER. INC. p. 131-154.
- JARSTFER, A. G. 1970a. Método para clarificar y teñir muestras de raíces. University of Florida, Soil Science Department, 2171 McCarty Hall, Gainesville, FL 32611-0151 USA
- JARSTFER, A. G. 1970b. Método para aislamiento de esporas.. University of Florida, Soil Science Department, 2171 McCarty Hall, Gainesville, FL 32611-0151 USA
- JEFFRIES, P.; DODD, J.C. 1991. The use of mycorrhizal inoculants in forestry and agriculture. *In: Handbook of applied mycology: Soil and plants*. Edited D. K. Arora; B. Rai; K.G. Mukerji; G. R. Knudsen. New York, US. MARCEL DEKKER. INC. p. 155-185.

MANJARREZ, M. J.; ALARCÓN, A.; FERRERA-CERRATO, R. 2000. Biotecnología de la producción de inóculo micorrízico arbuscular y su control de calidad. *In: Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Eds. A. Alarcón; R. Ferrera-Cerrato. Estado de México, MX. MUNDI-PRENSA S.A. de C.V. p. 239-250.

O'KEEFE, D.M.; SYLVIA, D.M. 1991. Mechanisms of the vesicular-arbuscular mycorrhizal plant growth response. *In: Handbook of applied mycology: Soil and plants*. Ed. D. K. Arora; B. Rai; K.G. Mukerji; G. R. Knudsen. New York, US. MARCEL DEKKER. INC. p. 35-53.

RAINA, S.; CHAMOLA, B.P.; MUKERJI, K.G. 1999. Evolution of mycorrhiza. *In: Mycorrhizal biology*. Edited by K.G. Mukerji, B.P. Chamola, J. Singh. Kluwer Academic/Plenum. New York, US. p. 1-25.

READ, D.J.; LEWIS D.H.; FITTER, A.H.; ALEXANDER, I.J. 1992. Mycorrhizas in Ecosystems. Colset Pte Ltd. Singapore. UK at the University Press, Cambridge. 419 p.

REYES-QUINTANA, C.; FERRERA-CERRATO, R.; ALARCON, A.; RODRIGUEZ, S. 2000. Microbiología de la relación de nodricismo entre leguminosas arbóreas y *Neobuxbaumia tetetzo* en suelos no erosionados y erosionados en Zapotilla de Salinas, Puebla. *In: Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Eds. A. Alarcón; R. Ferrera-Cerrato. Estado de México, MX. MUNDI-PRENSA S.A. de C.V. p. 56-68.

SIEVERDING, E. 1991. Vesicular-arbuscular: Mycorrhiza management in tropical agrosystems. Eschborn, DE. Technical Cooperation-Federal Republic of Germany. 370 p.

8. ANEXOS

Anexo 1 DETALLES EXPERIMENTALES

Sustratos

M1 = Suelo Rojo:Arena (SR:A), proporción 3:1

M2 = Suelo Rojo:Suelo Agrícola (SR:SA), proporción 3:1

T = Testigo Suelo Agrícola:Arena (SA:A), proporción 2:1

Niveles de Corrección de pH con adición de calcio

P1 = Nivel bajo (10 ppm)
corrección (g/kg mezcla)

P2 = Nivel medio (30 ppm)
corrección (g/kg mezcla)

P3 = Nivel alto (60 ppm)

Fósforo

C1 = sin

C2 = con

Tratamientos

1 = **M1** + **C1** + **P1**

2 = **M1** + **C1** + **P2**

3 = **M1** + **C1** + **P3**

4 = **M1** + **C2** + **P1**

5 = **M1** + **C2** + **P2**

6 = **M1** + **C2** + **P3**

7 = **M2** + **C1** + **P1**

8 = **M2** + **C1** + **P2**

9 = **M2** + **C1** + **P3**

10 = **M2** + **C2** + **P1**

11 = **M2** + **C2** + **P2**

12 = **M2** + **C2** + **P3**

Diseño experimental

Parcela Sub-subdivididas

Parcela-principal = Mezcla

Sub-parcela = Corrección de Ca

Sub-subparcela= Niveles de P

Anexo 2

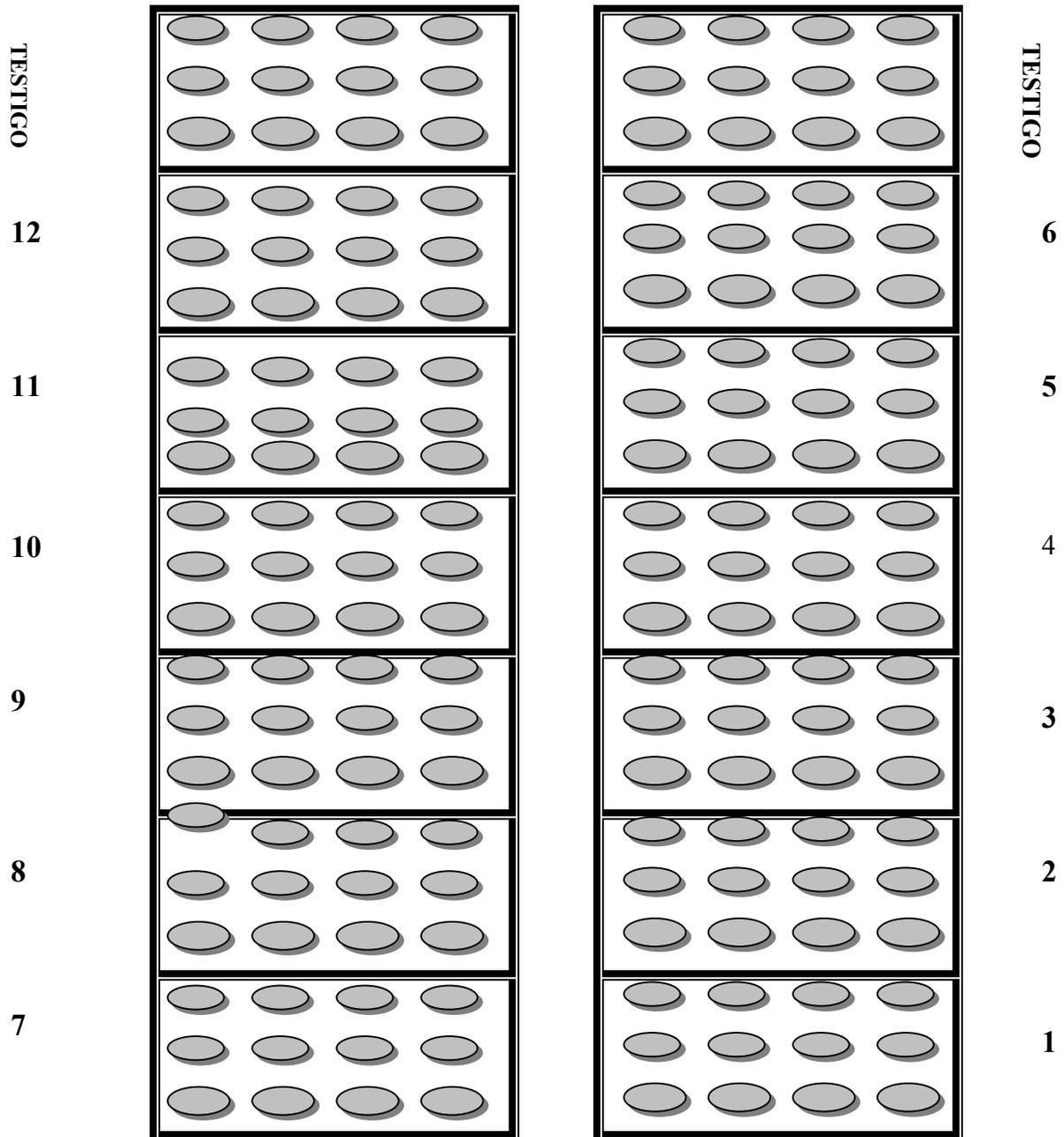
DISTRIBUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS EN LAS CAMAS DE PRODUCCIÓN DE INÓCULO DE MICORRIZAS.

R I		R II		R III		TESTIGO
6	12	1	5	3	8	
5	11	4	9	12	6	
4	10	10	2	2	10	
3	9	7	11	7	1	
2	8	12	8	9	11	
1	7	3	6	4	5	

Tratamientos (sustratos)	
1= M1+C1+P1	7= M2+C1+P1
2= M1+C1+P2	8= M2+C1+P2
3= M1+C1+P3	9= M2+C1+P3
4= M1+C2+P1	10= M2+C1+P1
5= M1+C2+P2	11= M2+C2+P2
6= M1+C2+P3	12= M2+C2+P3

Anexo 3

DISTRIBUCIÓN DE TRATAMIENTOS PARA LA PRODUCCIÓN DE INÓCULO DE MICORRIZAS EN MACETEROS BAJO INVERNADERO.



Anexo 4**MÉTODO PARA CLARIFICAR Y TEÑIR MUESTRAS DE RAÍCES****SUGERENCIAS:**

- A. Utilizar equipo apropiado para mayor seguridad y protección personal (anteojos, guantes y delantal).
- B. Utilizar “cassettes” plásticos (denso polymer tissue “cassettes” de Fisher Scientific) para retener las muestras de raíces.
- C. Todas las etapas que incluyan calentamiento de químicos deben ser manejadas y supervisadas cuidadosamente.
- D. Lea cuidadosamente todas las instrucciones antes de empezar el proceso

PROCEDIMIENTO DE CLARIFICACIÓN:

1. Prepare los “cassettes” con muestras de raíces y manténgalos en agua hasta que todo esté listo para iniciar el proceso.
2. En un “beaker”, vierta una solución de KOH al 10% de modo que cubra todos los cassettes.
3. Caliente el KOH hasta 80 °C de temperatura.
4. Coloque los cassettes en el KOH caliente durante:
5. 15 minutos para cebolla y otras raíces tiernas,
6. 30 minutos para la mayoría de raíces (p.e. maíz, gramíneas)
7. Lave con agua cinco veces.

NOTA: Si las muestras de raíces tienen pigmentos oscuros (p.e. cafés, negros, morados) después de clarificarlas con KOH, coloque los cassettes en un beaker con 30% de agua oxigenada a temperatura ambiente (10 minutos a ≤ 50 °C) hasta que las muestras se aclaren. Revíselas constantemente para evitar daños en las estructuras de las raíces. Enjuague cinco veces con agua y proceda. En caso de no tener agua oxigenada, cubra los cassettes con HCl (5.0 ml) y agua (200 ml). Mezcle y desagüe. Repítalo otra vez (no enjuague los cassettes con agua).

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN:

1. En un beaker, vierta suficiente cantidad de Azul de Tripano (0.05%) para cubrir los cassettes.
2. Caliente el tinte azul sin los cassettes hasta 80 °C de temperatura.
3. Coloque los cassettes en el tinte caliente y mantenga la temperatura en 80 °C. Después de 30 minutos, deje enfriar hasta que la temperatura sea menor de 50 °C;

luego filtre el tinte para remover pedazos de raíces y almacénelo bajo refrigeración en un frasco. Enjuague los cassettes una sola vez con agua.

4. En una placa, monte varias raíces para su observación y cúbralas con el cubreobjetos presionando levemente. Las raíces se deben manipular con pinzas y guantes ya que el tinte es cancerígeno. En caso de no visualizar claramente las estructuras del hongo, coloque las raíces en un plato de petri con agua para enjuagarlas y luego observe.
5. Si no se van a analizar las muestras el mismo día, colóquelas en el refrigerador en una bolsa plástica etiquetada.

PREPARACIÓN DEL TINTE AZUL DE TRIPANO (0.05%)

En un frasco, añada y mezcle constantemente los ingredientes en el siguiente orden:

- 1) 800 ml glicerina
- 2) 800 ml ácido láctico
- 3) 800 ml agua destilada
- 4) 1.2 g del tinte Azul de Tripano

Método por:

JARSTFER, A.G. 1970. University of Florida, Soil Science Department, 2171 McCarty Hall, Gainesville, FL 32611-0151 USA.

CUIDADOS:

- Entre cada muestra, lave los tamices con agua a presión para evitar contaminación. En caso de ser necesario, use jabón.
- Las esporas pueden ser contadas fácilmente en un plato de petri dividido en cuadrículas.
- Recupere las raíces recolectadas en el tamiz más grande para observar los propágulos del hongo y/o el grado de colonización.
- Normalmente se usa el tamiz de 425 micrones para recolectar esporas de tamaños desconocidos provenientes de muestras del campo.
- El KOH y el Azul de Tripano pueden ser reutilizados.

Anexo 5**MÉTODO PARA EL AISLAMIENTO DE ESPORAS****SUGERENCIAS:**

- A. Utilizar equipo apropiado para mayor seguridad y protección personal (anteojos, guantes y delantal).
- B. Todas las etapas que incluyan calentamiento de químicos deben ser manejadas y supervisadas cuidadosamente.

PROCEDIMIENTO

1. Seleccione en el campo un cultivo de interés y obtenga una muestra compuesta (varias submuestras) de por lo menos 100 g de suelo o medio de crecimiento.
2. En el laboratorio, pese 100 g de la muestra de suelo o medio de crecimiento recolectado para iniciar el proceso lo más pronto posible para evitar la desecación de las esporas.
3. Vacíe esta submuestra en un envase de 4.0 L y, utilizando una manguera delgada, aspérgela con un fuerte chorro de agua para separar las partículas de suelo. Llénelo hasta 3.0 L y deje reposar por 15–30 segundos (suelos arenosos requieren menos tiempo).
4. Coloque tres tamices (425, 250 y 75 micrometros) uno sobre otro con el de mayor número de micrometros encima, para extraer las esporas.
5. Vacíe la mezcla sin perturbar el sedimento y pásela por los tamices. Repita el proceso una vez. El tamaño del tamiz refleja el tamaño de las esporas deseadas; así, esporas de *Glomus etunicatum* pueden ser recolectadas en un tamiz de 63 micrones, las cuales estarán relativamente libres de material inerte si antes se usa un tamiz de 200 micrones.
6. Transfiera el material filtrado a un tubo para centrifugación con 50 ml de capacidad. Use un embudo pequeño de chorro fino para evitar pérdidas del material filtrado. Enjuague cuidadosamente el tamiz para recolectar la mayoría de las esporas en los tubos. De ser necesario, añada agua hasta aproximadamente un centímetro del borde del tubo.
7. Centrifugue a 3000 rpm por 3 minutos ó 2000 rpm por 5 minutos. No utilice el freno de la centrifuga. Vacíe la mezcla en solución sin perturbar el sedimento (las esporas están mezcladas con el sedimento).
8. Al tubo con sedimento, agregue una solución de sucrosa al 40% (p/v). Agite hasta que el sedimento quede en suspensión y centrifugue inmediatamente a 3000 rpm por

un minuto. No utilice el freno de la centrífuga. Vacíe la solución en un tamiz de 45 micrometros evitando salpicar agua. Enjuague las esporas cuidadosamente durante un minuto para remover la sucrosa y evitar deshidratación. Elimine el sedimento.

9. Transfiera las esporas a un tubo para centrífuga y afofe a 25 ml.
10. Coloque 1.0 ml de la solución con esporas en un plato de petri plástico de 5 cm de capacidad. Observe en el estereoscopio. Si desea guardar la solución con esporas, séllela con papel parafinado y almacénela en el refrigerador a 4 °C.

Método adaptado de:

JARSTFER, A.G. 1963. University of Florida, Soil Science Department, 2171 McCarty Hall, Gainesville, FL 32611-0151 USA. Plant Dis. Rep. 48:692.