

Efecto de la aplicación de bentonita sobre la colonización micorrízica y la esporulación de hongos micorrizógenos*

Juan F. LEY RIVAS**, Eduardo FURRAZOLA GÓMEZ**,
Esther COLLAZO ALBERNAS** y Marcia MEDINA VIERA**

ABSTRACT. The use of biological inoculum in the agriculture during the last years it has increased due to the necessity it gives to elevate the production in organic agricultural products. The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) belonging to the Glomeromycota Division forms an indebted symbiosis with the plant roots known as arbuscular mycorrhizae (AM), which have a positive effect on the growth and crops quality and this makes it to extend more and more its use. It was carried out an experience with the objective to study the development of some AM variables on the substrate employed for the reproduction of certified biofertilizer MicoFert®, once applied bentonite to it with the purpose of to increase the substrate pH values. Two formulations were used as substrate, black crowd acid with shell rice in proportion 1:1 (v/v) and black crowd acid with shell rice and bentonite in proportion 2:2:1 (v/v) and four species of AMF were tested: *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*, *Glomus* sp. and *Acaulospora* sp., from the Cuban Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (CCHMA in spanish). The application of bentonite increased the pH value in the substrate and allowed a favorable development of percentage of mycorrhizal colonization of *Glomus intraradices* and *Glomus mosseae* strains, as well increased the total spore number produced of all tested strains, which suggested the beneficial effects of this clay type on the formulation of substrates where the AM fungi spore production will be developed.

KEY WORDS. Biological inoculum, arbuscular mycorrhizae, substratum, MicoFert®

INTRODUCCIÓN

El uso de inoculantes biológicos en la agricultura se ha incrementado en los últimos años debido a la necesidad de elevar la producción de productos agrícolas orgánicos, a la vez que se logra el desarrollo de una agricultura baja en insumos químicos, con producciones estables en el tiempo, una menor carga contaminante del medio ambiente y el desarrollo de cultivos más saludables (Azcón-Aguilar y Barea, 1997). Los hongos micorrizógenos arbusculares pertenecientes a la División Glomeromycota forman una simbiosis obligada con las raicillas de las plantas denominada micorriza, las cuales tienen un efecto positivo sobre el crecimiento y calidad de los cultivos (Smith y Read, 1997).

Esta asociación definida como simbiótica (Trappe, 1987), permite el intercambio de diferentes sustancias en ambos sentidos (planta-hongo) a través de la activación de sistemas enzimáticos (Espinosa-Victoria, 2000), que favorecen el crecimiento y desarrollo de ambos organismos, destacándose la toma mas eficiente de nutrientes del suelo, lo que conlleva al ahorro de fertilizantes químicos (Azcón-Aguilar y Barea, 1992; Smith y Read, 1997; Joner y Johansen, 2000).

MicoFert® es la marca del inóculo comercial que produce el Instituto de Ecología y Sistemática (CITMA) mediante una ecotecnología desde 1993. Su factibilidad está fundamentada en el empleo de la simbiosis micorrízica, que implica la necesidad de un sustrato y una planta hospedera donde se desarrolle la especie fúngica. Una vez establecida la misma, cualquiera de las estructuras del hongo que se encuentran en el suelo o dentro de las raíces son propágulos micorrízicos, ya sean raicillas colonizadas por el endófito arbuscular, esporas o fragmentos de micelio externo arbuscular (Herrera y Ferrer, 1984; Ferrer *et al.*, 2004).

El sustrato, que es el compuesto sólido de forma pura o en mezcla que va a permitir el anclaje del sistema radical de la planta, debe favorecer el crecimiento de la misma y el establecimiento de la simbiosis micorrízica, así como el desarrollo de todas sus estructuras. Uno de los inconvenientes que presenta este tipo de material cuando en su conformación se emplea suelo es el peso del mismo, así como las afectaciones que produce al medio ambiente la extracción continuada de los horizontes superficiales del mismo cuando se van a preparar grandes volúmenes de inóculo. Otra limitación importante es las regulaciones que imponen las Aduanas de los distintos países a la comercialización de estos inoculantes cuando los mismos contienen suelo como soporte principal.

Es por esta razón que los productores e investigadores se hallan en constante búsqueda y desarrollo de sustratos más ligeros (Warner *et al.*, 1985; Sieverding, 1991) donde se puedan obtener mayor cantidad de propágulos, fundamentalmente la producción de esporas que le brinda al producto una mayor viabilidad y confiabilidad en el tiempo.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia de la aplicación de bentonita en el sustrato utilizado para la reproducción del MicoFert® Certificado producido en el IES-CITMA, a través de la evaluación del porcentaje de colonización micorrízica y la producción de esporas de cepas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), con el fin de incorporarla en la formulación de los sustratos empleados en la producción de este biofertilizante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Conformación del sustrato. Se elaboraron dos tipos de sustratos conformados por turba negra ácida + cáscara de arroz en proporción 1:1 (v/v) (S/B) y turba negra ácida + cáscara de

*Manuscrito aprobado en Marzo de 2009.

**Instituto de Ecología y Sistemática, A. P. 8029, C. P. 10800, La Habana, Cuba.

arroz + bentonita natrificada 2:2:1 (v/v) (C/B). La turba utilizada procede de la Empresa Provincial de Suministros Agropecuarios, Provincia de Pinar del Río. La bentonita es un aluminosilicato hidratado de tipo arcilloso constituido fundamentalmente por montmorillonita, procedente de la Empresa Minera de Occidente, San José de las Lajas. Algunas de las propiedades de los sustratos ya obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de las mezclas de los sustratos.

	pH	densidad aparente
S/B	4.41	400g/dm ³
C/B	6.29	495g/dm ³

Producción del biofertilizante. Una vez conformado los dos sustratos se llenaron 32 contenedores plásticos de 55 litros de capacidad de cada sustrato, inoculándose con 4 cepas de HMA (Tabla 2) seleccionadas por separado, utilizando como planta hospedera *Sorghum bicolor* L. Moench. Para cada tratamiento se utilizaron 4 réplicas. Las plantas crecieron en casa de vegetación con techo de cristal, mallas plásticas de porosidad 1-2 mm en las paredes laterales y se aplicó riego por aspersión en días alternos por un período de 13 semanas. Se detuvo el riego al finalizar este período y se dejó secar por espacio de una semana antes de procesar las muestras.

Selección de cepas. Las cepas seleccionadas pertenecen a la Colección Cubana de Hongos Micorrizógenos Arbusculares (CCHMA) radicada en el Instituto de Ecología y Sistemática (CITMA). Las cepas fueron seleccionadas una vez revisadas las mismas, para evaluar la cantidad de esporas según Herrera *et al.* (2004) y comprobar su viabilidad en base a su integridad, color, contenido lipídico, etc. Las cepas seleccionadas fueron *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*, *Glomus sp.* y *Acaulospora sp.* (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas seleccionadas de hongos micorrizógenos arbusculares de la Colección Cubana de Hongos Micorrizógenos Arbusculares.

Cepas	Origen	Esporas/dm ³
<i>Gl. intraradices</i>	Cuba	50 600
<i>Gl. mosseae</i>	México	251 136
<i>Acaulospora sp.</i>	Cuba	111 360
<i>Glomus sp.</i>	Cuba	79 200

Variables analizadas. Los sustratos secos se mezclaron bien y homogeneizaron. Se tomaron 5 submuestras de un contenedor y se mezclaron bien en una bolsa de nylon, para conformar una muestra compuesta aproximadamente de 1 kg. de peso, acción que se repitió en cada uno de los 4 contenedores con cada variante de sustrato y por tipo de cepa, obteniéndose 8 muestras por cepa y 32 muestras en total. En estas muestras finales se cortaron las raicillas y se desagregaron manualmente los agregados orgánicos encontrados. De cada sustrato se

tomaron 100 gramos y se procesó según la metodología de Herrera *et al.* (2004).

Se determinó el porcentaje de colonización micorrízica según Giovanetti y Mosse (1980), una vez teñidas las raicillas por el método de Phillips y Hayman (1970), se cuantificó el número total de esporas por unidad de volumen de sustrato según Herrera *et al.* (2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colonización micorrízica. Después de 3 meses de crecimiento, en todos los tratamientos donde se inocularon cepas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) se observó la colonización micorrízica (Tabla 3), lo cual demuestra la viabilidad de los inóculos micorrizicos empleados.

Tabla 3. Porcentaje de colonización.

CEPAS	S/B	C/B
<i>Glomus intraradices</i>	74 ± 7,94	79 ± 7,51
<i>Gomus. mosseae</i>	58 ± 6,03	63 ± 2,65
<i>Acaulospora sp.</i>	70 ± 0,72	54 ± 6,66
<i>Glomus sp.</i>	48 ± 2,31	54 ± 6,66

S/B Sin bentonita

C/B Con bentonita

± Desviación estándar de los datos

Los mayores valores de colonización micorrízica fueron producidos por la cepa *Glomus intraradices*, con valores superiores al 70% de colonización. Valores de colonización micorrízica tan altos como los producidos en este caso por *Glomus intraradices* han sido reportados para esta misma especie fúngica colonizando raíces de *Acacia holosericea* A. Cunn. ex G. Don en sustratos con o sin suplemento de roca fosfórica por Dupponois *et al.* (2005), quienes observaron valores entre 76,7 y 86,7%.

Por otra parte al analizar la influencia de los sustratos sobre esta variable, se observa que los mayores valores de colonización micorrízica fueron obtenidos, con la sola excepción del porcentaje de colonización mostrado por la cepa de *Acaulospora sp.* en el sustrato donde se aplicó la bentonita, lo cual demuestra la influencia positiva que ejerció la aplicación de la misma sobre el desarrollo de la colonización micorrízica. La cepa de *Acaulospora sp.* presentó un mayor porcentaje de colonización en el sustrato más ácido (S/B) con una diferencia apreciable en relación al sustrato enmendado con bentonita (Tabla 3). Este resultado no es sorprendente si se conoce que la distribución de algunas especies de hongos MA en el suelo se haya correlacionado con el pH del mismo (Abbott y Robson, 1977; Wang *et al.*, 1985; Porter *et al.*, 1987). Específicamente Porter *et al.* (1987) demostraron la incapacidad de *Acaulospora laevis* de colonizar suelos alcalinos, a diferencia de especies del género *Glomus* que si lo logran. También en condiciones naturales de nuestro país, específicamente en suelos, de bosques siempreverdes ubicados en La Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario, con pH de ligeramente ácido a ácido se ha observado una alta presencia de esporas del género *Acaulospora*, lo cual

reafirma la idea de la preferencia de este género por desarrollarse en suelos ácidos (Herrera, com. pers.). Las otras 3 especies de *Glomus* presentaron su mayor porcentaje de colonización en el sustrato C/B, si bien la diferencia fue muy pequeña entre ambos sustratos, por lo que pueden considerarse indiferentes a la aplicación o no de la bentonita.

Producción de esporas por las distintas cepas empleadas.

En todos los sustratos analizados se observó la producción de esporas por las cepas de hongos MA inoculadas (Fig. 1). Dichas cepas mostraron un elevado grado de pureza (mayor al 95%) y al observar las esporas de las mismas en el estereó microscopio se pudo apreciar el color vivo, integridad y contenido lipídico, aspectos indicativos de la viabilidad de las mismas según Walker (1992). La alta concentración de esporas presentes en el inóculo empleado en este experimento (Tabla 2) es muy superior a la que se encuentra de forma normal en los suelos agrícolas, la misma es considerada saturante por Sieverding (1991), y demuestra que este factor no debe ser limitante para la producción de los inóculos, coincidiendo con los resultados obtenidos por Cuenca *et al.* (2007).

En la Fig. 1 se aprecia que la producción de esporas fue siempre mayor en el sustrato enmendado con la bentonita, si bien en el caso de la cepa de *Acaulospora* empleada esta diferencia no fue tan apreciable. Los bajos valores de esporas producidos por esta cepa en el sustrato con bentonita puede considerarse lógico de acuerdo con los argumentos expresados anteriormente, acerca de la preferencia de esta cepa por desarrollarse en sustratos con valores de pH ligeramente ácido a ácido. En el caso de las cepas de *Glomus intraradices* y *Glomus mosseae*, el alto número de esporas producidas en el sustrato con bentonita evidencia la preferencia de estas cepas por desarrollarse en suelos con un pH más elevado.

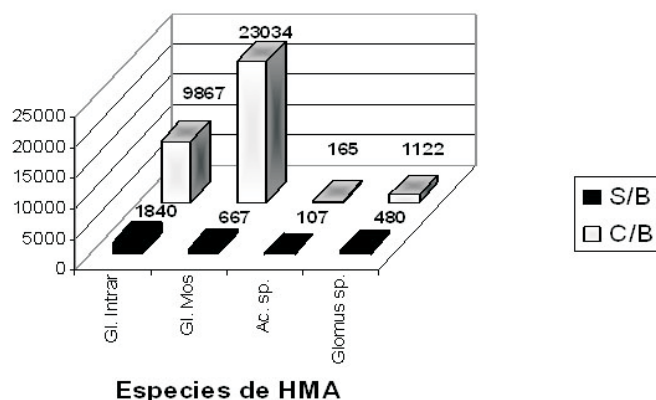


Fig. 1. Número de esporas/dm³

La existencia de otro factor sobre el que influye la adición de bentonita al sustrato, como es la elevación significativa del porcentaje de humedad del mismo, pudiera ser tomado en consideración para interpretar los resultados obtenidos. Anderson *et al.* (1984) no encontraron arbusculos en colonizaciones fúngicas similares a las producidas por los HMA en los hábitats más húmedos estudiados a lo largo de un gradiente de humedad del suelo en un estudio desarrollado en

EE.UU., pues como se conoce bajos niveles de oxígeno afectan la germinación de esporas por los hongos MA (LeTacon *et al.*, 1983). La explicación del fenómeno anterior puede estar relacionado con el potencial redox de los suelos, pues se conoce que tanto la colonización micorrízica como el número de esporas en suelos con alta humedad se correlacionan con el potencial redox de los mismos (Kahn, 1993).

Si bien existen pocas referencias en la literatura mundial referentes a las características específicas que debe poseer un inóculo micorrizógeno para ser comercializado, Manjarrez *et al.* (2000) recomiendan que un producto para ser usado como inoculante micorrizico debe poseer aproximadamente 60% de colonización en la raíz del hospedante. Nuestros resultados muestran que en las condiciones de sustrato S/B, las cepas *Gl. intraradices* y *Ac. sp.* fueron las de más elevado porcentaje de colonización por encima de 60%, mientras que *Gl. mosseae* es ligeramente menor y *Gl. sp.* presentó el menor valor de colonización. Con respecto al sustrato C/B el *Gl. intraradices* y *Gl. mosseae* alcanzaron 79 y 63% de colonización respectivamente mientras que las cepas de *Ac. sp.* y *Gl. sp.* solo llegaron a 54% de colonización, por lo que estos valores resultan bien cercanos al propuesto por Manjarrez *et al.* (2000) para garantizar la adecuada calidad del inóculo micorrizico.

CONCLUSIONES

- ♦ La bentonita propició la mayor colonización micorrízica excepto con la utilización de la cepa del género *Acaulospora*.
- ♦ La cepa *Glomus intraradices* presentó altos valores de colonización micorrízica en ambos.
- ♦ En la producción de inóculo micorrizógeno el sustrato con pH ácido afectó la producción de esporas.
- ♦ La mezcla de sustratos con bentonita aumentó la producción de esporas de las cepas *Glomus intraradices* y *Glomus mosseae*.

RECOMENDACIONES

- ♦ Emplear sustratos con bentonita para obtener un biofertilizante con alta calidad.

REFERENCIAS

- Abbott, L.K y A.D. Robson. 1977. Distribution and abundance of vesicular-arbuscular mycorrhizas in some Western Australian soils. *Australian Journal of Botany* 25: 515-522.
- Anderson, R.C., A.E. Liberta, L.A. Dickman. 1984. The interaction of vascular plants and mycorrhizal fungi across a soil moisture nutrient gradient. *Oecologia* 64: 111-117.
- Azcón-Aguilar C. y JM. Barea 1992. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En: Allen MF (Ed.) *Mycorrhizal Functioning. An Integrative Plant Fungal Process*. Chapman & Hall. New York, EEUU. pp 163-198.
- 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to

- horticulture: Significance and potentials. *Scientia Horticulturae* 68: 1-24.
- Cuenca G., A. Cáceres, G. Oirdobro, Z. Hasmy y C. Urdaneta. 2007. Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia*, Vol 32, No. 001: 23-29.
- Duponnois R., A. Colombet, V. Hienb, J. Thioulousec. 2005. The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of *Acacia holosericea*. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1460-1468.
- Espinosa - Victoria, D. 2000. Diálogo molecular: Hongo Micorrízico Arbuscular - Raíz. pp 93 - 116. En: *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular*. Eds.: Alarcón, A. y R. Ferrera - Cerrato. IRENAT. Colegio de Postgraduados. Montecillos. Mundi Prensa. México.
- Ferrer, R.L., E. Furrázola y R.A. Herrera. 2004. Selección de hospederos y substratos para la producción de inóculos micorrizógenos vesículo-arbusculares. *Acta Bot. Cub.* 168: 1-10.
- Giovannetti, M. y B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Herrera, R.A. y R.L Ferrer. 1984. Glosario de términos en español relativos al estudio de las micorrizas vesículo-arbusculares. *Acta Bot. Cub.* 20: 176-180.
- Herrera, R.A., E. Furrázola, R.L. Ferrer, R. Fernández Valle y Y. Torres Arias. 2004. Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario, Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 35, No. 2: 111-121.
- Joner EJ, A. Johansen 2000. Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 104: 81-86.
- Kahn, A.G. 1993. Vesicular arbuscular mycorrhizae (VAM) in aquatic trees of New South Wales, Australia and their importance at the land water interface. En: Gopal, B., Hillbricht- Ilkowska, A., Wetzel, R.G. Eds., *Wetlands and Ecotones: Studies on Land Water Interactions*. National Institute of Ecology, New Delhi, India, pp. 173- 180.
- LeTacon, F., F.A. Skinner y B. Mosse. 1983. Spore germination and hyphal growth of a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Gerdemann and Trappe) under reduced oxygen and increased carbon dioxide concentrations. *Can. J. Microbiol.* 29: 1280-1285.
- Manjarrez, M. J., A. Alarcón y R. Ferrera-Cerrato. 2000. Biotecnología de la producción de inóculo micorrízico arbuscular y su control de calidad. pp 239-251. En: *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular*. Eds.: Alarcón A. y R. Ferrera - Cerrato. IRENAT. Colegio de Postgraduados. Montecillo. Mundi Prensa. México.
- Phillips, J.M. y D.S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-162.
- Porter, W.M., A.D. Robson, L.K. Abbott. 1987. Factors controlling the distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil pH. *Journal of Applied Ecology* 24: 663-672.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Germany, 371 pp.
- Smith, S.L, D. Read, 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. 2ª edición. Capítulo 1. Academic Press.
- Trappe, J. M. 1987. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. En: *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. Eds.: Safir, G. R. CRC Press. Boca Raton. p 5 - 25.
- Walker C. 1992. Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales) a possible way forward. *Agronomie* 12: 887-897.
- Wang, G., D.P. Stribley, P.B. Tinker, C. Walker. 1985. Soil pH and vesicular arbuscular mycorrhiza. *Ecological Interactions in Soil*. (Ed. A. H. Fitter) pp. 219-224. Special Publication Number 4 of the British Ecological Society. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Warner, A., B. Mosse y L. Dingemann. 1985. The nutrient film technique for inoculum production. En: Molina, R. (ed) *Proceedings of the 6th NACOM*, 85-86. Oregon State University, Corvallis.
- Comunicación personal.** Dr. Ricardo A. Herrera Peraza †. Instituto de Ecología y Sistemática. 2004