

**Renovación de cuatro cepas de micorriza vesículo
arbuscular en cultivo de perejil (*Petroselinum
crispum*) y pasto marandú (*Brachiaria brizantha*)
en macrotúnel, Zamorano, Honduras**

Ingrid Magaly Rivera Reyes

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Renovación de cuatro cepas de micorriza vesículo
arbuscular en cultivo de perejil (*Petroselinum
crispum*) y pasto marandú (*Brachiaria brizantha*)
en macrotúnel, Zamorano, Honduras**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera Agrónoma en el grado
Académico de Licenciatura

Presentado por:

Ingrid Magaly Rivera Reyes

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2016

Renovación de cuatro cepas de micorriza vesículo arbuscular en cultivo de perejil (*Petroselinum crispum*) y pasto marandú (*Brachiaria brizantha*) en macrotúnel, Zamorano, Honduras

Ingrid Magaly Rivera Reyes

Resumen. Las micorrizas son hongos asociados a la raíz de las plantas que actúan como hongos benéficos y viven en simbiosis con las plantas. Una simbiosis es una convivencia entre dos organismos generalmente con ventaja mutua. Las micorrizas vesículo arbusculares son un tipo de ellas, que permite mejorar el crecimiento y enfrentar las deficiencias nutricionales con mejor respuesta a situaciones adversas. El objetivo fue evaluar la eficiencia de las cepas de micorriza *Glomus sp.* (M7), *Acaulospora sp.* (M8), *Entrophospora sp.* (SE3) y *Glomus etunicatum* (SECRA) en las plantas de pasto marandú (*Brachiaria brizantha*) y perejil (*Petroselinum crispum*) producidos en macrotúnel. El estudio se llevó a cabo de Julio a Septiembre de 2016. Se utilizaron 40 esporas de inoculante por cada 100 gramos de sustrato de suelo esterilizado, aplicando el 100% en las macetas. En pasto marandú todas las cepas de micorriza desarrollaron un mejor desempeño, comparado con las no micorrizadas. De las cuatro cepas, M7, M8 y SE3 obtuvieron el mismo desempeño; mientras que la cepa SECRA su desempeño fue menor, pero superior al tratamiento no micorrizado. Perejil se determinó que no es un cultivo que se asocia con las micorrizas sino que la rechaza y por lo tanto no se recomienda utilizarlo en conjunto con el hongo debido a que no existirá ninguna diferencia en los resultados.

Palabras clave: Biofertilizante, bioprotector, biotecnología.

Abstract. Mycorrhizae are a kind of fungi associated with plant roots acting as beneficial fungi living in symbiosis with plants. A symbiosis is a coexistence between two organisms with mutual benefit. Vesicular arbuscular mycorrhizae are a type of them, which improves the growth and face nutritional deficiencies better to adverse situations. The objective was to evaluate the efficiency of mycorrhiza strains *Glomus sp.* (M7), *Acaulospora sp.* (M8), *Entrophospora sp.* (SE3) y *Glomus etunicatum* (SECRA) in Marandú grass plants (*Brachiaria brizantha*) and parsley (*Petroselinum crispum*) produced in macrotunnels. The study was conducted from July to September 2016. 40 spores' inoculums were used per 100 grams of sterilized soil substrate, applying 100% in the pots. Marandú grass developed (in all strains of mycorrhizae) a better performance compared with non-mycorrhizal treatments. Of the four strains, M7, M8 and SE3 obtained the same performance; while strain SECRA performance was lower, but not superior to treatment with no mycorrhiza. Parsley was determined that it is not a crop that is associated with mycorrhizae and also rejects it, therefore is not recommended for use in conjunction with mycorrhiza because there will be no difference in results.

Key words: Biofertilizer, bioprotector, biotechnology.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros y anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
4. CONCLUSIONES	10
5. RECOMENDACIONES	13
6. LITERATURA CITADA.....	14
7. ANEXOS	16

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Tratamientos en cultivos hospederos perejil (<i>Petroselinum crispum</i>) y pasto marandú (<i>Brachiaria brizantha</i>).	4
2. Altura del tallo (cm) en plantas de pasto marandú (<i>Brachiaria brizantha</i>) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.	5
3. Incremento en el largo de la hoja (cm) en plantas de pasto marandú (<i>Brachiaria brizantha</i>) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.....	6
4. Porcentaje de humedad (%) en parte aérea y raíces en plantas de pasto marandú (<i>Brachiaria brizantha</i>) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.	6
5. Peso seco en parte aérea y raíces en plantas de pasto marandú (<i>Brachiaria brizantha</i>) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.	7
6. Número de esporas y porcentaje de infección de raíces en plantas de pasto marandú (<i>Brachiaria brizantha</i>) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.	8
7. Incremento en altura en plantas de perejil (<i>Petroselinum crispum</i>) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.	8
8. Incremento en número de brotes en plantas de perejil (<i>Petroselinum crispum</i>) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.	9
9. Porcentaje de humedad (%) en parte aérea y raíces en plantas de perejil (<i>Petroselinum crispum</i>) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.....	9
10. Peso seco en parte aérea y raíces en plantas de perejil (<i>Petroselinum crispum</i>) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras	10
11. Número de esporas y porcentaje de infección de raíces en plantas de perejil (<i>Petroselinum crispum</i>) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.....	10

Anexos	Página
1. Procedimiento para clarificar y teñir muestras de raíces (Jarstfer 1970).	16
2. Procedimiento para aislar esporas de micorriza (Jarstfer 1963).	17

1. INTRODUCCIÓN

Han pasado 131 años desde que se acuñó por primera vez el término "Micorriza". En 1885 las hipótesis y observaciones planteadas por el botánico alemán Albert Bernhard Frank iban en contra del pensamiento convencional de la época. Sin embargo, su capacidad intuitiva lo llevó a plantear la hipótesis que las micorrizas representan una simbiosis mutualista en la que el hongo y su huésped dependen nutricionalmente uno del otro (Trappe 2005). Las asociaciones simbióticas mutualistas que son desarrolladas entre determinados hongos del suelo y raíces de plantas superiores es la definición de lo que hoy en día conocemos como micorrizas (Barea 1988). El mejor beneficio de las plantas recibido por las micorrizas consiste en el incremento en cuanto a absorción del elemento fósforo cuando éste es limitante produciendo así un mayor crecimiento en la planta infectada (Blanco y Salas 1997).

Las micorrizas están divididas en ectomicorrizas y endomicorrizas. Del total de especies vegetales que existen, el 96% pertenecen al tipo Micorriza Vesículo Arbuscular (MVA) (Barea 1988). De hecho, es más sencillo enumerar las especies no micorrizables a las que sí lo son. Con excepción de la Antártida, las MVA se encuentran en condiciones naturales repartidas en todos los continentes. No importa el tipo de suelo (suelos de minas abandonadas, suelos agrícolas, suelos de pantanos y hábitats acuáticos) las MVA pueden encontrarse en cualquiera de ellos (Pérez *et al.* 2011).

El pasto marandú tiende a desarrollarse en valles, sabanas, bosques abiertos y bancos de ríos. Es originario de África tropical y es muy tolerante a la sequía, es por ésta razón que es comúnmente utilizado en regiones que tiene largos periodos secos y reciben más de 400 mm de lluvia, "Los pastos son un componente esencial en las producciones ganaderas, pero no se conoce mucho sobre la relación simbiótica de las micorrizas con los pastos" (Lizama y Vásquez 2001). Este cultivo es un modelo típico para usarse en conjunto con la micorriza. A razón de ser producido en lugares áridos, la micorriza podría ser un fuerte aliado para tolerar la sequía e incrementar su desarrollo.

Por otra parte, existen pocos estudios en dónde se evidencie la relación de la micorriza con el perejil. Este cultivo es una hortaliza que proviene de la familia Apiaceae, es susceptible a sequías, pero se adapta muy bien a heladas, capaz de crecer en sombra pero adaptable a la gran mayoría de condiciones climáticas (Reyes *et al.* 2012).

Actualmente, el mundo se está impulsando a través de una agricultura sostenible que evite la contaminación ambiental. Una alternativa es el uso de tecnologías agrícolas como biofertilizantes, en este caso la MVA, que nos ayude a mejorar la fertilidad del suelo

evitando el uso excesivo de fertilizantes químicos con el fin de preservar el balance ambiental (Sierra 2008).

Es claro que se debe idear un nuevo sistema de producción vegetal armónico tomando en cuenta los grandes logros y descubrimientos obtenidos de la agricultura mundial. La micorriza tiene un futuro excelente, forma parte de una nueva tecnología para la agricultura sostenible. La producción vegetal en estos tiempos debe ser integral y menos contaminante, hay que tener en cuenta que la micorriza realiza la más importante simbiosis en los sistemas agroecológicos (Pérez *et al.* 2011).

Los objetivos de este estudio fue renovar cuatro cepas de micorriza vesículo arbuscular: *Glomus sp.* (M7), *Acaulospora sp.* (M8), *Entrophospora sp.* (SE3) y *Glomus etunicatum* (SECRA) para su mantenimiento y propagación en el programa de micorriza de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Determinar la viabilidad de cuatro cepas MVA y comparar la efectividad de la inoculación de cuatro cepas MVA en los cultivos de perejil y pasto marandú.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El experimento se realizó en los macrotúneles del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), Zamorano; ubicada a 30 km de Tegucigalpa, Honduras. La misma se encuentra a 800 msnm, con una temperatura promedio anual de 24 °C y una precipitación anual de 1,100 mm.

Inóculo. Se analizó el contenido de esporas de los inoculantes de las cepas de micorriza antes de instalar las plantas en el macrotúnel. Se ajustó la dosis a aplicar de 40 esporas por cada 100 gramos de sustrato en cada uno de los maceteros. Las cepas de micorriza: M7, M8, SE3 y SECRA estuvieron almacenadas en bodega con AA a 17 °C.

Medio de crecimiento. Se utilizó una mezcla en relación 2:1 v/v, de suelo franco arenoso y arena. Se analizó en el Laboratorio de Suelos Zamorano para determinar si el sustrato fue apto para la producción de micorrizas. Se aseguró no tener más de 30 ppm de fósforo, para no crear una limitante para el buen desarrollo del hongo (Andrade *et al.* 2005).

Inoculación. Las plántulas, provenientes del vivero de la Unidad de Ornamentales de la EAP Zamorano, se trasplantaron a maceteros de plástico con capacidad de 1840 cm³ cada uno. El sustrato se inoculó en el momento del trasplante poniendo la cepa al fondo del pilón de la raíz de la plántula.

La plantación. Una vez las plantas se sembraron, se regó dos veces al día y las malezas se controlaron de forma manual. El tiempo de crecimiento de las plantas en el macrotúnel fue desde Julio a Septiembre de 2016.

Variables medidas. Se midió la altura, peso seco y porcentaje de humedad de la parte aérea de la planta y de la raíz en ambos cultivos. En perejil se midió el número de brotes y en pasto marandú la altura del tallo. Al final del experimento se midió el número de esporas en el sustrato y el porcentaje de infección de raíces por medio del método de tinción de raíces en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada del PIF (Jarstfer 1970).

El peso seco de la parte aérea y de la raíz de la planta se determinó por medio de un horno a temperatura de 80 °C durante 48 horas.

Tratamientos. Fueron cinco tratamientos constituidos por un tratamiento testigo, dos tratamientos de cepas del género *Glomus sp*, un tratamiento de cepa del género *Acaulospora sp* y un tratamiento de cepa del género *Entrophosphora sp* en los cultivos de perejil y pasto marandú (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos en cultivos hospederos perejil (*Petroselinum crispum*) y pasto marandú (*Brachiaria brizantha*).

Cultivo	Tratamientos
Pasto Marandú	CEPA <i>Glomus etunicatum</i> (SECRA)
	CEPA <i>Entrophosphora sp.</i> (SE3)
	CEPA <i>Acaulospora sp.</i> (M8)
	CEPA <i>Glomus sp.</i> (M7)
	Testigo sin inóculo
Perejil	CEPA <i>Glomus etunicatum.</i> (SECRA)
	CEPA <i>Entrophosphora sp.</i> (SE3)
	CEPA <i>Acaulospora sp.</i> (M8)
	CEPA <i>Glomus sp.</i> (M7)
	Testigo sin inóculo

Diseño experimental y análisis estadístico. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (BCA) con cinco tratamientos y cinco repeticiones. Los análisis de varianza (ANDEVA) y las separaciones de medias mediante la prueba DMS a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$, con el programa Statistix 8.1 (USDA 2007).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pasto marandú.

Altura del tallo. En las primeras semanas de crecimiento no hubo diferencia significativa hasta la semana ocho dónde la cepa *Glomus et.* (SECRA) obtuvo resultados menores comparado a las cepas *Glomus sp.* (M7), *Acaulospora sp.* (M8) y *Entrophosphora sp.* (SE3) pero mayores al testigo sin inóculo. En la semana nueve no hubo diferencia entre las cepas seleccionadas, pero el tratamiento testigo mostró un menor crecimiento en cuanto a la variable altura. Cabe recalcar que la cepa que obtuvo resultados superiores en cuanto a variable altura fue la *Acaulospora sp.* (M8) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Altura del tallo (cm) en plantas de pasto marandú (*Brachiaria brizantha*) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.

Cepa	Semanas después de trasplante			
	2	4	8	9
<i>Glomus etunicatum</i> (SECRA)	16.7	36.4	71.1 ab [‡]	78.9 a
<i>Entrophosphora sp.</i> (SE3)	16.8	35.6	78.5 a	84.1 a
<i>Acaulospora sp.</i> (M8)	16.8	38.5	78.1 a	85.7 a
<i>Glomus sp.</i> (M7)	17.3	37.6	76.0 a	82.6 a
Testigo sin inóculo	16.4	37.2	63.7 b	70.3 b
Coefficiente de Variación	10.4	16.1	14.9	12.4
Probabilidad	0.74ns	0.73ns	0.00*	0.00*

[‡] Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

*Significativo ($P \leq 0.05$) y ns no significativo.

Largo de la hoja. No hubo diferencia significativa en la variable largo de la hoja pero sin embargo se puede observar que en semana cuatro el tratamiento *Entrophosphora sp.* (SE3) obtuvo un menor crecimiento con respecto a las demás cepas. En cambio, en semana nueve la cepa *Entrophosphora sp.* (SE3) mejoró su desempeño inicial, mostrando un mayor crecimiento. También se presentó un menor crecimiento del tratamiento testigo y un crecimiento constante en las cepas *Glomus sp.* (M7), y *Glomus et.* (SECRA). Los resultados concuerdan con los obtenidos en plantas delagos tomate inoculadas con cepa SE3 (*Entrophosphora sp.*), cepas M7 y C4 (*Glomus sp.*), cepa M8 (*Acaulospora sp.*) y Mycoral® 2008 y 2009 donde las plantas inoculadas con SE3 y Mycoral® 2009 obtuvieron el mayor incremento de altura (Lagos Molina 2010).

En pasto marandú (*Brachiaria brizantha*) hay un claro efecto en el crecimiento y el tamaño de las hojas por efecto de la inoculación de todas las cepas seleccionadas respecto al testigo sin inoculación (Cuadro 3).

Cuadro 3. Incremento en el largo de la hoja (cm) en plantas de pasto marandú (*Brachiaria brizantha*) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.

Cepa	Semanas después de trasplante			
	2	4	8	9
<i>Glomus etunicatum</i> (SECRA)	59.4	55.2	123.0	126.1
<i>Entrophosphora sp.</i> (SE3)	55.4	51.4	126.1	129.9
<i>Acaulospora sp.</i> (M8)	59.0	57.8	125.0	131.2
<i>Glomus sp.</i> (M7)	58.9	56.6	122.4	126.6
Testigo sin inóculo	57.7	57.1	120.0	122.2
Coefficiente de Variación	9.5	12.6	7.9	7.4
Probabilidad	0.27ns	0.11ns	0.48ns	0.09ns

‡ Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

*Significativo ($P \leq 0.05$) y ns no significativo.

Humedad en la planta. No hubo diferencias en el porcentaje de humedad en la parte aérea y en las raíces entre los cinco tratamientos. Sin embargo, la cepa *Glomus et.* (SECRA) generó mayor humedad tanto en la parte aérea como en la zona radicular comparada al resto de los tratamientos. Por lo tanto, la humedad en la planta es influenciada por las cepas seleccionadas del estudio (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de humedad (%) en parte aérea y raíces en plantas de pasto marandú (*Brachiaria brizantha*) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.

Cepa	Humedad parte aérea (%)	Humedad de raíces (%)
<i>Glomus etunicatum</i> (SECRA)	71.0	80.4
<i>Entrophosphora sp.</i> (SE3)	69.1	81.2
<i>Acaulospora sp.</i> (M8)	68.8	79.4
<i>Glomus sp.</i> (M7)	69.1	81.1
Testigo sin inóculo	68.6	79.2
Coefficiente de Variación	1.5	2.7
Probabilidad	0.10ns	0.72ns

‡ Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

*Significativo ($P \leq 0.05$) y ns no significativo.

Peso seco de la planta. Hubo diferencias de peso seco en la parte aérea pero no en las raíces de las plantas de pasto marandú. En cuanto a peso seco en la parte aérea de la planta no hubo diferencia entre el testigo sin inóculo, la cepa *Entrophosphora sp.* (SE3) y la cepa *Glomus et.* (SECRA). En cambio la cepa *Glomus sp.* (M7) tuvo mayor incremento en peso

comparado a los tres tratamientos anteriores pero no mayor a la cepa *Acaulospora sp.* (M8) que presentó los mejores pesos comparado al resto de los tratamientos.

Difiere del estudio obtenido por (Guerra González 2009) quién encontró mayor peso seco en raíces, tallos, y hojas con las cepas *Glomus sp.* (M7 y C4) que fueron superiores a la cepa *Acaulospora sp.* (M8), pero similares a los de la cepa de *Entrophospora sp.* (SE3) y el testigo si inóculo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Peso seco en parte aérea y raíces en plantas de pasto marandú (*Brachiaria brizantha*) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.

Cepa	Peso seco parte aérea (g)	Peso seco raíces (g)
<i>Glomus etunicatum</i> (SECRA)	12.5 b [‡]	3.1
<i>Entrophospora sp.</i> (SE3)	11.0 b	2.2
<i>Acaulospora sp.</i> (M8)	17.8 a	4.2
<i>Glomus sp.</i> (M7)	14.0 ab	2.3
Testigo sin inóculo	12.3 b	2.7
Coefficiente de Variación	16.1	35.0
Probabilidad	0.04*	0.18ns

[‡] Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

*Significativo ($P \leq 0.05$) y ns no significativo.

Esporas en el sustrato e infección de raíces. Al final del estudio no hubo diferencia significativa entre los tratamientos al contar las esporas en el sustrato pero sí existió diferencia en el porcentaje de infección de raíces. La cepa *Glomus et.* (SECRA) obtuvo los valores más altos tanto para el número de esporas como para el porcentaje de infección de raíces con respecto al resto de los tratamientos.

El porcentaje de esporas en todos los casos fue alto, más de 30 esporas/gramo inclusive en el tratamiento testigo, sin embargo las cepas seleccionadas presentan más del doble del número de esporas con respecto al testigo, en especial la cepa *Glomus et.* (SECRA). El porcentaje de infección de raíces es mediano en la cepa *Entrophospora sp.* (SE3) y alto en la cepa *Glomus et.* (SECRA), las otras cepas seleccionadas a pesar de su alto número de esporas no presenta una infección que se relacione. El testigo no inoculado tiene esporas en el sustrato lo cual evidencia la presencia de esporas de micorriza nativa en el suelo resistentes a la esterilización pero sin ningún efecto eficaz como el de las cepas seleccionadas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Número de esporas y porcentaje de infección de raíces en plantas de pasto marandú (*Brachiaria brizantha*) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.

Cepa	Número de esporas/100 g suelo	Infección (%)
<i>Glomus etunicatum</i> (SECRA)	81.0	45.2 a [‡]
<i>Entrophosphora sp.</i> (SE3)	74.7	26.7 ab
<i>Acaulospora sp.</i> (M8)	62.7	12.4 bc
<i>Glomus sp.</i> (M7)	54.7	4.8 bc
Testigo sin inóculo	39.3	2.4 c
Coeficiente de Variación	53.1	69.3
Probabilidad	0.59ns	0.02*

[‡] Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

*Significativo ($P \leq 0.05$) y ns no significativo.

A = alto (> 30 esporas/gramo; > 30% infección), M = medio (21-30 esporas/gramo; 21-30% infección), B= bajo (< 20 esporas/gramo; < 20% infección).

Perejil.

Altura. No hubo diferencia en las primeras semanas de cultivo. Sin embargo, en semana seis y siete la cepa *Acaulospora sp.* (M8) obtuvo los mayores incrementos, mientras que el testigo sin inóculo y la cepa *Glomus et.* (SECRA) obtuvieron los menores incrementos en cuanto a la variable altura de la planta (Cuadro 7).

Cuadro 7. Incremento en altura en plantas de perejil (*Petroselinum crispum*) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.

Cepa	Semanas después de trasplante		
	2	6	7
<i>Glomus etunicatum</i> (SECRA)	7.9	14.4 b [‡]	15.1
<i>Entrophosphora sp.</i> (SE3)	7.4	15.2 ab	15.6
<i>Acaulospora sp.</i> (M8)	7.5	16.1 a	16.4
<i>Glomus sp.</i> (M7)	7.3	15.1 ab	15.4
Testigo sin inóculo	7.4	14.3 b	14.8
Coeficiente de Variación	18.0	10.7	10.2
Probabilidad	0.73ns	0.02*	0.10ns

[‡] Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

*Significativo ($P \leq 0.05$) y ns no significativo.

Número de brotes. Durante todo el estudio el mayor número de brotes lo obtuvo la cepa M8 (*Acaulospora sp.*) y el menor número de brotes el tratamiento testigo sin inóculo. El resto de los tratamientos se mantuvieron constantes pero sin valores menores al tratamiento sin inóculo (Cuadro 8).

Cuadro 8. Incremento en número de brotes en plantas de perejil (*Petroselinum crispum*) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.

Cepa	Semanas después de trasplante		
	2	6	7
<i>Glomus etunicatum</i> (SECRA)	5.1	6.9 b [‡]	7.6 b
<i>Entrophosphora sp.</i> (SE3)	5.2	7.5 ab	7.9 ab
<i>Acaulospora sp.</i> (M8)	5.1	7.7 a	8.3 a
<i>Glomus sp.</i> (M7)	5.0	6.9 b	7.4 bc
Testigo sin inóculo	5.1	6.2 c	6.9 c
Coefficiente de Variación	21.0	12.6	11.9
Probabilidad	0.99ns	0.00*	0.00*

[‡] Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

*Significativo ($P \leq 0.05$) y ns no significativo.

Humedad en la planta. No hubo diferencias en el porcentaje de humedad en raíces ni en la parte aérea de las plantas entre los cinco tratamientos, por lo que no hubo ningún efecto por parte de las cepas seleccionadas. El mayor porcentaje de humedad en ambos casos lo obtuvo la cepa *Glomus sp.* (M7) y el menor porcentaje fue obtenido por la cepa *Glomus et.* (SECRA). Difiere de los resultados obtenidos en el pasto marandú dónde el mejor desempeño lo obtuvo la cepa *Glomus et.* SECRA (Cuadro 9).

Cuadro 9. Porcentaje de humedad (%) en parte aérea y raíces en plantas de perejil (*Petroselinum crispum*) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.

Cepa	Humedad parte aérea (%)	Humedad de raíces (%)
<i>Glomus etunicatum</i> (SECRA)	84.0	88.8
<i>Entrophosphora sp.</i> (SE3)	84.2	91.2
<i>Acaulospora sp.</i> (M8)	84.0	88.8
<i>Glomus sp.</i> (M7)	85.1	90.4
Testigo sin inóculo	84.2	92.0
Coefficiente de Variación	0.7	2.9
Probabilidad	0.19ns	0.49ns

[‡] Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

*Significativo ($P \leq 0.05$) y ns no significativo.

Peso seco de la planta. El menor peso fue obtenido por el tratamiento testigo sin inóculo y el mayor peso de la cepa *Acaulospora sp.* (M8). No hubo diferencia en peso seco de la parte aérea de las plantas ni en el peso seco de las raíces (Cuadro 10).

Cuadro 10. Peso seco en parte aérea y raíces en plantas de perejil (*Petroselinum crispum*) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.

Cepa	Peso seco parte aérea (g)	Peso seco raíces (g)
<i>Glomus etunicatum</i> (SECRA)	2.0	0.3
<i>Entrophosphora sp.</i> (SE3)	2.5	0.3
<i>Acaulospora sp.</i> (M8)	2.0	0.4
<i>Glomus sp.</i> (M7)	1.4	0.2
Testigo sin inóculo	1.6	0.1
Coeficiente de Variación	33.1	43.2
Probabilidad	0.35ns	0.23ns

¥ Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

*Significativo ($P \leq 0.05$) y ns no significativo.

Esporas en el sustrato e infección de raíces. Cada maceta del experimento fue inoculada con cuarenta esporas por cada cien gramos de sustrato, al final del experimento se puede observar que en perejil el número de esporas bajó y esto se le atribuye a que la planta de perejil es un cultivo no a fin a la micorriza. En cuanto al porcentaje de infección, las plantas inoculadas con la cepa *Glomus sp.* (M7) y las no inoculadas, obtuvieron el mayor porcentaje de infección. No hubo diferencia entre las cepas *Acaulospora sp.* (M8), *Entrophosphora sp.* (SE3) y *Glomus et.* (SECRA) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Número de esporas y porcentaje de infección de raíces en plantas de perejil (*Petroselinum crispum*) inoculadas con cuatro cepas de micorriza arbuscular. Zamorano, Honduras.

Cepa	Número de esporas/100 g suelo	Infección (%)
<i>Glomus etunicatum</i> (SECRA)	6.3	0.0
<i>Entrophosphora sp.</i> (SE3)	8.7	0.5
<i>Acaulospora sp.</i> (M8)	8.7	0.0
<i>Glomus sp.</i> (M7)	4.3	1.4
Testigo sin inóculo	4.7	3.8
Coeficiente de Variación	98.0	154.2
Probabilidad	0.86ns	0.13ns

¥ Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

*Significativo ($P \leq 0.05$) y ns no significativo.

A = alto (> 30 esporas/gramo; > 30% infección), M = medio (21-30 esporas/gramo; 21-30% infección), B= bajo (< 20 esporas/gramo; < 20% infección).

El testigo sin inóculo presentó esporas en el sustrato (igual que en pasto marandú) lo cual nos indica la presencia de esporas de micorriza nativa (no seleccionada) en el suelo, resistentes a la esterilización, pero sin presentar ningún efecto positivo como el que se mostró por parte de las cepas seleccionadas. A pesar que puede perjudicar el estudio es prácticamente imposible eliminar por completo las micorrizas nativas presentes en el suelo debido a que éstas se encuentran distribuidas en todos los ambientes de forma natural. Las

micorrizas nativas también pueden crear competencia con las seleccionadas si éstas tienen una capacidad de infección inferior o si el número de esporas es demasiado bajo.

4. CONCLUSIONES

- Se renovaron los cuatro tipos de cepas micorriza vesículo arbusculares las cuáles se mantendrán almacenadas, en mantenimiento y serán renovadas constantemente.
- El pasto marandú es una especie micorrizable, las cepas seleccionadas tienen un efecto positivo en el desempeño del cultivo. El perejil no es una especie a fin a la micorriza, por lo tanto no se recomienda usarlo para renovación de cepas.
- Existe preferencia entre diferentes tipos de micorriza y diferentes especies de plantas, pero todas las micorrizas mejoraron el crecimiento de los dos cultivos en un grado más alto comparado al testigo.

5. RECOMENDACIONES

- Asegurarse de esterilizar bien el sustrato dónde se va a inocular las cepas para evitar contaminación de micorrizas nativas.
- Inocular las cepas desde el momento de la germinación de la planta para observar y medir los efectos que podrían tener éstas.
- Probar nuevas cepas y sus efectos en otro tipo de cultivos.

6. LITERATURA CITADA

- Andrade SA, Jorge RA, Silveira A. 2005. Cadmium effect on the association of jackbean (*Canavalia ensiformis*) and arbuscular mycorrhizal fungi. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)*. 62(4):389–394. doi:10.1590/S0103-90162005000400013.
- Barea JM. 1988. Las micorrizas y la protección de cultivos. *Horticultura: Revista de industria, distribución y socio economía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros*. (39):36–47. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/citart?info=link&codigo=2600999&orden=0>.
- Blanco Rojas FA, Salas Alvarado E. 1997. Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 21, 1, 55-67. <http://www.biodiversitylibrary.org/part/133244>.
- Guerra González JE. 2009. Evaluación de cuatro cepas comerciales de micorriza vesículo arbuscular seleccionadas en *Switenia sp* en etapa de vivero en Zam; [consultado 2016 Sep 26]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/368/1/T2768.pdf>.
- Jarstfer, AG. 1970. Método para tinción de raíces. University of Florida, Soil Science Department, 2171 McCarty Hall, Gainesville, FL 32611-0151 USA.
- Jarstfer, AG. 1963. University of Florida, Soil Science Department, 2171 McCarty Hall, Gainesville, FL 32611-0151 USA. *Plant Dis. Rep.* 48:692.
- Lagos Molina SM. 2010. Evaluación de cuatro cepas de micorriza arbuscular en plantas de tomate en vivero, Zamorano, Honduras: Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras; [consultado 2016 Sep 20]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/605/1/T2951.pdf>.
- Lizama Meza PA, Vásquez Guillen JA. 2001. Evaluación biológica y económica del uso de micorrizas (Mycoral®) en cuatro pastos: Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras; [consultado 2016 Sep 20]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1497/1/AGN-2001-T004.pdf>
- Pérez CA, Sierra JR, Montes VD. 2011. Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el Caribe colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. 3(2):366–385.
- Reyes Munguía A, Zavala Cuevas D, Alonso Martínez A. 2012. Compuestos químicos y aplicaciones del Perejil. No. 11 – Diciembre 2012- España: revista.tlatemoani@uaslp.mx; [consultado 2016 Oct 15]. <http://www.eumed.net/rev/tlatemoani/11/perejil-compuestos-quimicos-aplicaciones.html>.
- Sierra BE. 2008. Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología en Marcha*. 21(1):191–201. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4835698.pdf>.
- Trappe JM. 2005. A.B. Frank and mycorrhizae: the challenge to evolutionary and ecologic theory. *Mycorrhiza*. 15(4):277–281. doi:10.1007/s00572-004-0330-5.

United States Department of Agriculture [USDA] (2007). Statistix 8 User Guide for the Plant Material Programs.

7. ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento para clarificar y teñir muestras de raíces (Jarstfer 1970).

Tomar en cuenta.

- Disponer de equipo adecuado para utilizarlo y contar con mayor seguridad y protección personal (anteojos, guantes y delantal).
- Para retener las muestras de raíces, utilizar el diseño denso polymer tissue "cassettes" de Fisher Scientific de plástico.
- Tener sumo cuidado con el manejo de químicos reactivos, de ser posible utilizar una cámara especial si el procedimiento implica calentamiento de químicos.
- Asegurarse de entender el procedimiento leyendo las introducciones cuidadosamente.

Clarificación:

1. Recolectar las muestras de raíces y lavarlas con agua.
 2. Preparar los cassettes con las muestras dejándolas en un beaker con agua mientras se prepara la solución de KOH.
 3. Utilizar un beaker para verter una medida suficiente de solución de KOH al 10% de forma que los cassettes puedan ser cubiertos.
 4. Calentar la solución de KOH hasta que la temperatura llegue a 80 °C.
 5. Depositar los cassettes en la solución por 30 minutos (tiempo promedio para la mayoría de raíces).
 6. Lavar con agua cinco veces.
- Usar un beaker con 30% de agua oxigenada a bajo calor (10 minutos a $\leq 50^{\circ}\text{C}$) si a pesar de hacer el proceso de clarificación con KOH las muestras de raíces presentan pigmentos de color oscuro como café, negro y morado. Por último lavarlas cinco veces para seguir con el proceso de tinción.

Tinción:

1. Utilizar un beaker para verter una medida suficiente de Azul de Tripano (0.5 %) de forma que los cassettes puedan ser cubiertos.
2. Sin meter los cassettes, calentar el Azul de Tripano hasta que la temperatura llegue a 80 °C.
3. Manteniendo la temperatura de 80 °C, situar los cassettes en el beaker de Azul de Tripano hasta que la temperatura baje a 50°C. Enjuagar los cassettes una sola vez con agua.
4. Reunir las placas necesarias para montar un promedio de diez raíces y cubrirlas con un cubreobjetos presionando de manera leve para poder observarlas en el microscopio. Tener en cuenta que se debe manipular las muestras con pinzas y guantes debido a que el tinte es cancerígeno.
5. Si las muestras no se van a analizar al instante, colóquelas en el refrigerador en una bolsa plástica marcada.

Azul de Tripano (0.05%):

La preparación del tinte incluye añadir y mezclar en un frasco los ingredientes siguientes:

- Glicerina (800 ml)
- Ácido láctico (800 ml)
- Agua destilada (800 ml)
- Tinte de Azul de Tripano (1.2 g)

Anexo 2. Procedimiento para aislar esporas de micorriza (Jarstfer 1963).

1. Pesar 100 gr de muestra de suelo o medio de crecimiento utilizado.
2. Utilizar un beaker para mezclar la muestra con agua durante el tiempo que sea necesario hasta que los sólidos del suelo queden disueltos en el líquido (15-40 segundos).
3. Vaciar el agua del beaker y tamizar la mezcla utilizando tamices.
4. Utilizar un embudo pequeño para pasar el material filtrado a un tubo de ensayo, de ser posible agregar agua hasta alcanzar casi el tope del borde del tubo.
5. Colocar los tubos en una centrifugadora a 3,000 rpm por 3 minutos.
6. Agregar a la solución 40% (p/v) de sacarosa, mezclar bien y centrifugar a 3000 rpm durante 1 minuto.
7. Vaciar los tubos sin perturbar el sedimento de sacarosa (las esporas se encuentran en conjunto con el sustrato).
8. Ubicar la mezcla de esporas en un plato Petri de plástico para ser observadas en el estereoscopio.