

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Evaluación de sustratos inorgánicos para la exportación de inoculante 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:

Danilo Eduardo Moreta Mejía

Honduras
Diciembre, 2002

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

Danilo Eduardo Moreta Mejía

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2002

Evaluación de sustratos inorgánicos para la exportación de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular

Presentado por:

Danilo Eduardo Moreta Mejía

Aprobada:

Juan Carlos Rosas, Ph. D.
Asesor Principal

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

Byron Reyes, Ing. Agr.
Asesor

Antonio Flores, Ph. D.
Decano Académico

Juan Carlos Rosas, Ph. D.
Coordinador de Área Temática

Mario Contreras, Ph. D.
Director General

DEDICATORIA

A las frases que han inspirado la realización de todas mis metas y sueños: Dios no niega su ayuda a quien da todo de sí. No hay sueños imposibles. Dios ha prometido dar a sus hijos los deseos de su corazón.

A **Dios** todopoderoso, quien ha sido mi fortaleza y luz para mi camino.

A mi querido padre Einmeris Moreta, por haberme enseñado que el coraje es el don más importante para quien busca sus sueños, por ser un padre ejemplar y por estar pendiente de mí en todo momento.

A mi madre Enma Mejía, por haberme enseñado que la felicidad es una bendición, pero que generalmente es también una conquista; por ser tan comprensiva y trabajadora. Gracias de corazón madre querida.

A mis hermanos Marcelo y Alí, por ser más que hermanos mis mejores amigos, por haber confiado en mí en todo momento, por sus palabras de aliento y por cuidar de nuestros padres durante mi ausencia.

A mi tía Mariana Cadena, por ser mi segunda mamá, por depositar toda su confianza en mí, por transmitirme que la madurez no viene con la edad sino que con la aceptación de la responsabilidad; por todas las cosas bellas que ha hecho en mi nombre. Todo eso lo llevo dentro de mi corazón, nunca la defraudaré.

A mi tío Gonzalo Restrepo, por su apoyo incondicional, por confiar en mí siempre y por enseñarme que no son las ideas bonitas las que cuentan en la vida, sino las obras que se llevan a cabo.

A mi querida abuelita Delia, por transmitirme siempre el lado positivo de la vida, por no dejarme perder los ánimos a mitad de camino, por ayudarme a comenzar y recomenzar siempre.

A mi prima Yasseny, por su amistad y por enseñarme que las oportunidades muy pocas veces vienen rotuladas, gracias prima.

A mi familia en general, por ser el regalo más preciado que Dios me ha dado, por su ejemplo de trabajo y honradez; todos mis sacrificios son para ustedes. Gracias por darme fuerzas para conquistar mis sueños.

A Cali bella, la sucursal del cielo; por ayudarme a descubrir lo que realmente quiero ser.

AGRADECIMIENTOS

A papá Dios, por habitar siempre en mi corazón y por darme el valor y la humildad para afrontar las arremetidas y dificultades que se presentan en mi vida.

A María Virgen y Madre, por ser mi consuelo en los momentos más difíciles, por transmitirme que cada adversidad tiene un propósito divino.

A mis padres, por su amor, comprensión, apoyo y por el esfuerzo que han hecho por mí para que pueda culminar mi carrera.

A mis tíos, por motivar la realización de mis estudios en Zamorano y por su apoyo.

A mis hermanos, por toda la confianza que han depositado en mí.

Al Dr. Juan Carlos Rosas, por su valiosa colaboración y tiempo para la realización de este proyecto.

A la Ing. Hilda Flores, por su apoyo y consejos durante el desarrollo de esta investigación.

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

Al Dr. Erich Raddatz, por sus consejos y contribuciones a la orientación de este estudio.

Al Dr. Raúl Santillán, por su gran colaboración en el desarrollo inicial de esta tesis.

Al Dr. Raúl Espinal, por su apoyo y tiempo.

A Tomasa Colindres y Luz Henríquez, por su amistad y valiosa aportación en este trabajo.

A los trabajadores del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) y del Proyecto Micorriza, por su amistad y colaboración.

A todos mis amigos, que me apoyaron e hicieron más placentera mi estadía en Zamorano.

A Zamorano, por su contribución en mi desarrollo personal y profesional.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

Al Fondo Dotal Zamorano, por el financiamiento parcial de mi colegiatura durante mi primer año de estudios.

Al Ministerio de Agricultura y Ganadería de Ecuador (MAGE), por el financiamiento otorgado a partir del segundo año para culminar mis estudios.

RESUMEN

Moreta Mejía, Danilo. 2002. Evaluación de sustratos inorgánicos para la exportación de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular. Proyecto Especial de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 45 p.

La habilidad de las micorrizas vesículo-arbusculares (VAM) para promover el desarrollo de las plantas ha sido bien investigada; sin embargo, la aplicación e implementación de tecnologías para la exportación de inoculantes no ha sido muy explorada. Esto es una limitante que reduce la distribución comercial del producto a otros países. El objetivo de este estudio fue evaluar sustratos inorgánicos para la exportación de inoculante de VAM, y determinar su factibilidad técnica y económica. La investigación se llevó a cabo en la Escuela Agrícola Panamericana, Honduras; entre febrero y agosto de 2002. Los sustratos evaluados fueron el sustrato convencional utilizado por Zamorano para la producción de MYCORAL[®] (suelo agrícola y arena en proporción 2:1), perlita, vermiculita, suelo rojo, suelo blanco, piedra pómez, piedra de cantera, ladrillo y carbón vegetal. El material experimental fue *Brachiaria decumbens*. A los sustratos inorgánicos se les aplicó una solución nutritiva baja en P, basada en los requerimientos para el desarrollo del pasto hospedero. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar (BCA) con seis repeticiones. Se realizaron dos muestreos, a las 6 y 11 semanas después de sembrado el *B. decumbens*. La vermiculita fue superior a los demás sustratos en el volumen y peso seco de las raíces, y en el peso seco del follaje; esto pudo deberse a la densidad aparente relativamente baja que posee este sustrato. La mayor infección de raíces se observó en la piedra de cantera, aunque este sustrato no fue estadísticamente diferente a la mayoría; esta respuesta probablemente se debió a que este sustrato presentó una de las menores concentraciones de P y/o al efecto de la aplicación de la solución nutritiva. El número de esporas en el testigo fue notablemente superior a los demás sustratos, debido su baja concentración de P; en este sustrato no se aplicó la solución nutritiva. El análisis económico reflejó que la producción a gran escala de VAM en sustratos inorgánicos no es factible, debido a que sus costos de implementación son relativamente altos en comparación con el sustrato convencional. Sin embargo, a pesar del alto costo, para fines de introducción de cepas puras a otro país, su empleo es económicamente justificado. Los sustratos inorgánicos y la aplicación de la solución nutritiva favorecieron la infección de raíces y al peso seco de las raíces y del follaje.

Palabras clave: Calidad, costos diferenciales, fuentes de inóculo, MYCORAL[®], solución nutritiva, sustratos.

NOTA DE PRENSA

NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA LA EXPORTACIÓN DE MICORRIZAS VESÍCULO – ARBUSCULARES EN SUSTRATOS INORGÁNICOS

Las micorrizas son hongos benéficos del suelo que establecen una relación simbiótica (asociación benéfica) con las raíces de las plantas, contribuyendo a su mejor nutrición y proporcionándoles mayor resistencia a condiciones de estrés.

Los beneficios que las micorrizas brindan a las plantas se han investigado con profundidad; sin embargo, la aplicación de tecnologías para la exportación de inoculante, se ha explorado muy poco, lo que representa una limitante para la distribución comercial del producto.

En la Escuela Agrícola Panamericana (El Zamorano) se realizó un estudio con el fin de evaluar varios tipos de sustratos para la exportación de inoculante de micorriza de calidad, y así determinar cuáles resultan viables desde el punto de vista técnico y económico.

Los sustratos evaluados fueron: el sustrato testigo (suelo:arena en la proporción 2:1), perlita, vermiculita, suelo rojo, suelo blanco, piedra pómez, piedra de cantera, ladrillo y carbón vegetal. El material vegetal hospedero de la micorriza fue el pasto *Brachiaria decumbens*; a todos los sustratos excepto el testigo, se les aplicó una solución nutritiva específica para el crecimiento del pasto hospedero. Las variables evaluadas fueron la biomasa radical y foliar del pasto, el número de esporas presentes en cada sustrato y la tasa de infección de raíces por parte de la micorriza.

Los resultados obtenidos reflejaron que entre los sustratos inertes, el que tuvo el mayor impacto, tanto en la biomasa radical y foliar del pasto hospedero como en el número de esporas del hongo, fue la vermiculita; por otra parte la piedra de cantera presentó la mayor tasa de infección de raíces. La aplicación de la solución nutritiva tuvo un marcado efecto en la biomasa radical y foliar de los sustratos inorgánicos evaluados. Con respecto al sustrato testigo, el número de esporas presente fue notablemente superior a los demás sustratos; sin embargo, su tasa de infección de raíces como también su biomasa radical y foliar fueron unas de las más bajas en relación con los sustratos alternativos.

Para ensayos futuros es recomendable realizar mezclas en varias proporciones entre los diversos sustratos inorgánicos, con el propósito de minimizar el efecto negativo de los mismos en el desarrollo de la micorriza y así obtener un inóculo de mayor calidad.

CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	vii
	Nota de prensa.....	viii
	Contenido.....	ix
	Índice de Cuadros.....	xii
	Índice de Figuras.....	xiv
	Índice de Anexos.....	xv
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	GENERALIDADES.....	1
1.2	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	2
1.3	ANTECEDENTES.....	2
1.4	JUSTIFICACIÓN.....	3
1.5	OBJETIVOS.....	3
1.5.1	Objetivo general.....	3
1.5.2	Objetivos específicos.....	3
2.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1	MICORRIZAS.....	4
2.2	CLASIFICACIÓN Y MORFOLOGÍA DE LAS MICORRIZAS.....	4
2.3	MICORRIZA VESÍCULO-ARBUSCULAR (VAM).....	5
2.3.1	Principales funciones y beneficios.....	5
2.3.1.1	Absorción de nutrimentos.....	5
2.3.1.2	Absorción de agua y resistencia al estrés hídrico.....	6
2.3.1.3	Formación de agregados de suelo.....	6
2.3.1.4	Protección contra patógenos.....	7
2.4	PRODUCCIÓN DE INÓCULO.....	7
2.4.1	Métodos de producción de inóculo de VAM.....	8
2.4.1.1	Producción en sustrato suelo.....	8
2.4.1.2	Técnica de la película nutritiva (NFT).....	8
2.4.1.3	Aeroponía.....	8
2.4.1.4	Cultivo <i>in vitro</i> con uso de raíces transformadas.....	8
2.4.1.5	Producción de inóculo de MVA en arcilla expandida.....	9
2.4.1.6	Producción en arena.....	9

2.4.1.7	Otros materiales y mezclas utilizadas en la producción de inóculo de VAM.....	9
2.5	EVALUACIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVA DEL INÓCULO.....	10
2.6	FUENTES DE INÓCULO DE MVA.....	10
2.6.1	Esporas.....	10
2.6.2	Segmentos de raíces infectadas.....	11
2.6.3	Sustrato suelo como fuente de inóculo.....	11
2.7	SUSTRATOS.....	11
2.7.1	Sustratos orgánicos.....	11
2.7.2	Sustratos inorgánicos o minerales.....	12
2.7.3	Propiedades físicas.....	12
2.7.4	Propiedades químicas.....	12
2.7.5	Propiedades biológicas.....	12
2.8	LA SOLUCIÓN NUTRITIVA.....	12
2.8.1	Consideraciones básicas sobre la preparación y uso de soluciones nutritivas.....	13
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1	UBICACIÓN.....	14
3.2	MATERIAL EXPERIMENTAL.....	14
3.3	METODOLOGÍA.....	16
3.3.1	Tratamientos.....	16
3.3.2	Primera fase: Obtención y preparación de sustratos.....	16
3.3.3	Segunda fase: Análisis físico y químico de los sustratos.....	17
3.3.4	Tercera fase: Preparación de la solución nutritiva para el crecimiento y desarrollo del pasto hospedero.....	17
3.3.5	Cuarta fase: Establecimiento del ensayo en invernadero.....	18
3.3.5.1	Siembra.....	18
3.3.5.2	Inoculación.....	18
3.3.5.3	Raleo.....	18
3.3.5.4	Cantidad y frecuencia de aplicación de la solución nutritiva.....	18
3.3.6	Diseño experimental.....	19
3.4	MUESTREOS Y VARIABLES EVALUADAS.....	19
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
3.6	ANÁLISIS ECONÓMICO.....	19
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1	PRIMER MUESTREO.....	20
4.1.1	Volumen de raíz.....	20
4.1.2	Peso seco de las raíces.....	21
4.1.3	Peso seco del follaje.....	21
4.1.4	Número de esporas.....	22
4.1.5	Tasa de infección de las raíces.....	22
4.2	SEGUNDO MUESTREO.....	24
4.2.1	Volumen de raíz.....	24
4.2.2	Peso seco de las raíces.....	25
4.2.3	Peso seco del follaje.....	25

4.2.4	Número de esporas.....	26
4.2.5	Tasa de infección de las raíces.....	27
4.3	COMPARACIÓN ENTRE EL PRIMER Y SEGUNDO MUESTREO...	27
4.3.1	Volumen de raíces.....	27
4.3.2	Peso seco de las raíces.....	28
4.3.3	Peso seco del follaje.....	29
4.3.4	Número de esporas.....	30
4.3.5	Tasa de infección de las raíces.....	31
4.4	ANÁLISIS ECONÓMICO.....	32
4.4.1	Costos diferenciales.....	32
5.	CONCLUSIONES.....	34
6.	RECOMENDACIONES.....	35
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
8.	ANEXOS.....	39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Análisis físico de los sustratos evaluados para la producción de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular para exportación. Zamorano, Honduras, 2002.....	15
2.	Análisis químico de los sustratos evaluados para la producción de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular para exportación. Zamorano, Honduras, 2002.....	15
3.	Solución nutritiva para el pasto <i>Brachiaria decumbens</i> usando sustratos inorgánicos como medios de crecimiento. Zamorano, Honduras, 2002.....	16
4.	Compuestos utilizados como fuentes nutritivas y concentración final para la preparación de 1 y 32 L de solución nutritiva para el crecimiento del pasto <i>Brachiaria decumbens</i> en sustratos inorgánicos. Zamorano, Honduras, 2002.....	17
5.	Cantidad de sustratos evaluados para la producción de inoculante micorrízico para exportación. Zamorano, Honduras, 2002.....	18
6.	Efecto de los sustratos en el volumen de raíces (VR), peso seco de raíces y follaje, número de esporas (NE) y tasa de infección de raíces (IR) a las seis semanas después de la siembra del pasto <i>Brachiaria decumbens</i> . Zamorano, Honduras, 2002.....	20
7.	Efecto de los sustratos sobre el volumen de raíz del pasto <i>Brachiaria decumbens</i> a las seis semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	21
8.	Efecto de los sustratos sobre el peso seco de las raíces del pasto <i>Brachiaria decumbens</i> a las seis semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	21
9.	Efecto de los sustratos sobre el peso seco del follaje del pasto <i>Brachiaria decumbens</i> a las seis semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	22

10.	Efecto de los sustratos sobre el número de esporas de micorriza vesículo-arbuscular presentes a las seis semanas después de la siembra del pasto <i>Brachiaria decumbens</i> . Zamorano, Honduras, 2002.....	22
11.	Efecto de los sustratos sobre la tasa de infección de raíces (%) de <i>Brachiaria decumbens</i> por micorriza vesículo-arbuscular a las seis semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	23
12.	Efecto de los sustratos en el volumen de raíces (VR), peso seco de raíces y follaje, número de esporas (NE) y tasa de infección de raíces (IR) a las 11 semanas después de la siembra del pasto <i>Brachiaria decumbens</i> . Zamorano, Honduras, 2002.....	24
13.	Efecto de los sustratos sobre el volumen de raíz del pasto <i>Brachiaria decumbens</i> a las 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	25
14.	Efecto de los sustratos sobre el peso seco de las raíces del pasto <i>Brachiaria decumbens</i> a las 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	25
15.	Efecto de los sustratos sobre el peso seco del follaje del pasto <i>Brachiaria decumbens</i> a las 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	26
16.	Efecto de los sustratos sobre el número de esporas de micorriza vesículo-arbuscular presentes en el pasto <i>Brachiaria decumbens</i> a las 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	26
17.	Efecto de los sustratos sobre la tasa de infección de raíces por micorriza vesículo-arbuscular del pasto <i>Brachiaria decumbens</i> a las 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	27
18.	Costos diferenciales de la producción de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular (para 100 maceteros y por kg) utilizando sustratos inorgánicos como medios de crecimiento. Zamorano, Honduras, 2002.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Efecto de los sustratos (S:A=suelo:arena, Perl=perlita, Verm=vermiculita, SR=suelo rojo, SB=suelo blanco, PP=piedra pómez, PC=piedra de cantera, Ladr=ladrillo y Cveg=carbón vegetal) en el incremento (?) del volumen de raíces de <i>Brachiaria decumbens</i> durante la producción de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular entre las 6 y 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	28
2.	Efecto de los sustratos en el incremento (?) del peso seco de raíces de <i>Brachiaria decumbens</i> durante la producción de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular entre las 6 y 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	29
3.	Efecto de los sustratos en el incremento (?) del peso seco del follaje de <i>Brachiaria decumbens</i> durante la producción de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular entre las 6 y 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	30
4.	Efecto de los sustratos utilizados para la producción de inoculante micorrízico en el incremento (?) del número de esporas de micorriza vesículo-arbuscular entre las 6 y 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	31
5.	Efecto de los sustratos en el incremento (?) de la colonización por micorriza vesículo-arbuscular en las raíces de <i>Brachiaria decumbens</i> durante la producción de inoculante micorrízico entre las 6 y 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.....	32

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Distribución de los tratamientos, en el invernadero, para la producción de inoculante de micorriza en maceteros.....	40
2.	Método para el aislamiento de esporas.....	41
3.	Método para clarificar y teñir muestras de raíces.....	43
4.	Costos de preparación de la solución nutritiva para la producción de 100 maceteros de MYCORAL [®] en el pasto <i>Brachiaria decumbens</i>	45

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

El principal problema originado por el mal manejo del recurso suelo es la continua pérdida de su fertilidad, lo que se refleja en el bajo rendimiento de los cultivos y una mayor dependencia de los fertilizantes químicos, lo cual genera problemas secundarios como la acidez, salinidad y la degradación del mismo (Sánchez, 2000).

Álvarez *et al.* (1997) afirman que el suelo representa un recurso complejo, heterogéneo y frágil que constituye la base de los recursos y la producción. Éste está expuesto a una alta susceptibilidad a la erosión y a una baja fertilidad natural, con efectos negativos en la producción de los cultivos, en la productividad del trabajo y en la factibilidad del establecimiento de sistemas productivos sustentables. La producción y uso de los fertilizantes químicos se ha incrementado notablemente en las últimas décadas, ocasionando un impacto negativo en el ambiente, la contaminación global y el agotamiento de los recursos renovables (Hernández, 2000). Esta situación lleva a la búsqueda de alternativas para modificar y mejorar las condiciones del suelo, como lo es el uso de micorrizas que proporcionan una mayor área de exploración de suelo y hacen a las plantas más resistentes a condiciones de estrés; además favorecen la captación de nutrimentos para un mejor desarrollo vegetal (Sánchez, 2000).

Raddatz (2001) señala que en nuestros tiempos, la producción agrícola debe realizarse dentro de un sistema integral y menos contaminante; esto es posible mediante la agricultura orgánica. El uso de micorrizas es la piedra angular para su realización.

Un ecosistema agrícola es sostenible cuando los componentes bióticos del mismo están en equilibrio. En ecosistemas perturbados, este equilibrio depende de dos estrategias de manejo de la tierra: producción y/o conservación. Estas dos estrategias pueden ser combinadas mediante el entendimiento de la complejidad biológica existente en el suelo (Bethlenfalvay y Schüepp, 1994).

Dentro de la gran diversidad de organismos que forman parte de un sistema agrícola, las micorrizas constituyen una parte importante, ya que forman un puente entre el suelo y la planta (Bethlenfalvay y Schüepp, 1994). Por otro lado, Linderman y Pflieger (1994) afirman que para intensificar el empleo de las micorrizas, el mayor obstáculo ha sido la poca disponibilidad de cantidades comerciales de inoculantes. El método de cultivos en macetas en suelo esterilizado es muy usado con fines experimentales y en la actualidad otros métodos han sido desarrollados e investigados con muy buenos resultados; por ejemplo la técnica de la película nutritiva y la aeroponía.

Existen muchas características para que un inoculante de micorrizas sea considerado efectivo, las que están siendo validadas actualmente en forma extensiva. Un inoculante debe promover rendimientos económicos significativos, tolerancia al estrés, debe estar libre de patógenos u otros contaminantes, y ser formulado y producido en forma económica con una amplia vida de anaquel (Safir, 1994).

1.2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La aplicación e implementación de tecnologías para la producción y exportación de inoculantes de micorrizas no ha sido muy explorada (Rao *et al.*, 1995), siendo esto una limitante para la distribución comercial del producto entre países. La producción de las micorrizas está limitada por aspectos relacionados con la biotrofia de estos hongos; además, la selección de cepas eficientes y su interacción con las condiciones ambientales y de producción impone retos en la producción de inoculantes de excelente calidad (Manjarrez *et al.*, 2000). Estos autores también señalan que la polémica principal con relación a la producción de inoculantes de buena calidad, radica en la cantidad de propágulos infectivos y efectivos contenidos, como también el estado sanitario del mismo.

Las micorrizas son organismos biotrofos (necesitan de un hospedero para reproducirse), razón por la cual no pueden ser producidos en medios artificiales. Todas las estructuras del hongo pueden ser usadas como fuente de inóculo: las raíces y sustratos infectados son las fuentes más comunes de inoculantes (Sieverding, 1991).

1.3 ANTECEDENTES

En Zamorano se produce MYCORAL[®], que emplea un sustrato compuesto por suelo agrícola y arena en proporción 2:1, lo que limita la distribución comercial del mismo a otros países (no se puede exportar suelo). Otra posible limitante del producto lo constituyen los restos de agroquímicos, producto de las labores de mantenimiento de la planta hospedera; causando un impacto negativo en la calidad del inoculante; por ello, la protección contra plagas debe hacerse mediante control biológico. Este inoculante es un producto de alta calidad compuesto por esporas, hifas, suelo infectado y segmentos de raíces infectados por hongos de micorriza vesículo-arbuscular (VAM). Este producto está disponible en Zamorano a razón de \$ 0.39 por Kg.

Con el propósito de diseminar la tecnología fuera de Honduras, y a la vez aumentar la calidad del inoculante y reducir su transporte a gran escala, Zamorano busca reemplazar el sustrato convencional en la producción de inoculante comercial con otras alternativas ecoamigables, que se puedan transportar legalmente de un país a otro para iniciar producciones locales y poder así validar y comercializar el producto en otros países del área centroamericana y del Caribe.

1.4 JUSTIFICACIÓN

Los sustratos inorgánicos constituyen una de las alternativas de reemplazo al sustrato convencional para la exportación del inoculante MYCORAL[®]. Muchos de estos sustratos reúnen características apropiadas para producir inóculo de buena calidad y a un bajo costo.

El estudio se basó en la evaluación de varios sustratos inorgánicos para la exportación de inoculante de VAM, con el propósito de determinar cuáles resultan técnicamente viables, económicamente factibles y que cumplan con los requisitos legales de exportación.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Identificar sustratos inorgánicos para la exportación de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar física y químicamente sustratos para la exportación de inoculantes de micorriza vesículo-arbuscular.
2. Determinar el efecto de los sustratos en la calidad del inoculante de micorriza vesículo-arbuscular producido.
3. Determinar una solución nutritiva para el mantenimiento de las plantas hospederas en estos sustratos.
4. Estimar los costos diferenciales de la utilización de los sustratos para la producción de inoculante.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 MICORRIZAS

La palabra micorriza proviene del griego *mykes*=hongo y *rhiza*=raíz. Fue adoptada por Frank en 1885 para designar la simbiosis mutualista (no patogénica) que se establece entre las hifas de un hongo y los tejidos radicales de la mayoría de plantas vasculares (Sieverding, 1991; Gomez-Cruz,1995).

Según Hernández (2000), esta simbiosis es prácticamente universal ya que casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas, además puede estar presente en la mayoría de los hábitats naturales. El mutualismo implica una relación beneficiosa para los dos organismos implicados: el hongo proporciona a la planta nutrientes minerales y agua que extrae del suelo por medio de su red externa de hifas, mejorando la eficiencia de los procesos biológicos en la planta y el suelo; mientras que la planta provee al hongo energía y carbohidratos resultantes del proceso de fotosíntesis.

2.2 CLASIFICACIÓN Y MORFOLOGÍA DE LAS MICORRIZAS

Según Harley y Smith (1983), las micorrizas se clasifican de acuerdo con las relaciones entre los hongos y las células de la raíz. Los dos tipos principales son: la ectomicorriza, que se caracteriza por la penetración intercelular del micelio fúngico en la corteza de la raíz; y la endomicorriza, caracterizada por la penetración inter e intracelular de las células radicales (González-Chávez, 1995).

Las ectomicorrizas son formadas en su mayoría por hongos superiores (Basidiomycetes y Ascomycetes) y muchas especies maderables, incluyendo las familias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Rosaceae, Cupressaceae y Leguminosae. Las hifas del hongo envuelven a la raíz y forman una densa masa denominada manto fúngico, que físicamente separa a la raíz de su alrededor. Las hifas no penetran en las células (son intercelulares) y forman una red interconectada llamada Red de Hartig, indispensable en el intercambio bidireccional de materiales entre la planta y el hongo (González-Chávez, 1995).

En el desarrollo de la ectomicorriza, el hongo secreta sustancias reguladoras del crecimiento que provocan cambios anatómicos (no forman pelos radicales, forman abultamientos y ramificaciones) de la raíz; estos cambios en el desarrollo de la raíz juegan un papel primario en la absorción de nutrientes y agua del suelo. La red extensa de hifas

que se extiende en el suelo, cumple la función de reemplazar la ausencia de los pelos radicales (González-Chávez, 1995).

Las endomicorrizas se caracterizan principalmente por la penetración inter e intracelular de las células corticales de la raíz, pero sin la existencia de alteraciones morfológicas radicales. Dentro de este grupo se encuentran las micorrizas vesículo-arbusculares (VAM), las mismas que ocupan la mayor distribución geográfica y florística (95%) de los organismos biofertilizadores (Herrera y Ferrer, 1991).

Los hongos formadores de VAM pertenecen a la clase Zigomicetes. El nombre de micorriza vesículo-arbuscular, se deriva de las estructuras internas que forma el hongo en la raíz: las vesículas, que constituyen estructuras de reserva para el hongo, y los arbusculos, que son hifas modificadas (ramificadas) en las cuales ocurre la transferencia de nutrimentos (simbiosis). Las estructuras externas de la VAM son: las hifas que exploran el suelo y las esporas individuales o agrupadas (González-Chávez, 1995; Hernández, 2000).

2.3 MICORRIZA VESÍCULO-ARBUSCULAR (VAM)

Las VAM se encuentran en condiciones naturales en la mayoría de los cultivos tropicales y subtropicales de interés agronómico y están presentes en la mayoría de las Angiospermas; siendo las familias Chenopodiaceae y Cruciferae, las excepciones de mayor importancia. Esta asociación también se forma en especies perennes leñosas incluyendo muchas Gimnospermas con excepción de las Pináceas (Harley y Smith, 1983; Sieverding, 1991).

2.3.1 Principales funciones y beneficios

2.3.1.1 Absorción de nutrimentos. La absorción de nutrimentos por parte de la planta está determinada principalmente por la capacidad de absorción de las raíces y por la disponibilidad de los elementos en la solución del suelo (Sieverding, 1991). Las VAM mejoran la eficiencia de la absorción de nutrimentos minerales, logrando un mayor crecimiento y desarrollo de las plantas. Esto es posible gracias al aumento en el área de exploración del suelo por parte de las hifas del hongo, haciendo más eficiente la toma de nutrimentos que se encuentran en la solución y en las partículas del suelo (Sieverding, 1991; Hernández, 2000).

Harley y Smith (1983) afirman que el efecto más significativo que producen las VAM es promover el crecimiento en las plantas cuando existen deficiencias de fosfatos en el suelo. En el trópico, la concentración de fósforo en la solución del suelo es sumamente baja, por lo que el fósforo que se encuentra en la zona de absorción de las raíces se agota rápidamente. La baja difusión que posee este elemento, hace que esta zona de agotamiento que se crea alrededor de las raíces no tenga la capacidad de renovarse rápidamente. El micelio externo de las VAM crece más allá de esta zona, lo cual es aprovechado para la absorción adicional de fósforo (Sieverding, 1991).

Este efecto en la utilización del fósforo es de vital importancia, ya que puede representar una disminución en la aplicación de fertilizantes fosforados. Aunque no se conoce con exactitud cómo actúa el mecanismo de absorción de fósforo por parte del hongo, este mecanismo parece ser físico. El fósforo es captado en forma de ortofosfato por el micelio externo, posteriormente es traslocado a través de las hifas o estructuras intrarradicales en forma de polifosfatos, y finalmente, ocurre el proceso de transferencia de los arbúsculos a las células hospederas (Sieverding, 1991; González-Chávez, 1995).

Estudios realizados evidencian que el nitrógeno proveniente de fuentes inorgánicas de amonio es absorbido por las hifas de las VAM. Los nitratos mediante difusión tienen gran capacidad para movilizarse en el suelo; sin embargo, no se conoce la función directa que desempeñan las VAM en este mecanismo (Sieverding, 1991). No está confirmado el efecto de las VAM en la absorción de potasio y magnesio; sin embargo, las plantas micorrizadas presentan mayores concentraciones de estos elementos (Sieverding, 1991).

Según Hernández (2000), la simbiosis también juega un papel fundamental en la captación de elementos de lenta difusión como el zinc y el cobre. Por otro lado, Sieverding (1991) señala que micronutrientes como el azufre, boro y molibdeno son absorbidos por las hifas y transportados hacia la planta hospedera.

En los suelos tropicales, la acidez, alcalinidad y las altas concentraciones de elementos tóxicos como aluminio, hierro y manganeso, limitan la producción vegetal. Bajo estas condiciones, las VAM son de vital importancia ya que ayudan a las plantas a afrontar estas adversidades mediante una nutrición más balanceada con fósforo y otros macro y microelementos (Sieverding, 1991).

2.3.1.2 Absorción de agua y resistencia al estrés hídrico. En el trópico, la sequía representa la mayor situación de estrés para las plantas. El potencial de absorción de agua y la resistencia al estrés hídrico por parte de las plantas micorrizadas puede estar originado por diversas causas: la menor resistencia hacia la conductividad hidráulica del suelo a las raíces; el incremento en el área de absorción; el potencial de las hifas para explorar los poros más pequeños del suelo que los que pueden ser explorados por los pelos radicales; la regulación fitohormonal y de los estomas; y el beneficio indirecto resultante del incremento de la nutrición de la planta hospedera, especialmente en fósforo (Sieverding, 1991; Pérez-Moreno, 1995).

2.3.1.3 Formación de agregados de suelo. Las VAM pueden formar pequeños agregados a través de su red extensa de hifas, amarrando partículas de suelo y uniéndolas entre sí para formar agregados más grandes. Además, en la micorrizósfera se producen sustancias pegajosas resultado de la asociación con otros microorganismos; aglutinando las partículas del suelo, causando en conjunto un efecto positivo en la estructura del mismo y un control potencial de la microerosión; resultando en un beneficio indirecto a la planta a través de un suelo estructuralmente mejorado (Raddatz, 2001). En suelos arenosos, las MVA tienen un efecto mayor, al agregar más partículas de suelo en las raíces por unidad de masa de las plantas micorrizadas que las plantas no micorrizadas (Sieverding, 1991).

2.3.1.4 Protección contra patógenos. Según Pérez-Moreno (1995), son cuatro los mecanismos mediante los cuales las micorrizas protegen a la raíz de la planta hospedera del ataque de patógenos: al utilizar el excedente de los carbohidratos y reducir el atractivo de la raíz a los patógenos; al actuar las hifas como barrera física a la infección; al ocurrir cambios bioquímicos en los exudados de la raíz que son inhibidores de patógenos y al promover el crecimiento de microorganismos protectores de la rizósfera.

Los efectos esenciales de las VAM en las enfermedades bióticas son: una mejor nutrición de las plantas micorrizadas, promoviendo la activación de sus defensas; además la micorriza compite agresivamente con el patógeno por los productos resultantes del proceso de fotosíntesis, reduciendo la gravedad de la enfermedad; la planta acelera sus cambios morfológicos, produciéndose rápidamente la lignificación de la endodermis de la raíz que actúa como un muro de contención a la entrada de patógenos (e.g. *Fusarium oxysporum* en tomate y pepino). En resumen, las VAM incrementan la resistencia de las plantas contra los patógenos de la raíz, especialmente cuando la micorriza coloniza la raíz antes que el patógeno lo haga (Sieverding, 1991; Raddatz, 2001).

2.4 PRODUCCIÓN DE INÓCULO

Para la producción masiva de inóculo de VAM de alta calidad, es necesario realizar estudios ecológicos en regiones ambientales específicas para las especies cultivadas que ahí se desarrollen, con el fin de lograr una adecuada selección de cepas agrónomicamente estables y eficientes. Además, se requiere del conocimiento de aspectos básicos relacionados con el hongo, el hospedero y el sistema de producción que se piensa implementar (Manjarez *et al.*, 2000).

El proceso de producción debe iniciarse con el cultivo de esporas de una sola especie o de una multicepa cuyas características morfológicas (color, tamaño y otras) se encuentren bien definidas (Manjarez *et al.*, 2000). El cultivo en recipientes utilizando suelo esterilizado como sustrato de crecimiento es el método más difundido, ya que proporciona un ambiente favorable para más del 95% de las especies vegetales y hongos formadores de la simbiosis (Ferguson y Woodhead, 1982). Estos mismos autores señalan que la preparación del inóculo puede incluir suelo inoculado (esporas, hifas y raíces infectadas) o esporas previamente desinfectadas y aisladas. El suelo utilizado como inóculo, tiene la capacidad de alcanzar más rápidamente la infectividad debido a la gran cantidad de propágulos infectivos presentes en el mismo (hifas externas, fragmentos de raíces infectadas y esporas), contrario al uso de esporas aisladas.

Muchos factores ambientales pueden impedir la esporulación del hongo en los sustratos de producción, especialmente el contenido de P, el cual debe mantenerse bajo ya que en altas concentraciones inhibe el desarrollo de la micorriza. Se debe también mantener el balance de N y P debido a su importancia durante el desarrollo del hospedero. Concentraciones de $70 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ para el P y $50 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ para el N representan el máximo permisible para evitar reducir la colonización del hongo (Manjarez *et al.*, 2000).

2.4.1 Métodos de producción de inóculo de VAM

2.4.1.1 Producción en sustrato suelo. Este método puede ser implementado para producir inóculo en maceteros bajo condiciones controladas de invernadero o mediante una forma tradicional bajo condiciones de campo. El propósito del sistema de producción artesanal, es producir inóculo de VAM a un bajo costo. Las etapas a seguir incluyen:

- 1) La selección y preparación del área destinada para producción del inóculo; área que debe ser de baja fertilidad y sin recibir ningún tipo de fertilización.
- 2) Desinfección del suelo usando productos químicos granulados como Basamid (Dazomet), con vapor o la pasteurización con calor seco o húmedo.
- 3) Inoculación de la semilla del material vegetal utilizado como hospedero, haciendo agujeros y donde la cantidad de inóculo por agujero varía de 10-15 g/postura.
- 4) Mantenimiento de la planta hospedera: riegos, control de plagas y enfermedades y remoción de flores para evitar la contaminación del inóculo con las semillas del hospedero.
- 5) Por último se realiza la cosecha del inóculo, de 4-6 meses después de la inoculación, con el fin de obtener la mayor cantidad de estructuras infectivas en el suelo (esporas, hifas y raíces infectadas) (Sieverding, 1991).

2.4.1.2 Técnica de la película nutritiva (NFT). Este sistema utiliza una capa de solución nutritiva poco profunda sobre la cual se encuentran suspendidas las raíces de las plantas. No existen problemas de deficiencias nutritivas debido a que la solución se encuentra en exceso y fluye rápida y constantemente a través de las raíces; sin embargo, es importante la revisión periódica del pH de la solución nutritiva. Al igual que el método aeropónico, es necesaria la precolonización de las plantas hospederas con la micorriza en un sustrato sólido antes de incluirlas al sistema de la solución. La ventaja principal de este método radica en la cantidad de propágulos por unidad de peso o volumen, adicional a la facilidad de la cosecha (Douds Junior *et al.*, 2000; Manjarrez *et al.*, 2000).

2.4.1.3 Aeroponía. Las plantas deben pasar por un proceso de preinfección en vermiculita durante un período de tiempo relativamente corto. La solución nutritiva (baja en P) es pulverizada en forma intermitente sobre las raíces y como resultado se obtiene un inóculo de calidad y libre de patógenos. Las estructuras de infección la constituyen los segmentos de raíces infectadas y las esporas, las cuales se separan mediante el lavado de raíces sobre un tamiz (Douds Junior *et al.*, 2000; Manjarrez *et al.*, 2000).

2.4.1.4 Cultivo *in vitro* con uso de raíces transformadas. La ventaja principal de este método es la obtención de un inóculo totalmente libre de patógenos y de buena calidad; sin embargo, su costo de producción es elevado. Actualmente la reproducción del hongo se ha logrado a partir de raíces transformadas por *Agrobacterium tumefaciens*. El procedimiento inicia por transferir las esporas superficialmente esterilizadas dentro de platos petri, los cuales deben incubarse en posición vertical y en la oscuridad a 25-26⁰ C, con el fin de estimular la germinación de las esporas. Posteriormente, se transfieren a otros platos los cuales poseen las raíces que servirán de hospedero; el inóculo está listo

para ser cosechado después de 2 a 4 meses. Este método tiene un gran potencial en términos de cantidad de inóculo producido al obtener un rendimiento significativo a partir de mínimas cantidades de esporas. El manejo y formulación apropiada de los medios de cultivo, el uso adecuado de hospederos, así como las técnicas asépticas implementadas definen el éxito en del proceso (Manjarrez *et al.*, 2000).

2.4.1.5 Producción de inóculo de VAM en arcilla expandida. Mediante este sistema se puede producir inóculo a gran escala, empleando técnicas sencillas en un tiempo relativamente corto, además, este material es inorgánico por lo que la presencia de patógenos es casi nula. También existen menos problemas con el transporte y distribución comercial del producto debido a que el inóculo presenta un peso relativamente liviano (420 kg/m³). La longevidad del inóculo se extiende a más de cinco años bajo buenas condiciones de almacenamiento sin afectar la infectividad del hongo. Existen diversos métodos de aplicación de este producto, debido a su presentación similar a los fertilizantes granulados inorgánicos, haciendo factible su aplicación con métodos mecánicos (Sieverding, 1991).

2.4.1.6 Producción en arena. La planta hospedera no necesita pasar por un proceso de precolonización, ya que la inoculación se realiza directamente en el medio. La textura gruesa de este medio facilita el lavado y obtención intacta de las raíces micorizadas. Mediante un sistema automático de irrigación por goteo se aplica una solución nutritiva donde la concentración de nutrimentos y la frecuencia de aplicación deben ser manejadas adecuadamente; junto a esto, la naturaleza del hospedero y el tamaño de las partículas de la arena determinan el éxito de este método (Brundrett *et al.*, 1996; Douds Junior *et al.*, 2000).

2.4.1.7 Otros materiales y mezclas utilizadas en la producción de inóculo de VAM. Brundrett *et al.* (1996) afirman que la turba es muy utilizada como componente principal de muchas mezclas realizadas en experimentos en macetas. La turba tradicional proviene de musgos y posee un balance adecuado de sus propiedades físicas y químicas, proporcionando un sustrato ideal para el crecimiento radical de la planta hospedera. La mezcla típica utilizada que permite la máxima aireación y drenaje, es turba con otros componentes tales como perlita o vermiculita en la proporción 1:1.

La perlita y vermiculita son materiales inorgánicos que han mostrado buenos resultados en la producción de inóculo de VAM. Estos materiales poseen un pH neutro y son relativamente livianos. La perlita tiene una baja capacidad buffer y es nutricionalmente inerte; a diferencia de la vermiculita cuya capacidad buffer es mayor y además proporciona Mg y Ca para el crecimiento de las plantas (Sieverding, 1991; Brundrett *et al.*, 1996).

2.5 EVALUACIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVA DEL INÓCULO

La evaluación cuantitativa consiste en el conteo de esporas las cuales son removidas del inoculante mediante centrifugación con sucrosa y recogidas sobre un tamiz; las esporas del hongo son fácilmente cuantificables utilizando un estereoscopio. La cuantificación de la infección (%) de los segmentos de raíces del inóculo presenta mayor dificultad. Para proceder a esta cuantificación, los segmentos de raíces deben estar previamente clarificados y teñidos para facilitar la observación al microscopio de las estructuras del hongo. La tasa de infección es un indicador del potencial que poseen las raíces como fuentes de inóculo (Menge y Timmer; 1991).

A través de un microscopio se puede determinar la calidad de un inóculo mediante la evaluación de la condición de las esporas. Una espora débil, vieja, con sus paredes deterioradas o parasitada no tiene la suficiente capacidad para poder germinar. Si una cantidad considerable de esporas se encuentran en malas condiciones, el conteo de esporas no es significativo (Menge y Timmer; 1991). Estos autores también señalan que la prueba de germinación de las esporas, sembrándolas en un plato petri con agar y con bajos niveles de nutrimentos, también es de gran ayuda en la evaluación de la calidad del inóculo; sin embargo, requiere un período considerable de tiempo.

Menge y Timmer (1991) también señalan que la técnica del número más probable es uno de los métodos más confiables para evaluar el potencial de un inóculo. Este método consiste en la inoculación de semillas en suelo esterilizado utilizando varias concentraciones del inóculo. Al cabo de pocas semanas las raíces son removidas para determinar el porcentaje de infección que éstas poseen; la estimación de la población de esporas en el inóculo original se puede obtener de la menor concentración a la cual sucedió la infección. La ventaja principal de esta técnica radica en la medición de la cantidad de propágulos del hongo que son infectivos a diferencia del número total de esporas vivas.

2.6 FUENTES DE INÓCULO DE VAM

2.6.1 Esporas

Se ha comprobado que con una pequeña cantidad de esporas, las VAM pueden iniciar el proceso de simbiosis; además, éstas pueden ser técnicamente utilizadas en la inoculación de cultivos. Sin embargo, los períodos de latencia por los que atraviesan, los días que requieren para germinar y su lento desarrollo inicial en las raíces del hospedero hacen que sea susceptible al desplazamiento por parte de la micorriza nativa o por otros microorganismos del suelo. La producción a gran escala de esta fuente de inóculo aún no está perfeccionada debido a ciertas limitantes técnicas (Sieverding, 1991).

2.6.2 Segmentos de raíces infectadas

Esta fuente de inóculo contiene micelio interno y externo del hongo y esporas. Su infectividad es más alta que la de las esporas; el tiempo de colonización de las raíces utilizando esta fuente dura de 1 a 2 días después de la inoculación. Pequeñas cantidades (1-2 g/planta) son suficientes para obtener buenos resultados en experimentos en invernaderos y semilleros. Si las raíces infectadas poseen esporas, éstas pueden ser secadas y almacenadas a temperatura ambiente por más de 30 días sin perder su infectividad. Raíces infectadas que no poseen esporas de VAM deben ser usadas dentro de una semana; pero si son almacenadas a 4° C en agua o vermiculita húmeda pueden mantener su infectividad por 60 días (Sieverding, 1991).

2.6.3 Sustrato suelo como fuente de inóculo

El suelo utilizado en la producción de inóculo de VAM contiene todas las estructuras infectivas del hongo, por lo que es considerado como una fuente altamente infectiva. Este tipo de inóculo es el más usado en experimentación bajo invernadero utilizando técnicas sencillas de manejo. La selección del material vegetal hospedero y de las condiciones ambientales definen el éxito de esta fuente de inóculo. En cultivos en macetas se utilizan hospederos de gran potencial micotrófico tales como *Andropogon gayanus* y *Brachiaria spp*; hospederos que producen mayor cantidad de raíces infectadas, contrario a las leguminosas que producen mayor cantidad de esporas (Sieverding, 1991).

2.7 SUSTRATOS

Un sustrato es todo material poroso que cumple dos funciones vitales: anclar las raíces de las plantas desempeñando un papel de soporte; y contener el agua y los nutrimentos que las plantas necesitan. El sustrato puede interferir en el proceso de nutrición de la planta y éstos se pueden clasificar con base en numerosos criterios: su naturaleza, sus propiedades físicas y químicas, su origen, entre otros (Jeangille, s.f.). Según su origen, los sustratos se clasifican en orgánicos e inorgánicos.

2.7.1 Sustratos orgánicos

La característica principal de los sustratos orgánicos de origen natural es la descomposición biológica a la que están sujetos (turbas) (Infoagro, s.f.). A su vez se clasifican en subproductos agrícolas, agroindustriales y urbanos; y previo a su utilización, la mayor parte de estos materiales necesitan pasar por un proceso de compostaje con el fin de estabilizar y homogenizar el producto final (Jeangille, s.f.).

2.7.2 Sustratos inorgánicos o minerales

Los de origen natural se obtienen a partir de fuentes diversas de rocas o minerales, modificándose ligeramente mediante tratamientos físicos sencillos. Una característica importante que tienen es que no son biodegradables y dentro de este grupo se encuentran la arena, grava y tierras de origen volcánico (Infoagro, s.f.).

El grupo de los transformados o tratados se obtienen a partir de rocas o minerales que han sido sometidos a tratamientos físicos más o menos complejos, que alteran drásticamente las características de los materiales originales. Dentro de este grupo se encuentran la perlita, la vermiculita, la arcilla expandida y otras (Infoagro, s.f.).

La perlita es un silicato aluminico procedente de rocas volcánicas. El mineral molido se trata hasta formar un material esponjoso; al final se obtiene una partícula de 10-20 veces el tamaño original, extremadamente ligera, de color blanco con una porosidad superior al 95%. Además, posee una capacidad de retención de agua de hasta cinco veces su peso y es un material físicamente estable y químicamente inerte.

La vermiculita es una mica secada, laminada y sometida a elevadas temperaturas con el fin de expulsar en forma violenta el agua presente entre las láminas del mineral; el resultado final es un producto estéril, liviano y con una capacidad de absorción de agua varias veces superior a su peso, al mismo tiempo este material puede permanecer aireado. Además, posee la capacidad de almacenar nutrientes aunque esté provista de una deficiente estabilidad estructural, promoviendo la compactación del sustrato (Jeangille, s.f.; Novedades agrícolas, s.f.).

2.7.3 Propiedades físicas. Las principales incluyen la porosidad total, densidad, humedad, estructura y estabilidad de los agregados (Jeangille, s.f.).

2.7.4 Propiedades químicas. Las de mayor relevancia incluyen el pH, macro y microelementos, contenido de materia orgánica, conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Jeangille, s.f.).

2.7.5 Propiedades biológicas. Es de vital importancia que el sustrato esté libre de patógenos, parásitos o sustancias fitotóxicas (Jeangille, s.f.).

2.8 LA SOLUCIÓN NUTRITIVA

Según Alvarado (1998), una solución nutritiva es un fertilizante líquido que contiene uno o más nutrientes esenciales disueltos en agua, constituyendo una sola fase con características propias en cuanto a concentración de nutrientes y que puede ser almacenada, transportada y aplicada en forma líquida. Las ventajas principales que presentan las soluciones nutritivas frente a los fertilizantes sólidos son la facilidad de

manejo, almacenamiento, uniformidad y aplicación; además tienen una gran flexibilidad para preparar mezclas de diferente composición.

2.8.1 Consideraciones básicas sobre la preparación y uso de soluciones nutritivas

Alvarado (1998) afirma que las características de mayor importancia que determinan la decisión sobre qué fertilizantes se deben usar en la preparación de soluciones nutritivas son: solubilidad rápida y completa, compatibilidad con otros fertilizantes y con el agua de riego, baja toxicidad, baja volatilidad, pureza y precio. Otro aspecto a considerar es la incorporación mínima de elementos minerales no esenciales para el crecimiento de las plantas, ya que su exceso y posterior acumulación aumentan la concentración de sales afectando negativamente al cultivo (Carrasco e Izquierdo, 1996).

La aplicación se debe realizar en el área de las raíces evitando el contacto de la solución con las hojas para evitar problemas de fitotoxicidad y la futura aparición de enfermedades (Marulanda e Izquierdo, 1997). Por otra parte, el pH de la solución nutritiva debe ser el adecuado; el rango óptimo en el cual las plantas pueden tomar los elementos de la solución oscila entre 5.0 y 7.0 (Calderón, 1997).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

El estudio se llevó a cabo en el invernadero N° 1 del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, en la Escuela Agrícola Panamericana / Zamorano; situada en el Valle del Yeguare, departamento de Francisco Morazán, a 800 msnm, con una temperatura promedio de 23° C y una precipitación promedio anual de 1200 mm.

3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

Se utilizó el pasto *Brachiaria decumbens* como material hospedero de la micorriza, ya que éste es susceptible de ser micorrizado y su sistema radical se desarrolla rápida y abundantemente. La inoculación se realizó utilizando MYCORAL[®], biofertilizante comercial compuesto por la mezcla de tres géneros de micorriza seleccionadas (*Glomus*, *Acaulospora* y *Entrophospora*); siendo las esporas e hifas del hongo y los segmentos de raicillas infectadas sus estructuras de infección. Para determinar las características que afectan el desarrollo de la micorriza, se realizó un análisis físico y químico de cada uno de los sustratos (Cuadros 1 y 2) y para el desarrollo y crecimiento del pasto hospedero se preparó una solución nutritiva específica (Cuadro 3).

Cuadro 1. Análisis físico de los sustratos evaluados para la producción de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular para exportación. Zamorano, Honduras, 2002.

Sustrato	Densidad aparente (g/cm³)	Porosidad (%)
Suelo agrícola:arena (2:1)	0.81	28.0
Perlita	0.10	56.0
Vermiculita	0.14	56.0
Suelo rojo	1.17	20.0
Suelo blanco	1.09	16.0
Piedra pómez	0.49	30.0
Piedra de cantera	0.85	17.0
Ladrillo	0.92	18.0
Carbón vegetal	0.31	32.0

Cuadro 2. Análisis químico de los sustratos evaluados para la producción de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular para exportación. Zamorano, Honduras, 2002.

Sustrato*	%			Contenido (ppm)									
	pH	M.O.	Ntotal	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn	B
S:A	5.82	2.30	0.11	15	330	847	105	-	0.8	51	42	0.6	-
Perlita	7.82	0.29	0.04	2	8	123	0	15	0.1	4.7	1.7	0.4	0.4
Verm	6.21	0.93	0.02	48	62	1025	1575	12	2.2	28	46	1.6	0.4
SR	5.54	0.44	0.02	4	91	450	112	19	0.84	6.7	19	0.7	0.1
SB	5.79	0.25	0.01	0.1	86	525	157	3	0.24	1.3	3.7	0.1	0
PP	8.16	0.38	0.02	36	112	562	52	25	0.15	3.7	4.8	2.5	0.3
PC	4.83	0.25	0.02	1	50	645	30	26	0.12	2.3	1.0	0.4	0.2
Ladr	6.12	0	0.02	9	158	240	37	26	0.09	8.0	3.8	0.5	0.2
Cveg	9.74	0	0.33	43	1535	3075	120	15	0.15	2.0	10	0.6	0.2

* S:A = suelo agrícola:arena (2:1); Verm = vermiculita; SR = suelo rojo; SB = suelo blanco; PP = piedra pómez; PC = piedra de cantera; Ladr = ladrillo; Cveg = carbón vegetal.

Cuadro 3. Solución nutritiva para el pasto *Brachiaria decumbens* usando sustratos inorgánicos como medios de crecimiento. Zamorano, Honduras, 2002.

Elemento	Concentración (ppm)
N	100.0
P	15.0
K	60.0
Ca	80.0
Mg	22.0
S	30.0
B	0.20
Fe	5.0
Cu	0.02
Mn	0.30
Zn	0.03
Cl	10.0
Mo	0.005

Fuente: Santillán (2002)¹

3.3 METODOLOGÍA

3.3.1 Tratamientos

Los tratamientos evaluados para la producción de inoculante de VAM consistieron en nueve sustratos: el testigo o sustrato convencional utilizado por Zamorano para la producción de MYCORAL[®] (suelo agrícola y arena en la proporción 2:1), perlita, vermiculita, suelo rojo, suelo blanco, piedra pómez, piedra de cantera, ladrillo y carbón vegetal. Previo a la siembra, con el fin de disminuir la presencia de microorganismos, todos los sustratos fueron esterilizados con calor (350°C) por dos horas. A todos los sustratos (excepto el testigo) se les aplicó una solución nutritiva específica para el crecimiento y desarrollo de la planta hospedera.

3.3.2 Primera fase: Obtención y preparación de sustratos

La mayoría de los sustratos evaluados fueron recolectados de los alrededores de Zamorano como fue el caso especial del suelo:arena, el suelo rojo, el suelo blanco, la piedra de cantera, el ladrillo y el carbón vegetal; la piedra pómez se obtuvo en el mercado “Zonal Belén” de Tegucigalpa, mientras que la perlita y vermiculita fueron importadas de los Estados Unidos. Luego, se realizó la preparación de los mismos, picándolos finamente (excepto el sustrato convencional, el suelo rojo, el suelo blanco, la piedra de cantera, la perlita y la vermiculita) para que tengan una estructura física adecuada para el desarrollo del pasto.

¹ Santillán, R. 2002. Solución nutritiva para *Brachiaria decumbens* sembrada en materiales inertes y semi-inertes (correo electrónico). Florida, USA.

3.3.3 Segunda fase: Análisis físico y químico de los sustratos

Se realizó un análisis físico (densidad y porosidad) y químico (materia orgánica, pH, macro y micro elementos) de cada sustrato para determinar los posibles efectos de éstos en el desarrollo de la micorriza.

3.3.4 Tercera fase: Preparación de la solución nutritiva para el crecimiento y desarrollo del pasto hospedero

La concentración de la solución nutritiva original, específica para el crecimiento y desarrollo del pasto *B. decumbens*, se concentró 100 veces con el fin de reducir el volumen de solución a preparar y facilitar el manejo de la misma. El volumen total requerido para el ensayo fue de 32 L (Cuadro 4).

Cuadro 4. Compuestos utilizados como fuentes nutritivas y concentración final para la preparación de 1 y 32 L de solución nutritiva para el crecimiento del pasto *Brachiaria decumbens* en sustratos inorgánicos. Zamorano, Honduras, 2002.

E	Cf (ppm) ^x	g / L Sol. nut.	Fuente nutritiva		
			Compuesto	g / L Sol. nut.	g / 32 L Sol. nut.
N	10000	10.0	Urea	6.39	204.48
P	1500	1.50	K ₂ HPO ₄	8.33	266.56
K	6000	6.0	K ₂ SO ₄	5.11	163.52
Ca	8000	8.0	CaNO ₃ ·4H ₂ O	67.70	2166.40
Mg	2200	2.20	MgSO ₄ ·7H ₂ O	45.0	1440.0
S	3000	3.0			
B	20.0	0.02	H ₃ BO ₃	0.11	3.52
Fe	500	0.50	FeCl ₃	1.47	47.04
Cu	2.0	0.002	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.0053	0.1696
Mn	30.0	0.03	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1081	3.4592
Zn	3.0	0.003	ZnCl ₂	0.0014	0.0448
Mo	0.5	0.0005	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0013	0.0416
Cl ^y	1000	1.0	-	-	-

E = Elemento; Cf = Concentración final en partes por millón; g = gramos; L = litro

^x La solución original se concentró 100 veces para facilidad de manejo de volumen.

^y Cantidad aportada por las otras fuentes nutritivas.

3.3.5 Cuarta fase: Establecimiento del ensayo en invernadero

La cantidad requerida de cada sustrato varió dependiendo de las propiedades físicas de cada uno (Cuadro 5). La distribución de los tratamientos en el invernadero se detalla en el Anexo 1.

Cuadro 5. Cantidad de sustratos evaluados para la producción de inoculante micorrízico para exportación. Zamorano, Honduras, 2002.

Sustrato	Cantidad (kg)	
	Macetero	Total
Suelo agrícola : arena (2:1)	1.60	38.40
Perlita	0.16	3.84
Vermiculita	0.26	6.24
Suelo rojo	2.27	54.48
Suelo blanco	2.04	48.96
Piedra pómez	0.94	22.56
Piedra de cantera	1.64	39.36
Ladrillo	1.50	36.0
Carbón vegetal	0.78	18.72

3.3.5.1 Siembra. Las semillas de *B. decumbens* fueron esterilizadas, luego sembradas a chorro corrido en maceteros de 6'' (1.6 L de capacidad), distribuyendo la semilla en dos posturas por macetero y sembrando aproximadamente 50 semillas por postura (100 semillas por macetero). Para el ensayo se utilizó aproximadamente 128 g de semilla.

3.3.5.2 Inoculación. Se realizó utilizando el biofertilizante comercial MYCORAL[®] a razón de aproximadamente 20 g/postura (40 g/macetero), para un total de 9.5 kg de inoculante en el ensayo.

3.3.5.3 Raleo. Para uniformizar el número de plantas en cada macetero, se hizo un raleo 15 días después de la siembra (DDS), dejando de ocho a 10 plantas por macetero.

3.3.5.4 Cantidad y frecuencia de aplicación de la solución nutritiva. La solución se aplicó a los sustratos (excepto el testigo) en dos etapas: durante las primeras dos semanas se aplicaron 1.6 ml de solución por macetero cada tres días y después se aplicaron 3.2 ml de solución por macetero cada dos días hasta el final del experimento².

² Santillán, R. 2002. Solución nutritiva para *Brachiaria decumbens* sembrada en materiales inertes y semi-inertes (correo electrónico). Florida, USA.

3.3.6 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental de Bloques Completos al Azar (BCA) con seis repeticiones, donde cada bloque o repetición estuvo representado por los tratamientos evaluados. La unidad experimental estuvo conformada por dos maceteros; empleándose un total de 216 maceteros en el ensayo.

3.4 MUESTREOS Y VARIABLES EVALUADAS

Se realizaron dos muestreos: a las seis y 11 semanas, después de la siembra. La unidad de muestreo estuvo conformada por dos maceteros para un total de 216 maceteros en los dos muestreos (108 maceteros/muestreo). Para determinar el efecto de los sustratos y de la micorriza en la planta hospedera, se midió del volumen y peso seco de las raíces, y el peso seco del follaje; y para determinar la calidad del inoculante se evaluó el número de esporas presentes en cada sustrato (ml/100g suelo) y la tasa de infección de las raíces (% de vesículas, hifas y arbusculos), utilizando los métodos para el aislamiento de esporas y clarificación y tinción de raíces de Jarstfer (1970 a,b) (Anexos 2 y 3).

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis e interpretación de los datos se utilizó el programa “Statistical Analysis System” (SAS[®] V8.0); realizando un análisis de varianza (ANDEVA) y la separación de medias (DMS).

3.6 ANÁLISIS ECONÓMICO

Se utilizó la metodología del CIMMYT (1988), con base en los costos y beneficios diferenciales de cada tratamiento y haciendo una comparación entre éstos. Los costos de algunos sustratos, así como los de los materiales y equipo para la preparación y aplicación de la solución nutritiva se obtuvieron del Catálogo de Fisher (2002/2003) y del Catálogo de Hummert (2001/2002).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PRIMER MUESTREO

El primer muestreo se realizó seis semanas después de la siembra (SDS) del pasto *Brachiaria decumbens*. Se evaluó el volumen de raíces (VR), peso seco de las raíces y del follaje, número de esporas (NE) del hongo y la tasa de infección de las raíces (IR) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de los sustratos en el volumen de raíces (VR), peso seco de raíces y follaje, número de esporas (NE) y tasa de infección de raíces (IR), a las seis semanas después de la siembra del pasto *Brachiaria decumbens*. Zamorano, Honduras, 2002.

Tratamiento	Variables				
	VR (ml)	Peso seco (g)		NE ¹	IR (%)
		Raíces	Follaje		
Suelo:arena	60.0	6.5	11.2	109.3	29.8
Perlita	52.2	4.2	17.9	0.8	14.2
Vermiculita	115.7	18.3	33.3	10.7	35.7
Suelo rojo	50.3	9.4	18.7	6.7	28.3
Suelo Blanco	44.0	7.0	25.9	6.8	33.3
Piedra pómez	30.7	2.3	11.3	2.7	22.1
Piedra cantera	36.2	3.1	11.0	1.0	44.7
Ladrillo	51.0	3.6	17.9	0.7	22.2
Carbón vegetal	15.7	1.0	3.4	0.5	18.5
ANDEVA	*	*	*	*	*
DMS (0.05)	11.4	1.8	2.8	16.4	12.6
CV (%)	19.2	25.5	14.1	90.9	39.0

¹ Para la perlita y vermiculita se usaron 80 y 90 g de sustrato respectivamente.

* Significativo (P=0.05)

4.1.1 Volumen de raíz. El mayor volumen de raíz se obtuvo al cultivar el pasto en vermiculita. No se observaron diferencias significativas entre el testigo, la perlita, el ladrillo y el suelo rojo. Por otra parte, el carbón vegetal presentó el menor volumen de raíz. (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de los sustratos sobre el volumen de raíz del pasto *Brachiaria decumbens* a las seis semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

Sustrato	Volumen de raíz ^z (ml/macetero)	
Vermiculita	115.7	A
Suelo:arena	60.0	B
Perlita	52.2	BC
Ladrillo	51.0	BC
Suelo rojo	50.3	BC
Suelo blanco	44.0	CD
Piedra de cantera	36.2	DE
Piedra pómez	30.7	E
Carbón vegetal	15.7	F

^zValores con diferentes letras en la misma columna son diferentes estadísticamente (DMS, P=0.05).

4.1.2 Peso seco de las raíces. El mayor peso seco de raíces se obtuvo al cultivar el pasto en vermiculita y suelo rojo, siendo el mejor tratamiento la vermiculita, la cual superó en casi tres veces el volumen de raíces del testigo (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de los sustratos sobre el peso seco de las raíces del pasto *Brachiaria decumbens* a las seis semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

Sustrato	Peso seco raíz ^z (g/macetero)	
Vermiculita	18.3	A
Suelo rojo	9.4	B
Suelo blanco	7.0	C
Suelo:arena	6.5	C
Perlita	4.2	D
Ladrillo	3.6	DE
Piedra de cantera	3.1	DE
Piedra pómez	2.3	EF
Carbón vegetal	1.0	F

^zValores con diferentes letras en la misma columna son diferentes estadísticamente (DMS, P=0.05).

4.1.3 Peso seco del follaje. La mayor respuesta se presentó en la vermiculita, la cual superó al testigo en casi tres veces. Al igual que en el volumen y peso seco de las raíces, el carbón vegetal mostró el menor peso del follaje (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de los sustratos sobre el peso seco del follaje del pasto *Brachiaria decumbens* a las seis semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

Sustrato	Peso seco del follaje ^z (g/macetero)	
Vermiculita	33.3	A
Suelo blanco	25.9	B
Suelo rojo	18.7	C
Perlita	17.9	C
Ladrillo	17.9	C
Piedra pómez	11.3	D
Suelo:arena	11.2	D
Piedra de cantera	11.0	D
Carbón vegetal	3.4	E

^zValores con diferentes letras en la misma columna son diferentes estadísticamente (DMS, P=0.05).

4.1.4 Número de esporas. En el testigo, la cantidad de esporas fue notablemente superior que los demás tratamientos, los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto de los sustratos sobre el número de esporas de micorriza vesículo-arbuscular presentes a las seis semanas después de la siembra del pasto *Brachiaria decumbens*. Zamorano, Honduras, 2002.

Sustrato ^x	Número de esporas ^y (ml/100 g)		Clasificación ^z
Suelo:arena	109.3	A	Alto
Vermiculita	10.7	B	Bajo
Suelo blanco	6.8	B	Bajo
Suelo rojo	6.7	B	Bajo
Piedra pómez	2.7	B	Bajo
Piedra de cantera	1.0	B	Bajo
Perlita	0.8	B	Bajo
Ladrillo	0.7	B	Bajo
Carbón vegetal	0.5	B	Bajo

^xPara la perlita y vermiculita se usaron 80 y 90 g de sustrato respectivamente.

^yValores con diferentes letras en la misma columna son diferentes estadísticamente (DMS, P=0.05).

^zAlto: =40, Medio: 20-39, Bajo: =19

4.1.5 Tasa de infección de las raíces. La tasa de infección de raíces fue mayor al utilizar piedra de cantera como sustrato, pero no se encontraron diferencias significativas con la vermiculita y el suelo blanco. El menor porcentaje se observó en la perlita (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto de los sustratos sobre la tasa de infección de raíces (%) de *Brachiaria decumbens* por micorriza vesículo-arbuscular a las seis semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

Sustrato	Infección^y (%)	Clasificación^z
Piedra de cantera	44.7 A	Alta
Vermiculita	35.7 AB	Alta
Suelo blanco	33.3 ABC	Alta
Suelo:arena	29.8 BCD	Alta
Suelo rojo	28.3 BCD	Media
Ladrillo	22.2 CDE	Media
Piedra pómez	22.1 CDE	Media
Carbón vegetal	18.5 DE	Baja
Perlita	14.1 E	Baja

^y Valores con diferentes letras en la misma columna son diferentes estadísticamente (DMS, P=0.05).

^z Alta: =30, Media: 20-29, Baja: =19

4.2 SEGUNDO MUESTREO

El segundo muestreo se realizó 11 SDS del pasto *Brachiaria decumbens* y se evaluaron las mismas variables que en el primer muestreo (Cuadro 12).

Cuadro 12. Efecto de los sustratos en el volumen de raíces (VR), peso seco de raíces y follaje, número de esporas (NE) y tasa de infección de raíces (IR) 11 semanas después de la siembra del pasto *Brachiaria decumbens*. Zamorano, Honduras, 2002.

Tratamiento	Variables				
	VR (ml)	Peso seco (g)		NE ¹	IR (%)
		Raíces	Follaje		
Suelo:arena	95.8	13.1	25.3	176.2	28.0
Perlita	190.8	22.1	108.8	7.2	41.8
Vermiculita	359.2	62.1	146.6	28.3	40.7
Suelo rojo	165.0	34.7	100.7	18.5	48.0
Suelo blanco	148.3	22.2	119.2	12.5	34.8
Piedra pómez	158.3	21.1	99.4	8.8	32.6
Piedra cantera	150.8	21.8	99.3	2.2	50.7
Ladrillo	189.2	24.1	106.8	15.2	41.7
Carbón vegetal	99.2	7.5	58.3	1.0	28.0
ANDEVA	*	*	*	*	*
DMS (0.05)	36.0	11.8	9.4	23.8	12.3
CV (%)	17.8	39.8	8.4	68.0	27.5

¹ Para la perlita y vermiculita se usaron 80 y 90 g de sustrato respectivamente.

* Significativo (P=0.05)

4.2.1 Volumen de raíz. El pasto cultivado en vermiculita presentó el mayor volumen de raíz, superando al testigo en casi cuatro veces. La perlita, ladrillo, suelo rojo y piedra pómez también presentaron un buen desarrollo radical, sin encontrarse diferencias significativas entre estos tratamientos. El testigo y el carbón vegetal fueron los sustratos en los que se observó el menor desarrollo radical (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto de los sustratos sobre el volumen de raíz del pasto *Brachiaria decumbens* a las 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

Sustrato	Volumen de raíz ^z (ml/macetero)
Vermiculita	359.2 A
Perlita	190.8 B
Ladrillo	189.2 B
Suelo rojo	165.0 BC
Piedra pómez	158.3 BC
Piedra de cantera	150.8 C
Suelo blanco	148.3 C
Carbón vegetal	99.2 D
Suelo:arena	95.8 D

^zValores con diferentes letras en la misma columna son diferentes estadísticamente (DMS, P=0.05).

4.2.2 Peso seco de las raíces. El peso seco de las raíces del pasto cultivado en vermiculita fue mayor a los demás tratamientos, en especial al carbón vegetal y al testigo que demostraron el menor valor (Cuadro 14).

Cuadro 14. Efecto de los sustratos sobre el peso seco de las raíces del pasto *Brachiaria decumbens* a las 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

Sustrato	Peso seco raíz ^z (g/macetero)
Vermiculita	62.1 A
Suelo rojo	34.7 B
Ladrillo	24.1 BC
Suelo blanco	22.2 C
Perlita	22.1 C
Piedra de cantera	21.8 C
Piedra pómez	21.1 C
Suelo:arena	13.1 CD
Carbón vegetal	7.5 D

^zValores con diferentes letras en la misma columna son diferentes estadísticamente (DMS, P=0.05).

4.2.3 Peso seco del follaje. En la vermiculita y en el suelo blanco se obtuvieron los mejores pesos de follaje, siendo mejor en casi un 23% la vermiculita. El testigo fue casi cuatro veces menor que la vermiculita y estadísticamente fue el peor tratamiento, posiblemente porque no recibió aplicaciones de solución nutritiva (Cuadro 15).

Cuadro 15. Efecto de los sustratos sobre el peso seco del follaje del pasto *Brachiaria decumbens* a las 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

Sustrato	Peso seco del follaje ^z (g/macetero)	
Vermiculita	146.6	A
Suelo blanco	119.2	B
Perlita	108.8	C
Ladrillo	106.8	C
Suelo rojo	100.7	C
Piedra pómez	99.4	C
Piedra de cantera	99.3	C
Carbón vegetal	58.3	D
Suelo:arena	25.3	E

^zValores con diferentes letras en la misma columna son diferentes estadísticamente (DMS, P =0.05).

4.2.4 Número de esporas. Al igual que en el primer muestreo, el testigo fue superior a los demás tratamientos. Sin embargo, en este muestreo se incrementó el número de esporas en los demás tratamientos (Cuadro 16).

Cuadro 16. Efecto de los sustratos sobre el número de esporas de micorriza vesículo-arbuscular presentes en el pasto *Brachiaria decumbens* a las 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

Sustrato ^x	Número de esporas ^y (ml / 100 g)		Clasificación ^z
Suelo:arena	176.2	A	Alto
Vermiculita	28.3	B	Medio
Suelo rojo	18.5	BC	Bajo
Ladrillo	15.2	BC	Bajo
Suelo blanco	12.5	BC	Bajo
Piedra pómez	8.8	BC	Bajo
Perlita	7.2	BC	Bajo
Piedra de cantera	2.2	C	Bajo
Carbón vegetal	1.0	C	Bajo

^xPara la perlita y vermiculita se usaron 80 y 90 g de sustrato, respectivamente.

^yValores con diferentes letras en la misma columna son diferentes estadísticamente (DMS, P=0.05)

^zAlto: =40, Medio: 20-39, Bajo: =19

4.2.5 Tasa de infección de las raíces. La piedra de cantera fue el sustrato en el que se obtuvo la mayor tasa de colonización de raíces por la MVA; siendo superior en un poco más del 80% del testigo. El suelo rojo, perlita, ladrillo y vermiculita no fueron diferentes de la piedra de cantera por lo que en cualquiera de estos sustratos se obtendría una buena colonización de las raíces (Cuadro 17).

Cuadro 17. Efecto de los sustratos sobre la tasa de infección de raíces por micorriza vesículo-arbuscular del pasto *Brachiaria decumbens* a las 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

Sustratos	Infección ^y (%)		Clasificación ^z
Piedra de cantera	50.7	A	Alta
Suelo rojo	48.0	A	Alta
Perlita	41.8	AB	Alta
Ladrillo	41.7	AB	Alta
Vermiculita	40.7	AB	Alta
Suelo blanco	34.8	BC	Alta
Piedra pómez	32.6	BC	Alta
Suelo:arena	28.0	C	Media
Carbón vegetal	28.0	C	Media

^y Valores con diferentes letras en la misma columna son diferentes estadísticamente (DMS, P=0.05).

^z Alta: =30, Media: 20-29, Baja: =19

4.3 COMPARACIÓN ENTRE EL PRIMER Y SEGUNDO MUESTREO

4.3.1 Volumen de raíces

Al cultivar el pasto en vermiculita, el volumen de raíz fue mayor tanto en el primer como en el segundo muestreo, lo que pudo deberse principalmente a la alta porosidad que posee este sustrato y a la densidad aparente relativamente baja, lo que favoreció el crecimiento de las mismas. El sustrato que tuvo el mayor incremento entre el primer y segundo muestreo fue el carbón vegetal pero el desarrollo final fue menor que los demás tratamientos. El incremento del testigo fue el más bajo debido a que no recibió aplicación de la solución nutritiva; y a que su densidad aparente fue una de las más altas (0.81 g/cm³).

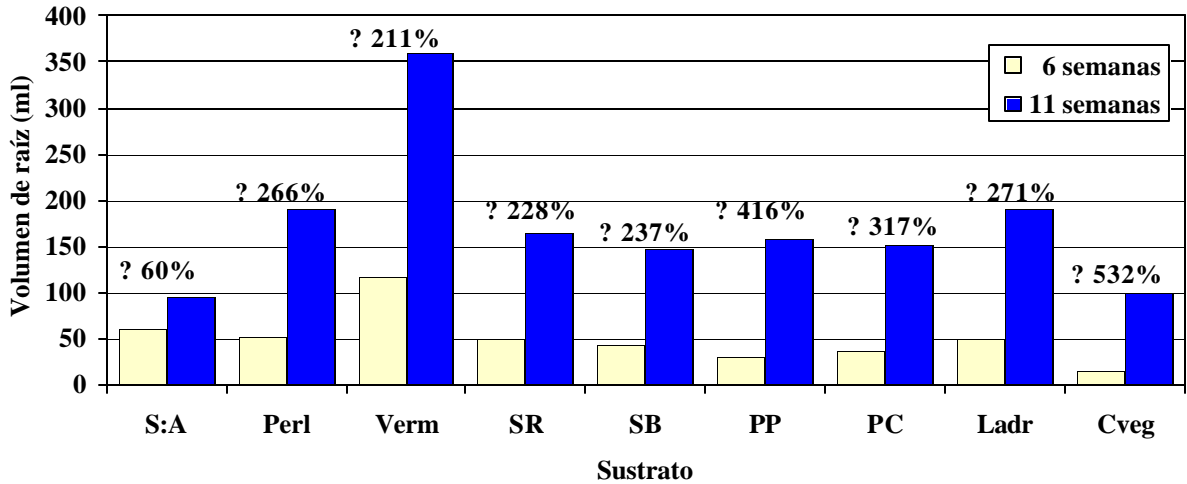


Figura 1. Efecto de los sustratos (S:A=suelo agrícola:arena, Perl=perlita, Verm=vermiculita, SR=suelo rojo, SB=suelo blanco, PP=piedra pómez, PC=piedra de cantera, Ladr=ladrillo y Cveg=carbón vegetal) en el incremento (?) del volumen de raíces de *Brachiaria decumbens* durante la producción de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular entre las 6 y 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

4.3.2 Peso seco de las raíces

Al igual que en el volumen de raíces, el pasto cultivado en vermiculita presentó el mayor peso seco de raíces, el cual fue significativamente superior a los demás tratamientos. El mayor incremento porcentual en esta variable se presentó en la piedra pómez, pero su peso seco final fue el más bajo de todos los tratamientos; el testigo mostró uno de los incrementos más bajos, debido posiblemente a que no se le aplicó la solución nutritiva (Figura 2).

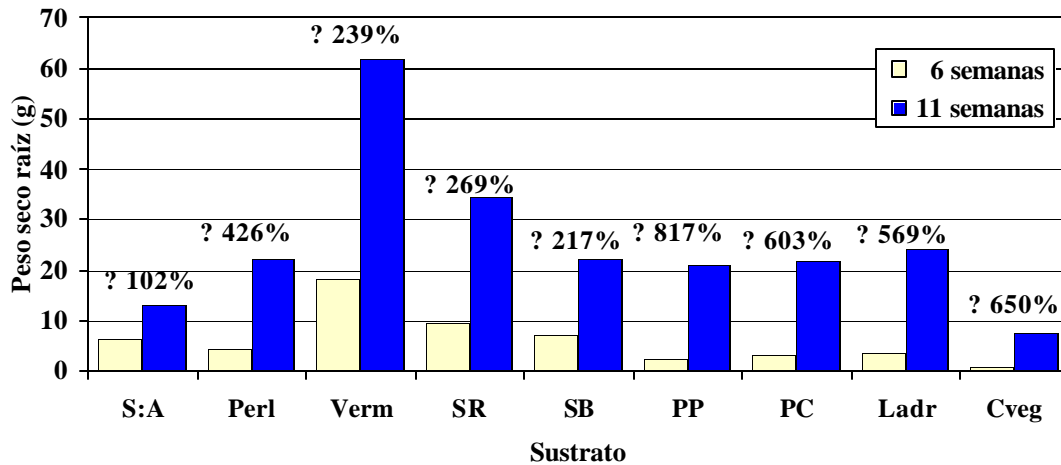


Figura 2. Efecto de los sustratos en el incremento (?) del peso seco de raíces de *Brachiaria decumbens* durante la producción de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular entre las 6 y 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

4.3.3 Peso seco del follaje

El mayor volumen y peso seco de raíces se obtuvo al cultivar el pasto en vermiculita lo que facilitó un mayor potencial de absorción de agua y nutrimentos, lo cual se vio reflejado en el mayor peso seco del follaje. El mayor incremento porcentual se observó en el carbón vegetal pero el peso seco final fue menor que la mayoría de los tratamientos. El testigo reflejó uno de los menores pesos secos del follaje en ambos muestreos y durante el ensayo estas plantas presentaron una coloración amarillenta, a diferencia del color verde intenso observado en los demás tratamientos, posiblemente por el efecto de la solución nutritiva (Figura 3).

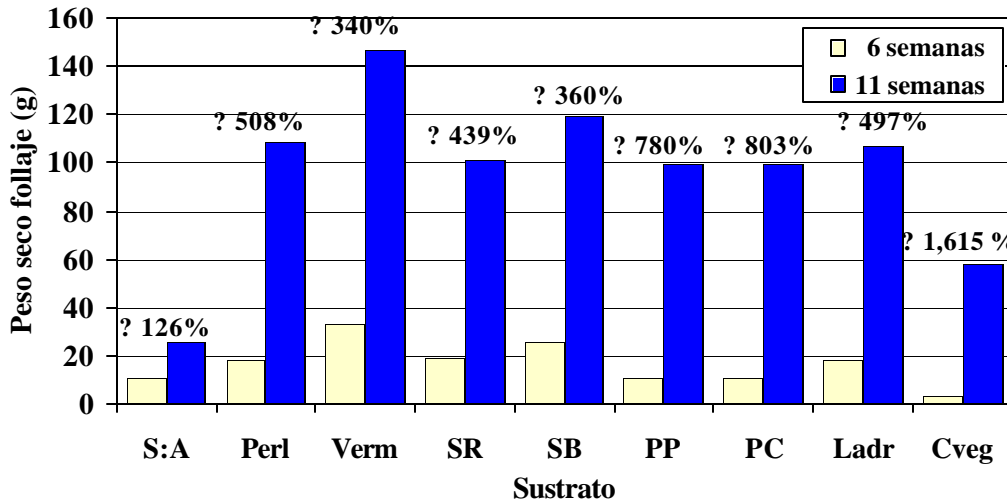


Figura 3. Efecto de los sustratos en el incremento (?) del peso seco del follaje de *Brachiaria decumbens* durante la producción de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular entre las 6 y 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

4.3.4 Número de esporas

El mayor número de esporas se observó en el testigo, tanto en el primer como en el segundo muestreo. Este presentó una baja concentración de P que favoreció la multiplicación de las esporas y además no recibió aplicación de solución nutritiva, lo que no alteró las características químicas del sustrato. Los sustratos restantes presentaron un número de esporas significativamente menor, debido posiblemente a ciertas características químicas específicas como la cantidad P y el pH (especialmente de la piedra de cantera y el carbón vegetal) que pudieron limitar el desarrollo de esporas (Sieverding, 1991). Según Manjarrez *et al.* (2000) la efectividad del hongo en algunos casos es independiente de la cantidad de P presente. Por otro lado, todos los tratamientos mostraron un incremento en el número de esporas entre el primer y segundo muestreo. Debido al peso relativamente liviano de la perlita y vermiculita, no se logró ajustar los 100 g requeridos para la prueba; esto pudo haber sido una fuente de error en el conteo de esporas (subestimación) (Figura 4).

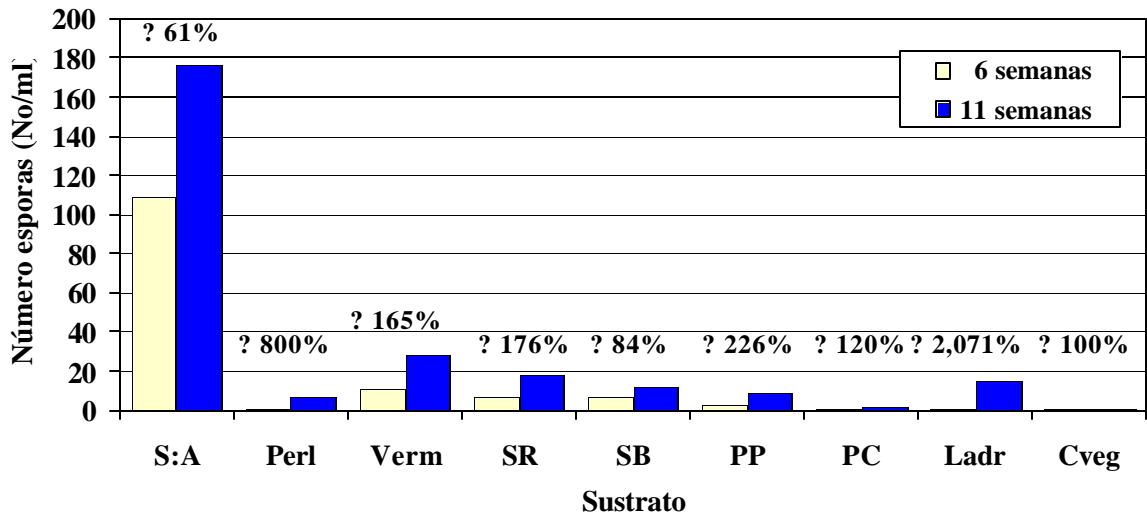


Figura 4. Efecto de los sustratos utilizados para la producción de inoculante micorrízico en el incremento (?) del número de esporas de micorriza vesículo-arbuscular entre las 6 y 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

4.3.5 Tasa de infección de las raíces

La piedra de cantera presentó la mayor tasa de infección por MVA en ambos muestreos, respuesta que pudo deberse a que este sustrato presentó una de las menores concentraciones de P, después del suelo blanco. La solución nutritiva pudo haber jugado un papel importante en la respuesta de esta variable, debido a la mayor cantidad de raíces generadas por parte de la planta hospedera, lo que permitió una mayor cantidad de exudados atractivos para la penetración y colonización por el hongo. Por otra parte, se observó el mayor incremento porcentual en la perlita, ladrillo y suelo rojo. Esto no sucedió en el testigo, el mismo que decreció en un 6%, lo cual no refleja mayor diferencia con la infección del primer muestreo (Figura 5).

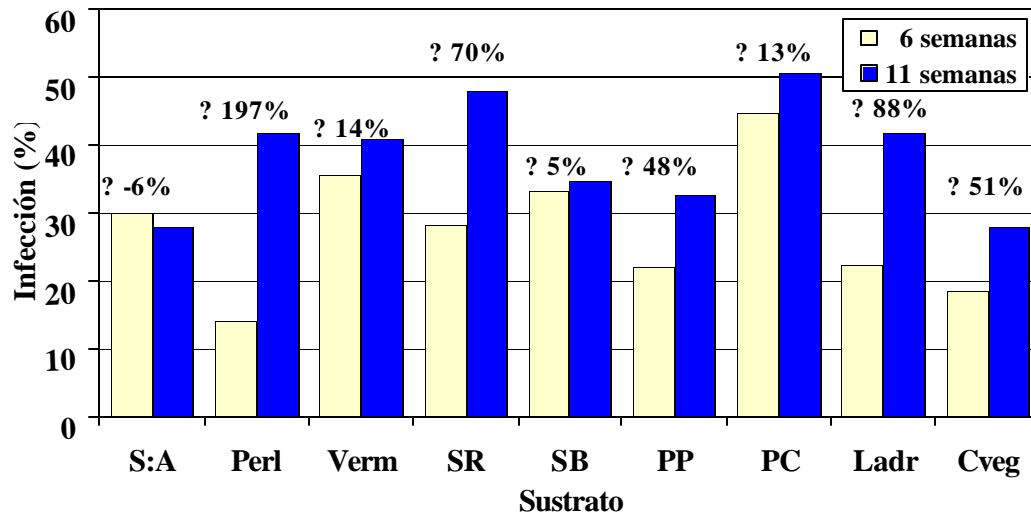


Figura 5. Efecto de los sustratos en el incremento (?) de la colonización por micorriza vesículo-arbuscular en las raíces de *Brachiaria decumbens* durante la producción de inoculante micorrízico entre las 6 y 11 semanas después de la siembra. Zamorano, Honduras, 2002.

4.4 ANÁLISIS ECONÓMICO

4.4.1 Costos diferenciales

Para realizar la evaluación económica del ensayo se definió como costos diferenciales el sustrato, la solución nutritiva y la mano de obra requerida; los cuales son afectados por los tratamientos alternativos considerados. La estimación del costo de mano de obra se basó en los salarios manejados en Zamorano al momento del ensayo (Cuadro 18).

El mayor costo diferencial lo reflejó el carbón vegetal, debido a que su costo de adquisición es relativamente alto en comparación con los demás sustratos (excepto con la vermiculita y piedra pómez). Por otra parte, la preparación de este sustrato (molido) junto con el ladrillo, representaron los costos más altos de mano de obra, debido a la dificultad para prepararlos. El costo por kg de inoculante de los diferentes sustratos varió considerablemente, debido a que la cantidad de sustrato requerida para ajustar el kg de inoculante varía según su densidad aparente.

Cuadro 18. Costos diferenciales de la producción de inoculante de micorriza vesículo-arbuscular (para 100 maceteros y por kg) utilizando sustratos inorgánicos como medios de crecimiento. Zamorano, Honduras, 2002.

Costos diferenciales (US \$/100 maceteros)						
Tratamientos	Sustrato	Sol. nutritiva^x	Mano obra^y	Total	Co/kg inoculante	Co/macetero
Suelo:arena	1.28	0	0.42	1.70	0.01	0.02
Perlita	17.11	350.71	1.00	368.82	23.02	3.69
Vermiculita	48.73	350.71	1.00	400.44	15.38	4.00
Suelo rojo	1.26	350.71	1.29	353.26	1.55	3.53
Suelo blanco	1.22	350.71	1.29	353.22	1.73	3.53
Piedra pómez	45.47	350.71	33.79	429.97	4.59	4.30
Piedra de cantera	2.72	350.71	1.29	354.72	2.17	3.55
Ladrillo	5.85	350.71	58.31	414.87	2.77	4.15
Carbón vegetal	42.67	350.71	37.88	431.26	5.56	4.31

^x Los costos detallados se muestran en el Anexo 4.

^y La cantidad de tiempo empleada en la mano de obra se determinó con base en el trabajo de una persona.

Tasa de cambio: L 16.63 / US \$ 1.0

5. CONCLUSIONES

1. Los sustratos inorgánicos evaluados en la producción de inoculante de VAM y la aplicación de la solución nutritiva tuvieron un efecto positivo considerable en las variables evaluadas, especialmente en la infección de raíces y en el peso seco de raíces y follaje de *B. decumbens*.
2. La aplicación de solución nutritiva en los sustratos evaluados (excepto el testigo), tuvo un marcado efecto en el desarrollo de la micorriza y de la planta hospedera.
3. La calidad del inoculante producido en estos medios inertes se afecta de dos maneras: la cantidad de esporas disminuye y el porcentaje de infección aumenta en la mayoría de los medios utilizados, comparándolos con la producción en sustrato suelo:arena.
4. El tiempo influyó significativamente en las repuestas de las variables evaluadas ya que todos los tratamientos presentaron incrementos considerables en las mismas entre el primer y segundo muestreo.
5. El inoculante producido en los sustratos inorgánicos, una vez cumplidos los demás requerimientos, facilita la introducción legal del producto a otros países, sin correr el riesgo de introducir enfermedades que no estén presentes en la zona.
6. Los costos diferenciales para la producción de inoculante de VAM en los sustratos alternativos son relativamente más altos que los del sustrato convencional, por lo que no resulta económicamente factible su uso en la producción comercial. A pesar del alto costo, para fines de introducción de cepas madres en pequeñas cantidades, hacia un país donde se quiere conducir investigación o iniciar su producción comercial, su empleo es justificado.

6. RECOMENDACIONES

1. Validar el inoculante producido en los mejores sustratos inorgánicos mediante la técnica del número más probable u otra, para determinar su efectividad y la respuesta agronómica en cultivos hospederos.
2. Evaluar mezclas de sustratos inorgánicos con el fin de reducir características químicas inadecuadas que podrían afectar el desarrollo de la micorriza y la calidad del inoculante.
3. Buscar técnicas más viables y menos costosas en cuanto a mano de obra con respecto a la preparación de los sustratos (molido).
4. Evaluar otras alternativas de producción de inoculante de VAM en sustratos inorgánicos que sean menos costosas como es el caso de la arena, bentonita, grava fina y otros.
5. Determinar una solución nutritiva específica para cada sustrato con base en sus análisis químicos y los requerimientos nutricionales de *B. decumbens*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarado, S. 1998. Preparación de soluciones nutritivas para fertilización. *In: Memorias del I Seminario Internacional de Fertigación*. Ed. J. Espinosa. Quito, Ecuador. INPOFOS (Instituto de la Potasa y el Fósforo, EC). 193 p.

Álvarez, J.D.; Sánchez, O.; Montoya, G. 1997. Uso y manejo de biofertilizantes en la agricultura regional (en línea). Chiapas, México. Consultado 6 abril 2002. Disponible en <http://www.laneta.apc.org/rock/ecosur/ecosur05.htm>

Bethlenfalvay, G.J.; Schüepp, H. 1994. Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability. *In: Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Eds. S. Gianinazzi; H. Schüepp. Basel, Switzerland. Birkhauser Verlag. 226 p.

Brundrett, M.; Bougher, N.; Dell, B.; Grovet, T.; Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Canberra, Australia. ACIAR Monograph. 374 p.

Calderón, F. 1997. Preparación de la solución nutritiva: Los fertilizantes líquidos. *In: Hidroponía: Una esperanza para Latinoamérica*. Curso-taller Internacional de Hidroponía. Ed. A. Rodríguez. Lima, Perú. 393 p.

Carrasco, G.; Izquierdo, J. 1996. La empresa hidropónica de mediana escala: La técnica de la solución nutritiva recirculante ("NFT"). Chile. Universidad de Talca. Editorial de Talca. 105 p. (Manual técnico).

CIMMYT, 1988. La formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos. Manual metodológico de evaluación económica. México, D.F., México. CIMMYT. 79 p.

Douds Junior, D.D.; Gadkar, V.; Adholeya, A. 2000. Mass production of VAM fungus biofertilizer. *In: Mycorrhizal biology*. Eds. K. G. Mukerji; B.P. Chamola; J. Singh. New York, USA. Kluwer Academic / Plenum Publishers. 336 p.

Ferguson, J.J.; Woodhead, S.H. 1982. Production of endomycorrhizal inoculum. *In: Methods and principles of mycorrhizal research*. Ed. N. C. Schenck. Minnesota, USA. APS PRESS. p. 47-51.

Fisher Catalog. 2002-2003. Pittsburg, USA. p. 1-416.

Gómez-Cruz, G. 1995. La micorriza vesículo-arbuscular en frutales. *In: Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable*. Eds. R. Ferrera-Cerrato; J. Pérez-Moreno. Montecillo, Estado de México. Colegio de postgraduados en Ciencias Agrícolas. 233 p.

González-Chávez, M.C. 1995. Interacción de la simbiosis endomicorrízica y la fijación biológica de nitrógeno. *In: Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable*. Eds. R. Ferrera-Cerrato; J. Pérez-Moreno. Montecillo, Estado de México. Colegio de postgraduados en Ciencias Agrícolas. 233 p.

Harley, J.L.; Smith, S.E. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, Londres, Reino Unido. 483 p.

Hernández, A. 2000. Las micorrizas (en línea). Cataluña, España. Consultado 6 abril 2002. Disponible en www.terralia.com

Herrera, R.; Ferrer, R. 1991. Curso-taller sobre uso y manejo de las micorrizas en la agricultura. La Habana, Cuba. Instituto de Ecología y Sistemática de la Academia de las Ciencias de Cuba. 51 p.

Hummert International's Commercial Horticultural Supply Catalog. 2001/2002. Earth City, USA. 576 p.

Infoagro. s.f. Tipos de sustratos de cultivo (en línea). s.l. Consultado 10 julio 2002. Disponible en http://www.infoagro.com/industria_auxiliar/tipo_sustratos.asp

Jarstfer, A.G. 1970a. Método para aislamiento de esporas. University of Florida, Soil Science Department, 2171 McCarty Hall, Gainesville, FL 32611-0151 USA.

Jarstfer, A.G. 1970b. Método para clarificar y teñir muestras de raíces. University of Florida, Soil Science Department, 2171 McCarty Hall, Gainesville, FL 32611-0151 USA.

Jeangille, P. s.f. Sustratos para la Horticultura en regiones tropicales y subtropicales. Santiago, Chile. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, CL). Oficina Regional para América Latina y el Caribe. 76 p. (Manual técnico).

Linderman, R.G.; Pflieger, F.L. 1994. Mycorrhizae and plant health. Eds. F. L. Pflieger; R. G. Linderman. Minnesota, USA. The American Phytopathological Society. 344 p.

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, México. MUNDI-PRENSA S.A. de C.V. p. 239-250.

Marulanda, C.; Izquierdo, J. 1997. La huerta hidropónica popular. 2da. ed. Santiago, Chile. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, CL). Oficina Regional para América Latina y el Caribe. 118 p. (Manual técnico).

Menge, J.A.; Timmer, L.W. 1991. Procedures for inoculation of plants with vesicular-arbuscular mycorrhizae in the laboratory, greenhouse, and field. *In: Methods and principles of mycorrhizal research.* Ed. N. C. Schenck. Minnesota, USA. APS PRESS. p. 59-66.

Novedades Agrícolas. s.f. Sustratos (en línea). s.l. Consultado 21 junio 2002. Disponible en http://www.novedades-agricolas.com/htm/servi/6_/6_sus_3.htm

Perez-Moreno, J. 1995. La simbiosis ectomicorrízica y su importancia ecológica. *In: Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable.* Eds. R. Ferrera-Cerrato; J. Pérez-Moreno. Montecillo, Estado de México. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. p. 217.

Raddatz, E.C. 2001. VAM y la resistencia de las plantas contra causantes de daños. Cali, Colombia. 17 p.

Rao, V.P.; Pawar, S.E.; Singh, S.N. 1995. Production and application of vesicular-arbuscular mycorrhizal inocula for sustainable agriculture. *In: Mycorrhizae: biofertilizers for the future.* Eds. A. Adholeya; S. Singh. New Delhi, India. TATA ENERGY RESEARCH INSTITUTE. p. 424-427.

Safir, G.R. 1994. Involvement of cropping systems, plant produced compounds and inoculum production in the functioning of VAM fungi. *In: Mycorrhizae and plant health.* Eds. F. L. Pflieger; R. G. Linderman. Minnesota, USA. The American Phytopathological Society. p. 239-252.

Sánchez, M.J. 2000. Aplicación de composta y sulfato de calcio a un suelo de baja fertilidad y su efecto sobre la inoculación con micorrizas arbusculares en jitomate. Reunión Iberoamericana y III Simposio Nacional sobre Simbiosis Micorrízica. Guanajuato, México. p. 4.

SAS (SAS Institute Inc, US).1994. SAS[®] User's Guide Statistics. Version 6.12 Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC.

Sieverding, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Eschborn, Germany. Technical Cooperation-Federal Republic of Germany. 371 p.

8. ANEXOS

Anexo 1. Distribución de los tratamientos, en el invernadero, para la producción de inoculante de micorriza en maceteros.

○ ○ ○ ○ Suelo blanco
Perlita
Piedra pómez
Suelo rojo
Suelo:arena
Vermiculita
Ladrillo
Piedra de cantera
Carbón vegetal

Ladrillo
Vermiculita
Piedra de cantera
Carbón vegetal
Perlita
Suelo rojo
Suelo blanco
Piedra pómez
Suelo:arena

Piedra de cantera
Carbón vegetal
Suelo:arena
Perlita
Piedra pómez
Suelo rojo
Vermiculita
Ladrillo
Suelo blanco

○ ○ ○ ○ Perlita
Carbón vegetal
Suelo blanco
Suelo:arena
Ladrillo
Piedra de cantera
Piedra pómez
Vermiculita
Suelo rojo

Ladrillo
Piedra pómez
Vermiculita
Suelo blanco
Piedra de cantera
Suelo rojo
Carbón vegetal
Perlita
Suelo:arena

Suelo rojo
Vermiculita
Piedra de cantera
Piedra pómez
Suelo blanco
Ladrillo
Suelo:arena
Perlita
Carbón vegetal

Anexo 2. 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 centrifuga. 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 centrifuga y afora 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.

Anexo 3. 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:
 - 15 minutos para cebolla y otras raíces tiernas,
 - 30 minutos para la mayoría de raíces (p.e. maíz, gramíneas)
5. 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

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 4. Costos de preparación de la solución nutritiva para la producción de 100 maceteros de Mycoral[®] en el pasto *Brachiaria decumbens*.

Compuesto	g/L	Costo (US \$)/L	Costo Total (US \$) ^a
Urea	6.39	0.0013	0.02
K ₂ HPO ₄	8.33	1.84	30.67
K ₂ SO ₄	5.11	0.54	9.00
CaNO ₃ ·4H ₂ O	67.70	8.21	136.86
MgSO ₄ ·7H ₂ O	45.0	7.30	121.69
H ₃ BO ₃	0.11	0.013	0.22
FeCl ₃	1.47	0.14	2.33
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.0053	0.001	0.02
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1081	0.03	0.50
ZnCl ₂	0.0014	0.0006	0.01
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0013	0.0008	0.01
Subtotal			301.34

Material y equipo	Cantidad	Costo unitario	Costo/100 maceteros
Agitadores magnéticos ³	2	8.05	0.54
Balanza ⁴	1	230	5.11
Balanza de precisión ⁴	1	1450	32.22
Beaker plástico (500 ml) ²	1	4.30	0.29
Beaker plástico (5000 ml) ²	2	23.55	3.14
Espátula ⁴	1	1.94	0.04
pHmetro ⁴	1	192.40	4.28
Pipeta (5 ml) ²	1	0.40	0.03
Plato agitador ⁴	1	92.56	2.06
Platos hexagonales ¹	2	0.18	0.06
NaOH (ml)	2	0.05	0.10
HCl (ml)	2	0.09	0.17
Tanque almacen. (20 L) ²	1	20	1.33
Subtotal			49.37
TOTAL			US \$350.71

^a Se prepararon 16.67 L para 100 maceteros

¹ Duran aproximadamente dos años (6 ciclos de producción)

² Duran aproximadamente cinco años (15 ciclos de producción)

³ Duran aproximadamente diez años (30 ciclos de producción)

⁴ Duran aproximadamente 15 años (45 ciclos de producción)

Nota: Hay 3 ciclos de producción por año