

capítulo **3**

**AVANCES EN LA PRODUCCIÓN DE
INOCULANTES MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES**

Dr.C. Félix Fernández Martín

CITACIONES

Obra general

Rivera, R. y Fernández, K. El Manejo eficiente de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: El Caribe. La Habana: Ediciones INCA, 2003. 166 p. ISBN 959-7023-24-5

Capítulo 1

Fernández, F. La Simbiosis micorrízica arbuscular. En: Rivera, R. y Fernández, K. (Eds.). El Manejo eficiente de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: El Caribe. La Habana: Ediciones INCA, 2003. p. 13-48. ISBN: 959-7023-24-5

Capítulo 2

Rivera, R. y Fernández, K. Bases científico-técnicas para el manejo de los sistemas agrícolas micorrizados eficientemente. En: Rivera, R. y Fernández, K. (Eds.) El Manejo eficiente de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: El Caribe. La Habana: Ediciones INCA, 2003. p. 51-94. ISBN: 959-7023-24-5

Capítulo 3

Fernández, F. Avances en la producción de inoculantes micorrízicos arbusculares. En: Rivera, R. y Fernández, K. (Eds.). El Manejo eficiente de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: El Caribe. La Habana: Ediciones INCA, 2003. p. 97-110. ISBN: 959-7023-24-5

Capítulo 4

Rivera, R. Resultados de las campañas de validación. En: Rivera, R. y Fernández, K. (Eds.). El Manejo eficiente de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: El Caribe. La Habana: Ediciones INCA, 2003. p. 113-131. ISBN: 959-7023-24-5

Capítulo 5

Hernández, A., Martín, J.R. y Rivera, R. Un estudio de caso: El Caribe. En: Rivera, R. y Fernández, K. (Eds.). El Manejo eficiente de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: El Caribe. La Habana: Ediciones INCA, 2003. p. 134-166. ISBN: 959-7023-24-5

CAPÍTULO 3. AVANCES EN LA PRODUCCIÓN DE INOCULANTES MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

3.1. Metodologías generales de cultivo de hongos Glomales

Para realizar el cultivo de los hongos Glomales se han propuesto diversas metodologías, unas más complejas que otras, pero todas con un denominador común: involucran una planta hospedera o explantes de raicillas, ya que estos micetos se asocian con las plantas debido a su condición de simbioses obligados para cumplimentar su ciclo de vida satisfactoriamente.

Lo que diferencia realmente una metodología de otra es el medio en el cual se desarrolla esta simbiosis.

Las tecnologías más utilizadas son aquellas que involucran a la planta en un medio o sustrato sólido, empleando materiales que van desde suelo, turba, perlita, vermiculita, arena, arcilla, arcilla calcinada, varios compostales vegetales y forestales y / o mezclas de algunos de ellos (Morton *et al.*, 1993).

También se han hecho crecer plantas en medios hidropónicos, poniendo en contacto a las raicillas micorrízicas con una fina película de solución nutritiva que fluye de manera continua y a velocidad constante, aportando todos los requerimientos nutrimentales de la planta. Esta metodología tiene como inconveniente que es preciso ser muy riguroso en el control del pH de la solución, pues al no encontrarse en el suelo, carece por lo tanto de la capacidad de estabilización química o buffer y el mismo puede variar con la entrada al medio de los exudados de la planta. Por otra parte, es necesario preinocular la planta con el hongo deseado, previo al contacto con la solución nutritiva (Elmes *et al.*; 1984).

Otra importante metodología propuesta para la producción de inoculante micorrízico, lo constituye sin duda el cultivo aeropónico, desarrollado por Hung y Sylvia (1988), el cual se basa en el cultivo de plantas preinfectadas en una cámara oscura, donde sus raicillas colonizadas con el hongo deseado, son irrigadas temporalmente a través de un dosificador de solución nutritiva, creciendo de forma acelerada de 12 a 15 semanas. Posteriormente, las raicillas y propágulos micorrízicos son cosechados o removidos de la cámara, los segmentos radicales cortados a 1 cm, y las esporas aisladas por tamizado, para su posterior uso. Según Sylvia y Jarstfer (1992), se logra un material muy homogéneo y libre de patógenos.

La técnica más novedosa desde el punto de vista científico, resulta el cultivo dual de raíces y hongos micorrizógenos (cultivo monoaxénico). Estos trabajos iniciaron con el cultivo *in vitro* de micorrizas por parte de Mosse y Hepper (1975), en raíces de tomate, pero no fueron muy tomados en cuenta, hasta que Mugnier y Mosse, (1987) lograron la producción *in vitro* usando raíces transformadas por el plásmido RitDNA presente en las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*.

A partir de entonces se han desarrollado muchos protocolos para el crecimiento *in vitro*, los cuales se realizan en tres fases, esterilización superficial de esporas y raíces, incubación de placas durante 12 semanas y cosecha de inoculante micorrízico concentrado.

Este método resulta muy prometedor para la producción de inoculante micorrízico arbuscular, sin embargo, este tipo de cultivo monoaxénico no es tan sencillo pues debe tomarse en cuenta que cada especie de hongo micorrizógeno y de hecho cada una de las simbiosis, constituyen un sistema con diferentes requerimientos nutricionales, aún en órganos individuales, como es el caso de la raíz.

Por otra parte, el hecho de que todavía no están bien establecidos los niveles de atmósferas de CO₂ que propician el intercambio gaseoso de la simbiosis, las fuentes de nutrimentos, los requerimientos de cada hongo que se pretenda cultivar, los microorganismos de naturaleza endófito que intervienen en el proceso, etc., apoya la necesidad futura de esfuerzos de investigación profunda en esta metodología tan prometedora.

Actualmente, cuando se pretende potenciar la producción de inoculantes micorrízicos arbusculares, el uso de sistemas que involucren sustratos sólidos, suelos o la mezcla de este último con sustancias inertes, presentan una superioridad clara en cuanto a la cantidad de especies y géneros de Glomales que pueden ser cultivados (Fig. 13).

Además, otra de las ventajas de la producción de micorrizas en sustratos sólidos y / o suelos, consiste en que se puede almacenar por periodos largos de tiempo de hasta 5 años a temperaturas de 4 °C (Morton, 1993).

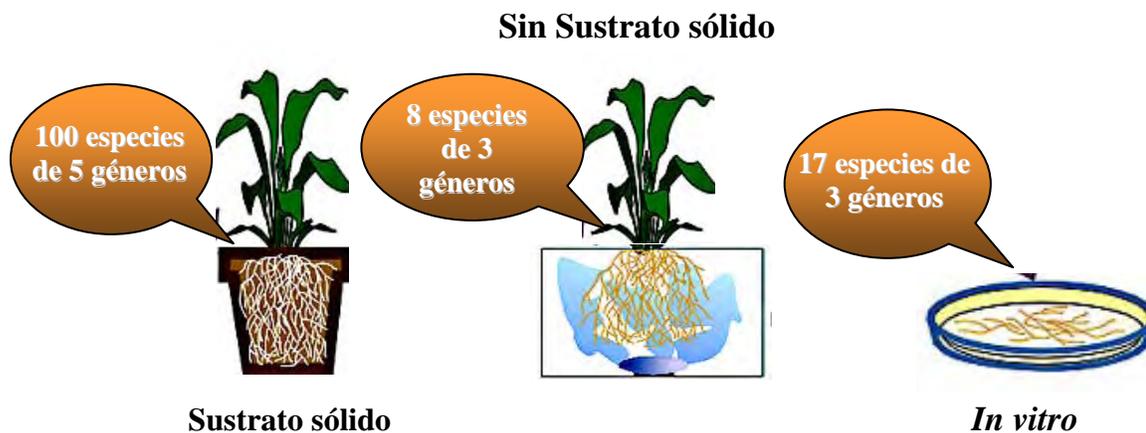


Figura 13. Número de especies y géneros totales de Glomales cultivados de acuerdo al medio de cultivo en donde se desarrollen. (Tomado de <http://invam.caf.wvu.edu>.)

3.2. Producción de inóculos micorrízicos

El avance que se ha logrado en el tema de las asociaciones micorrízicas incluye también el desarrollo de técnicas que permiten la producción masiva de inoculante de alta calidad; sin embargo, siempre serán necesarios los estudios ecológicos para la selección de nuevas especies, e incluso de ecotipos de una misma especie adaptados a ambientes específicos (Manjares *et al.*, 2000).

3.2.1. Tipos de Hongos. Características principales de su producción

El grupo de investigación que dirige la colección más prestigiosa de especies de Glomales, INVAM, ha recuperado, durante la producción continua de micorrizas arbusculares con fines taxonómicos, suficiente información acerca de las principales características reproductivas de las especies que forman la asociación micorrízica arbuscular (INVAM, 1993). De esta forma, determinaron diferencias esenciales relacionadas con el potencial infectivo y la genealogía de los organismos fúngicos.

De acuerdo con esto, se presentan consistentes y marcadas diferencias entre los miembros de *Gigaspora* y *Glomus*, los géneros más cultivados y estudiados en la literatura y a su vez, más extendidos en el planeta. A continuación detallaremos las diferencias esenciales entre estos géneros, las cuales pueden ser extrapoladas a los dos subórdenes existentes en los Glomales: Gigasporinae y Glominae (Ver Capítulo 2).

Género: *Gigaspora*

Según Biemann y Linderman (1983), solo las esporas parecen ser los propágulos infectivos en las especies pertenecientes a este género y el 90 % de las que han sido aisladas de suelos tienen capacidad infectiva. Según Walker (1992), su distribución en Europa es muy baja o nula.

Género: *Glomus*

Todos los propágulos son altamente infectivos, por lo tanto el cultivo de ellos se puede comenzar a partir de cualquiera de las partes deseadas; los inóculos, aún sin esporas mantienen un elevado potencial infectivo. Generalmente las especies de este género han sido reportadas como eficientes en los diferentes tipos de suelos estudiados (Ver Capítulo 3).

3.2.2. Plantas hospederas para la reproducción de inoculante micorrízico

Otro aspecto importante a la hora de reproducir estos hongos es el genotipo del hospedante. Con relación a esto se debe seleccionar una especie con dependencia micorrízica, preferentemente una planta de ciclo corto (4 - 6 meses), que posea a su vez un sistema radical que garantice una adecuada producción de propágulos micorrízicos. Entre las especies que han demostrado ser buenas hospedantes se encuentran:

Brachiaria decumbens, *Plantago lanceolata*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Paspalum notatum*, *Fragaria sp.*, *Zea mays* y *Allium cepa*.

3.2.3. Producción de inoculantes comerciales

La producción de inoculantes de HMA tiene características peculiares, puesto que para completar su ciclo de vida necesitan reproducirse en las raíces de una planta hospedera donde colonizan las raicillas y desarrollan los propágulos fúngicos, todo lo cual constituye en su conjunto el inóculo micorrízico, a diferencia de la gran mayoría de los inoculantes microbianos que son obtenidos por vía fermentativa de manera artificial (Sieverding, 1991). En el presente documento, se hará énfasis en la producción de inoculante sólido a escala comercial y en especial, los avances obtenidos en Cuba en la utilización de un inóculo de este tipo, diseñado para el revestimiento de semillas de especies vegetales de siembra directa en campo, como los granos, leguminosas, etc.

El proceso de producción del inóculo tiene dos etapas fundamentales:

- 1.- Producción de la fuente de inoculante primaria o inóculo certificado.
- 2.- Producción del inoculante agrícola o comercial.

3.2.3.1. Inóculo certificado

La primera etapa se considera esencial, pues de esta dependerá el éxito en los sucesivos pasos de la obtención del inoculante micorrízico.

En este caso se puede partir de diferentes fuentes de inóculo como esporas, hifas, micelio externo del hongo o de las propias raicillas colonizadas. Sin embargo, en las especies del género *Glomus* se recomienda comenzar el proceso a partir de una o varias esporas pregerminadas, en ausencia de micelio externo u otro resto de propágulos, debido a que las esporas pertenecientes a este género poseen un elevado poder infectivo y por otra parte, resultaría más fácil evitar contaminaciones con otros hongos micorrízicos no deseados (Morton *et al.*, 1993).

En esta etapa, el primer aspecto que tiene que ser abordado es la selección de cepas altamente infectivas y efectivas.

Actualmente existen varias técnicas para reproducir el inóculo certificado, sin embargo, el cultivo en recipientes con sustratos sólidos estériles individuales o una mezcla de ellos y una planta hospedera, proporciona un ambiente adecuado para la gran mayoría de las especies de HMA que se conocen.

En este sistema se reproduce el inóculo a partir de la aplicación de la cepa pura debajo de la semilla del hospedero seleccionado y la correspondiente asociación que se establecerá entre la planta y el hongo, alcanzándose, al concluir el ciclo biológico del cultivo, las mayores cantidades de propágulos infectivos (Fig. 14 a).

Durante el crecimiento y desarrollo de la simbiosis micorrízica en este sistema, es recomendable mantener un nivel balanceado entre los elementos nutritivos, de manera que no se creen desequilibrios nutrimentales que afecten el desarrollo de la misma. Para evitar este fenómeno, se aplican diferentes soluciones nutritivas de acuerdo a las necesidades de las plantas, sin afectar el funcionamiento micorrízico.



Fig. 14. Diferentes fases del proceso de producción de EcoMic®. Producción y almacenamiento de inóculo certificado (a y b); áreas de producción y de secado del inóculo agrícola (c, d, e y f).

En el caso concreto de nuestro Instituto (INCA), se realiza el paso previo de multiplicación a partir de inoculantes monospóricos el cual, después del segundo o tercer ciclo, garantiza la presencia de un morfotipo específico que es empleado integralmente como fuente para la obtención del inóculo certificado, incluyendo no solo esporas, sino además fragmentos de raicillas colonizadas y de hifas o micelio externo del hongo.

Por supuesto, esto se realiza siempre y cuando exista un adecuado control de calidad y seguridad que garantice la pureza de la especie reproducida.

Una vez concluido el ciclo de vida de la planta hospedera se procede a separar la parte aérea, dejándose secar el sustrato en el propio recipiente a temperatura ambiente, conteniendo este las raicillas colonizadas, el micelio externo y las esporas que en su totalidad constituyen el inóculo certificado. Este tipo de inoculante debe ser extremadamente puro, pues de ello dependerá la futura producción masiva de esta cepa en la fase agrícola

Posterior al secado, se empaca en bolsas de polietileno o se envasa en recipientes plásticos herméticos para posterior almacenamiento en cámara fría a 4 °C (Fig. 14 b).

En nuestra experiencia, hemos mantenido inoculantes sólidos almacenados de manera viable hasta un período de dos años y una concentración final de esporas. gramo^{-1} de sustrato que oscila entre 120 y 350, de acuerdo al tipo de especie multiplicada y la época del año en que se desarrolla la simbiosis. Las mejores producciones generalmente se obtienen en el período de verano, con temperaturas medias que oscilan entre 30-32° C, coincidentemente, con la mejor etapa de reproducción del *Sorghum vulgare* (Tabla 25).

Tabla 25. Concentración de esporas y tiempo máximo de almacenamiento de las principales especies de la colección del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. (Cuba).

Clave	Especie de HFMA	Concentración Esporas. gramo^{-1}		Tiempo máximo de almacenamiento (años)
		Primavera - Verano	Otoño - Invierno	
Incam 2	<i>Glomus clarum</i>	355	250	2
Incam 3	<i>Glomus spurcum</i>	250	175	1.5
Incam 4	<i>Glomus fasciculatum</i>	274	215	1.5
Incam 5	<i>Glomus mosseae</i>	150	75	1
Incam 7	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	126	85	1

3.2.3.2. Inoculantes agrícolas

El inoculante micorrízico puede ser producido con fines investigativos en una escala menor, bajo condiciones controladas, sin embargo el empleo de este producto biológico en una escala productiva, conlleva a un redimensionamiento tanto en tamaño como en calidad. La producción de inóculo agrícola de micorrizas arbusculares es esencialmente similar al certificado en cuanto a normas de procedimiento, lo que cambia entonces son las condiciones y los materiales que se usan para su obtención.

Generalmente la mayoría de los productores de inoculante agrícola, emplean la metodología descrita por Sieverding (1991), basada en el manejo de áreas controladas y aisladas del suelo, en formas de canteros multiplicadores que pueden llegar a medir hasta 25 m de largo, según las posibilidades de manejo por la empresa productora.

Los canteros o áreas de reproducción, (representan los recipientes en la producción del inóculo certificado), se pueden construir sobre el propio suelo, del largo que se estime, de 1 metro de ancho y de 0.20 metros de profundidad efectiva, de manera que en una distancia de aproximadamente 5 metros lineales y utilizando sustratos con densidad aparente de $1\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, se puedan cosechar alrededor de una tonelada métrica de producto final.

Estos depósitos pudieran ser de polietileno negro reutilizable hasta en dos cosechas, de concreto (fig 14 c, d y e) o simplemente de acuerdo con Sieverding (1991), realizarlos sobre el propio suelo, eliminando la capa biológicamente activa en una profundidad de hasta 25 cm, apisonar el subsuelo y colocar entonces el sustrato deseado para la posterior reproducción de hongos micorrizógenos .

El proceso de inoculación es similar al del inoculante micorrizógeno certificado, los canteros son llenados con el sustrato, posteriormente es colocada una cantidad de inoculante certificado por debajo de la semilla, sembrada la misma y al término del ciclo de vida de la planta se desecha la parte aérea, se seca el sustrato en un área techada con suficiente ventilación y se procede al procesamiento del sustrato, a través de un potente molinado y empaque en bolsas.

3.3. Producción del inoculante comercial EcoMic®

3.3.1. Obtención del bioproducto

Hace aproximadamente unos 15 años se vienen desarrollando en nuestro país toda una serie de investigaciones relacionadas con el uso y manejo práctico de la simbiosis micorrízica arbuscular en agroecosistemas cubanos; pero no fue hasta el año 1993 que se comenzaron a buscar nuevas metodologías de inoculación que redujeran las cantidades de inóculo que se aplicaban a los cultivos agrícolas, pues según las dosificaciones recomendadas hasta ese momento, por la literatura internacional, para los inoculantes producidos a base de mezclas de suelo y materia orgánica, resultaba poco viable la aplicación de volúmenes del orden de 2 a 6 toneladas por hectárea, en un solo ciclo reproductivo y sin poder garantizar su permanencia futura en los ecosistemas.

En este sentido se probaron varios inoculantes y medios de recubrimiento de semillas, que si bien funcionaron, su aplicabilidad distaba de ser eficiente, pues para lograr este objetivo se mezclaban con el inóculo cantidades relativamente altas de sustancias adherentes y secantes que encarecían significativamente la aplicación de la micorriza por la vía de recubrimiento de semilla. (Gómez *et al*, 1995).

Tomando en cuenta estos aspectos, se diseñó un nuevo producto, EcoMic®, el cual se desarrolló sobre un sustrato mineral específico, donde el hongo coloniza las raíces de la planta produciendo durante el proceso gran cantidad de propágulos fúngicos en sus raíces, contando además con una excelente propiedad adherente, pues con la sola presencia de agua hace efectiva la metodología de recubrimiento de semillas.

3.3.2. Ensayos básicos de validación de EcoMic®

Durante una serie de experimentos se logró comprobar la superioridad de este producto, comparado con otro inoculante tradicionalmente producido en Cuba. En la prueba de ambos inoculantes, solo se varió el sustrato, ambos se produjeron en *Sorghum vulgare* y con la cepa *Glomus fasciculatum*.

Los resultados experimentales mostraron que el inoculante EcoMic®, alcanzó una mayor calidad y funcionamiento micorrízico, basado en el número superior de propágulos obtenidos con relación a los encontrados en el soporte tradicional de multiplicación, mezcla suelo: arena: materia orgánica (3:1:1 v/v), tanto en la cantidad de esporas totales con un

valor de 245 esporas .g⁻¹ sustrato, como en la producción de micelio externo arbuscular, el cual se duplica en relación con el sustrato tradicional (Tabla 26).

Tabla 26. Colonización radical, esporulación, micelio externo y frecuencia arbuscular de *Glomus fasciculatum* en *Sorghum vulgare* presente en los inoculantes tradicionales sobre suelo: arena: materia orgánica (S:A:MO) y Ecomic[®] a los 60 y 120 días de establecida la simbiosis micorrízica.

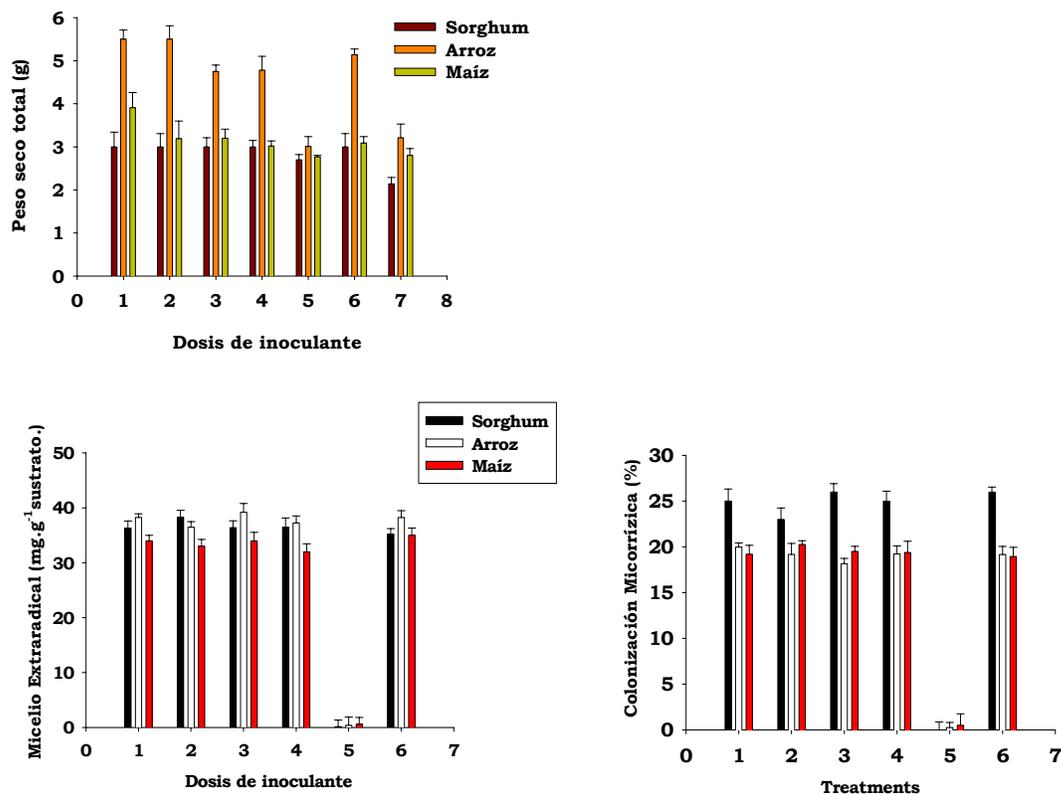
Inoculantes	Colonización %		Micelio Externo mg. g ⁻¹ sustrato		Esporulación		Arbúsculos%	
	60 d	120 d	60 d	120 d	60 d	120 d	60 d	120 d
Ecomic [®]	42.1 c	65.6 a	34.3 b	56.8 a	120 b	245 a	67.4 a	42.9 b
S:A:MO ¹	53.4 b	68.3 a	15.2 d	23.9 c	43 c	86 c	62.9 a	36.6 b
Es x	1.4***		0.38***		2.6***		2.1***	

Leyenda: 1 - Suelo: Arena: Materia orgánica en relación 3/1/1.

Este fenómeno estuvo muy relacionado con las características físico - químicas del sustrato donde se desarrollaron. En este sentido diversos autores (Tisdall y Oades, 1982 y Miller y Jastrow, 2000), han puesto de manifiesto el papel positivo de la compactación presente en el sustrato sobre la emisión de hifas externas que penetran a su vez los microagregados estructurales del sustrato, formando en breve una mayor cantidad de macroagregados estables, con un aumento en la concentración de oxígeno y favoreciendo por lo tanto la respiración y el funcionamiento micorrízico.

El recubrimiento de las semillas con EcoMic[®] se estudió inicialmente en condiciones controladas y aún en las variantes que implicaron una menor dosis de propágulos (10 %), el inóculo garantizó una producción de masa seca adecuada y una presencia significativa de colonización micorrízica, así como una alta producción de micelio externo, sin diferir significativamente con el control inoculado con una dosis de 5 gramos de inoculante tradicional localizado debajo de la semilla (Fig. 15).

Este éxito en el recubrimiento con bajas dosis de inoculante, se debe entre otros aspectos a la gran cantidad de propágulos micorrízicos presentes y especialmente, a la presencia de cantidades de micelio externo activo, propágulo sumamente infectivo y de rápida regeneración en presencia de condiciones óptimas de “germinación”. Sin embargo, en el caso en que se recubrió con el inoculante tradicional el 100 % del peso de la semilla, no se



Leyenda: Dosis de recubrimiento de EcoMic en semillas - 1: 100 %, 2: 50 %, 3: 20 % y 4: 10 %
 Recubrimiento con inoculante tradicional (5: 100%)
 Inoculación con el proceso tradicional (6: 5 g / planta)
Control sin inocular: 7

Figura 15. Efectos del recubrimiento de semillas de Sorgo (*Sorghum vulgare*), arroz (*Oriza sativa*) y maíz (*Zea mays*) con diferentes dosis de EcoMic e inoculante tradicional sobre el peso seco total (g), Micelio externo y colonización micorrízica los 30 días de inoculados los cultivos.

encontraron efectos positivos, lo que evidencia la poca potencia de ese inoculante y la inviabilidad de ser utilizado aún en las dosis mayores para el recubrimiento de semillas.

Según Jasper *et al.* (1989), el micelio extraradical ha desarrollado mecanismos que le permiten permanecer infectivo en el sustrato cuando la estructura de este se mantiene conservada.

Recientemente, aunque en estudios realizados *in vitro*, Bago *et al.* (2000) reportaron que el contenido citoplasmático de las hifas principales o “corredoras”, las más abundantes en la red fúngica a diferencias de las hifas absortivas o BAS, puede mantenerse intacto por largos periodos, incluso años; sugiriendo además, que dicha prolongada vitalidad es debida a la preservación de compartimentos dentro de la hifas externas, donde quedan atrapados numerosos núcleos y contenido citoplasmático viable a la espera de mejores condiciones ambientales o a los exudados de una nueva raíz hospedera en las proximidades.

La respuesta exitosa al recubrimiento de semillas con EcoMic® encontrada en la fase controlada se corroboró en parcelas experimentales, un ejemplo de las cuales se presenta en la tabla 27 para los cultivos de sorgo y maíz.

Se muestra primeramente el efecto positivo de la inoculación micorrízica sobre el rendimiento de ambos cultivos, así como la factibilidad de realizar ésta a través del recubrimiento de las semillas en dosis tan bajas como el 10 % del peso de las mismas.

En el capítulo V se presentan los satisfactorios resultados de las campañas de validación de este producto aplicado a través del recubrimiento de las semillas en los cultivos de siembra directa, lo cuales permiten recomendar la utilización de la simbiosis a escala productiva.

Tabla 27. Evaluación de dosis de recubrimiento de EcoMic® sobre el rendimiento de sorgo (*Sorghum vulgare* cv. V4) y de maíz (*Zea mays* var M-22).

Dosis de Inoculantes	Maíz (t.ha ⁻¹)	Sorgo (t.ha ⁻¹)
Ecomic® 20%	2.90 b	4.89 b
Ecomic® 10 %	2.95 a	5.50 a
Inoculante tradicional (5g. semilla ⁻¹)	2.93 a	5.48 a
Control	1.85 c	3.12 c
ES x	0.15***	0.11***

3.4. Producción masiva y dosificación de EcoMic® por semillas

Se han fabricado hasta la actualidad más de 7 plantas productoras de este biofertilizante en países como Cuba, Colombia y Bolivia, evaluándose asimismo con éxito en España y México.

El producto EcoMic[®] es una serie de inoculantes microbianos elaborados a partir de propágulos de determinadas especies de hongos micorrizógenos arbusculares individuales, de probada infectividad y alta eficiencia.

En la elaboración de este producto se emplean las siguientes especies de HMA de forma individual: *Glomus fasciculatum*, *Glomus mosseae*, *Glomus claroideum* y *Glomus clarum*.

El mismo se obtiene a partir de la inoculación previa de este microorganismo a plantas hospederas por recubrimiento de sus semillas, que incluyen por lo general las especies *Sorghum vulgare* y *Brachiaria decumbens* y de su posterior desarrollo en el sistema radical. El inoculante está listo cuando se cumple el ciclo reproductivo de los cultivos y es extraído conjuntamente con el sustrato, el cual incluye todos los propágulos infectivos del hongo micorrizógeno (esporas, raicillas infectadas y fragmentos de hifas). No obstante, éste puede ser extraído en cualquier otro momento, dependiendo de la cantidad de propágulos existentes en el sustrato).

En la actualidad este producto se fabrica bajo la tecnología de canteros multiplicadores descrita anteriormente (Fig. 16 a, b, c, d, e y f).

3.4.1. Dosificación para recubrimiento de semillas

Este inoculante se aplica de acuerdo a los diferentes tipos de semillas:

SEMILLAS GRANDES: Papa, Boniato, Yuca, Malanga.

Cantidad de inóculo: 20 % peso de la semilla total. ha⁻¹

Cantidad de agua: 5 % semilla total. ha⁻¹

Aplicación: Mezcla de agua + inóculo + semillas.

SEMILLAS MEDIANAS: Maíz, Soya, Sorgo, Algodón, etc.

Cantidad de inóculo: 10 % peso de la semilla total. ha⁻¹

Cantidad de agua: 2 % semilla total. ha⁻¹

Aplicación: Mezcla de agua + inóculo + semillas.

SEMILLAS PEQUEÑAS: Arroz, Pastos, etc.

Cantidad de inóculo: 10 % peso de la semilla total. ha⁻¹

Cantidad de agua: 2 % semilla total. ha⁻¹

Aplicación: Mezcla de agua (1%) + inóculo + semillas.



Figura 16. Pasos de obtención de EcoMic[®] comercial. a y b: preparación y siembra de canteros multiplicadores; c y d: etapas de desarrollo del hospedero *Brachiaria decumbens* inoculadas con *Glomus fasciculatum*; e: molino para el procesamiento del inoculante y f: almacén de inóculo comercial. Fotos a, b y c, corresponden a Planta de producción desarrollada en Bolivia (cortesía de Ms. C. D. Lara y Fotos d, e y f, Planta desarrollada en Colombia (cortesía de Dr. C. R. Plana).

3.5. Normas de calidad y producto libre de fitopatógenos

En la producción de EcoMic[®], tanto el producto certificado de altísima pureza, como el agrícola, elaborado a cielo abierto, donde se manejan volúmenes de producción de hasta 100 toneladas, se aplica un riguroso control de la calidad, y se monitorea de forma sistemática, tanto la colonización micorrízica, como la producción de micelio externo y el grado de pureza de las poblaciones de hongos micorrizógenos que se cultivan.

Los rangos de concentración de esporas / gramo de sustrato, establecidos para ambos tipos de inoculantes son las siguientes:

Inóculo Certificado

Glomus fasciculatum: 125 - 250 esporas / gramo sustrato

Glomus clarum: 250 - 350 esporas / gramo sustrato

Glomus mosseae: 70 - 50 esporas / gramo sustrato

Inóculo Agrícola

Cualquiera de las cepas anteriores: 20-30 esporas / gramo sustrato

Por otra parte, la tecnología de producción desarrollada (Fernández *et al.*, 1999) garantiza en ambos tipos de inoculantes que los productos obtenidos estén libres de fitopatógenos. Para estos fines se encuentra instrumentado un sistema de control de la calidad que evalúa muestras representativas de ambos procesos y que se realiza por un Centro de Referencia contratado a estos efectos.

3.6. Referencias

- Bago, B.; Azcón - Aguilar, C.; Shachar - Hill, Y /*et al.*/. El Micelio externo de la micorriza arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno 78 - 92.. En: Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular. Eds.: A. Alarcón y R. Ferrera – Cerrato. IRENAT. Colegio de Postgraduados. Montecillos. Mundi Prensa. México. 2000.
- Biermann, B. y R. G. Linderman. Effect of container plant growth medium and fertilizer phosphorus on establishment and host growth response to vesicular - arbuscular mycorrhizae. J. Ame. Soc. Hort. Sci. 108: 962 - 971. 1983.
- Elmes, R. P.; Hepper, C. M.; Hayman, D. S. /*et al.*/. The use of vesicular - arbuscular mycorrhiza roots by the nutrient film technique as inoculum for field sites. Ann. Appl. Biol. 104: 437 - 441. 1984.

- Gómez, R.; Fernández, F. y B. Noval. Resultados del recubrimiento de semillas con micorrizas va. Informe de Resultados. INCA. 1995.
- Hung, L. L. y D. M. Sylvia. Production of vesicular arbuscular mycorrhiza fungus inoculum in aeroponic culture. *Appl. Environment Microbiology*. 54: 353 - 357. 1988.
- INVAM. Newsletter Vol 3, No 2. September, 1993. Tomado de <http://invam.caf.wvu.edu>.
- Jasper, D. A.; Abbott, L. K. y A. D. Robson. Hyphae of vesicular arbuscular mycorrhizal fungus maintain infectivity in dry soil, except when the soil is disturbed. *New Phytology*. 112: 101 - 107. 1989.
- Manjarrez, M. J.; Alarcón, A y, R. Ferrera - Cerrato. Biotecnología de la producción de inóculo micorrízico arbuscular y su control de calidad. En: *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular*. Eds.: A. Alarcón y R. Ferrera - Cerrato IRENAT. Colegio de Postgraduados. Montecillos. Mundi Prensa. México. 2000.
- Miller R. M. y Jastrow, D. J. Mycorrhizal Fungi Influence Soil Structure. Chapter 1. En: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Eds.: Y. Kapulnik y D.D. Douds. Jr. 3 - 18. Kluwer Academic Publisher. Printed in the Netherlands. 2000.
- Morton, J. B.; Bentivenga, S. P. y W. W. Wheeler. Germplasm in the international collection of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48: 491 - 528. 1993.
- Mosse, B. y C. .M. Hepper. Vesicular arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiol. Plant. Pathol.* 5: 215 - 223. 1975.
- Mugnier, J y B. Mosse. Vesicular - arbuscular mycorrhizal infection in transformed root - inducing T - DNA roots growth axenically. *Phytopathology* 77: 1045 - 1050. 1987.
- Sieverding, E. *Vesicular Arbuscular Mycorrhiza in Tropical Agrosystem*. Deutsche Gesellschaft fur technische Zusammenarbeit (GTZ) GMBH, federal Republic of Germany. 371 p. 1991.
- Sylvia, D. M. y A. G. Jarstfer. Sheared - root inocula of vesicular arbuscular mycorrhiza fungi. *Appl. Environment Microbiology*. 1: 229 - 232. 1992.
- Tisdall, J. M. y, J. M. Oades. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sciences*. 33: 141 - 163. 1982.
- Walker, C. Systematic and Taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales): a possible way forward. *Agronomie* 12 (10), 887 - 897. 1992.