

Selección de hospederos y sustratos para la producción de inóculos micorrizógenos vesículo-arbusculares*

Roberto L. FERRER**, Eduardo FURRAZOLA** y Ricardo A. HERRERA**

ABSTRACT. Two experiments for the selection of host and substrate, respectively, are reported. In Experiment 1 six hosts inoculated with 5 MVA fungi, each one from different genera, were tried. *Brachiaria* yielded near twice as many colonized roots as *Sorghum*, and near tree times as many spores, being the less specific host. In a usefulness scale, *Sorghum*, and mainly the grain cv. assayed followed *Brachiaria* as a good host. Difficulties for using *Brachiaria* as a host and related impeachments are discussed. In Experiment 2 three organic substrates were tested alone or mixed (25 %) with each of two soils which also were tried alone. All these 11 treatments were inoculated with *Glomus aggregatum* or *G. mosseae* for a total of 22 treatments. Interactions fungus-substrate occurred for all propagule measurements, suggesting that it is not optimal the selection of only one organic substrate for the reproduction of all fungi. Treatments mixing soil and organic substrates were better, according to the total propagules calculated. New studies are recommended so as to determine the minimal proportion of soil in the substrate for production of inocula, taking into account the differential preference of each fungus for their production of propagula.

KEY WORDS. Vesicular-arbuscular mycorrhizae, inoculum production, hosts, substrates, MicoFert®.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las micorrizas del tipo endótrofa vesículo-arbuscular (MVA) se ha venido desarrollando en Cuba desde 1973 en el Instituto de Ecología y Sistemática (IES). Estas micorrizas constituyen una simbiosis obligatoria, por lo que no se ha podido hasta el presente cultivar las mismas *in vitro*. Debido a ello, tanto para el mantenimiento de las cepas de los hongos que las producen como para su aplicación, se hace necesario su cultivo en suelo u otro sustrato con una planta hospedera conveniente.

Las limitantes para el uso extensivo de las micorrizas como biofertilizantes se reducen prácticamente a la imposibilidad de obtener grandes cantidades de inóculo en corto tiempo ya que se requiere alrededor de 3-4 meses para que se obtenga un inóculo de buena infectividad. Sin embargo, dado que cualesquiera de las estructuras del hongo que se encuentran en el suelo (esporas, esporocarpos, micelio extramático) o dentro de las raíces (endófito, es decir, las propias raíces colonizadas) pueden servir como propágulos de la micorriza, la obtención de inóculos micorrizógenos se hace factible.

Así, para cultivos que conllevan una fase de vivero o semillero (forestales, cítricos y otros frutales, tabaco, café, y hortalizas de semillero) ya ha sido recomendada la técnica apropiada de aplicación de esta ecotecnología general en trabajos nuestros anteriores (Herrera *et al.*, 1983, 1985) o de otros autores (Sieverding, 1991; Sieverding y Saif, 1984; Gianinazzi-Pearson, *et al.*, 1985). Solamente sería necesario para garantizar el éxito, la determinación previa del hongo más apropiado (a seleccionar entre las cepas disponibles) para las condiciones en que se desarrollará el cultivo en el vivero o semillero y la comprobación de su efectividad en el campo.

La posibilidad de producir un inóculo ligero (sin la masa de suelo acompañante) con el objetivo de poderla distribuir en cultivos extensivos por diferentes vías y de obviar las dificultades de transportación del inóculo producido en suelo fue abordada por nosotros en 1985, con resultados preliminares poco alentadores. Se llegó a montar la instalación necesaria para la recirculación de solución nutritiva y un primer ensayo de prueba, utilizando maíz como planta hospedera, en el que se registró muy poca formación de micorriza.

La producción de un inóculo consistente en raíces colonizadas en cultivo en flujo continuo de solución nutritiva (NFT) fue primero intentada por Mosse y colaboradores en 1980 (Warner *et al.*, 1985). Las ventajas de este método consisten en que se produce, según sus autores, un material mucho más limpio y, por lo tanto, con menos posibilidades de transmitir patógenos al cultivo que recibirá el inóculo, a la vez que la modificación de las soluciones nutritivas podría permitir la formación preferencial de micelio dentro o fuera de la raíz (Mosse y Thompson, 1984).

La producción de raíces micorrizadas en un medio de enraizamiento que protege al micelio externo, las esporas y a las propias raíces, también en cultivo en NFT, es también posible y ha sido patentada (Warner *et al.*, 1985) utilizando como medio de enraizamiento la turba de *Sphagnum* y como planta hospedera la lechuga (*Lactuca sativa* L.) que alcanza altos niveles de colonización. De acuerdo con sus autores este cultivo en NFT con turba de *Sphagnum* proporciona un inóculo con mayores posibilidades de almacenamiento sin pérdida de la viabilidad y baja contaminación, y calcularon que mientras que se requieren 2500 Kg de inóculo pesado para una hectárea de suelo a inocular, sólo son necesarios 198-235 Kg de su inóculo en *Sphagnum*. Esto disminuye a un 10 % el peso, para volúmenes iguales, de acuerdo con Sieverding (1991), pero este mismo autor señaló, al referirse a este método, que durante el proceso de producción pueden surgir serios problemas relacionados con la contaminación del sistema por patógenos de la raíz.

*Manuscrito aprobado en Julio de 1999.

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

En 1993, el IES se decidió comenzar a producir un inóculo micorrizógeno con fines comerciales, cuya marca fue registrada como MicoFert®. Con la finalidad de completar los estudios relativos a la producción de este inóculo se realizaron los experimentos que se reportan en este trabajo, cuyo objetivo radica en la selección de un hospedero adecuado y el aligeramiento del sustrato mediante la incorporación de otros materiales al suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1. Selección de hospederos. El experimento fue diseñado en bloques al azar con 4 réplicas, en macetas de 1,3 kg aproximadamente, con riego por capilaridad que se produjo colocando las macetas sobre medias placas de Petri y con esponja en sus orificios para unir el suelo con el agua, que se sirvió en las placas. La distancia entre las macetas fue ajustada al máximo posible, dado el espacio disponible, para evitar la contaminación.

Se utilizó un suelo Ferralítico Cuarcítico Amarillento Lixiviado mezclado con arena sílice (5:2) cuyo contenido de P asimilable (Bray II) fue de 9 ppm antes de mezclarse con la arena y de 3 ppm después de mezclado; pH de 5,7. La mezcla había sido fumigada con bromuro de metilo y almacenada por algún tiempo por lo que antes del montaje se re-esterilizó al vapor fluente durante 1 hora, dos días consecutivos.

Se aplicó una fertilización inicial con 30, 15 y 30 mg/kg de N, P y K, respectivamente, añadiéndose el fósforo como fosfato de potasio al tercer día después del montaje del experimento. Posteriormente se aplicó quincenalmente solución nutritiva de macroelementos sin fósforo (Hayman, 1974).

Se utilizaron plántulas pregerminadas (una por maceta) debido a las diferencias en tiempo de germinación de los hospederos ensayados. Estos fueron: *Lactuca sativa* cv. E.S.Simpson, *Crotalaria retusa*, *Brachiaria decumbens* cv. Basilik, *Paspalum notatum*, y dos variedades de *Sorghum bicolor*, cv. forrajera y cv. V6, de grano.

Los hongos micorrizógenos inoculados fueron: *Glomus manihotis*, *Acaulospora morrowae*, *Scutellospora pellucida*, *Gigaspora margarita* y *Entrophospora colombiana*, provenientes de cultivos puros reproducidos en nuestro laboratorio a partir de cultivos del Dr. Ewald Sieverding (CIAT, Colombia).

La inoculación se realizó manteniendo en suspensión mediante un agitador de hélice suficiente material después de tamizado y centrifugado para tomar con pipetas las cantidades necesarias para inocular 50-60 esporas en cada caso. Debido a la exactitud comprobada de esta forma de inoculación, la misma fue también utilizada para los conteos de esporas en la evaluación de la experiencia, tomando para cada conteo 5 ml de suspensión de esporas, a partir de un volumen conocido (3 réplicas en cada conteo). Se suspendieron 50 g de cada cultivo en agua durante 1 hora y se filtraron por papel de filtro Watman No. 1, lo que también fue inoculado a razón de 2 ml/maceta, incluyendo los controles.

En la cosecha del experimento se cortaron las partes aéreas para masa seca y se extrajo el suelo de las macetas invirtiéndolas sobre un papel, para cortar una mitad para masa seca, longitud de raicillas y porcentaje de colonización (Giovanetti y Mosse, 1980), una vez teñidas las raicillas (Phyllips y Hayman, 1970) y una cuarta parte para los conteos de esporas, realizados como se señaló anteriormente.

A partir de estas mediciones se calcularon otras características convenientes para determinar la calidad de un inóculo: longitud de raíz producida total y colonizada por cada planta, y cantidad de esporas producidas. Todas estas variables fueron calculadas para un dm³ de inóculo.

El experimento se mantuvo durante 12 semanas en casa de vegetación tipo túnel con techo de polietileno entre dos capas de malla plástica de 1-2 mm de poro. Los datos fueron procesados por análisis de varianza y las medias comparadas por el test de rangos múltiples de Duncan, de acuerdo con el paquete estadístico "Basica" (Sigarroa, 1987).

Experimento 2.- Selección de sustratos. Para este experimento se utilizó un diseño de bloques al azar con 4 réplicas, en macetas de 0,5 kg, con riego normal, pero tomando las precauciones necesarias para evitar la contaminación cruzada entre las macetas.

Los sustratos (tratamientos) ensayados fueron:

- 1) (CA) Cachaza en descomposición por más de 1 año.
- 2) (TS) Turba de Sphagnum (Premier Brand, Canada).
- 3) (TC) Turba cubana (comercializada por el Ministerio de la Agricultura).
- 4) (ST) Suelo Ferralítico Amarillo, mezclado con arena sílice lavada (3:1, v/v).
- 5) (SC) Suelo Ferralítico Rojo Compactado, mezclado de igual manera con arena sílice lavada (3:1, v/v).
- 6, 7 y 8) (CA-ST, TS-ST y TC-ST) 25% de 1, 2, 3, respectivamente, y 75% del suelo Amarillo.
- 9, 10, 11) (CA-SC, TS-SC y TC-SC) 25% de 1, 2, 3, respectivamente, y 75% del suelo Rojo.

Los contenidos de nutrientes de los materiales orgánicos utilizados pueden verse en la Tabla 1 y del resto de los tratamientos en la Tabla 2.

Se inocularon dos cepas cubanas de hongos micorrizógenos: *Glomus aggregatum* y *Glomus mosseae*, provenientes del Cepario Cubano de Micorrizas Arbusculares (CCUMA), radicado en el IES, para un total de 22 tratamientos.

Se utilizó *B. decumbens* como planta hospedera, raleada para dejar una por maceta después de germinadas y establecidas. Todas las macetas fueron mantenidas en condiciones de casa de vegetación, y regadas hasta capacidad de campo en días alternos, durante 16 semanas.

Se determinó la masa seca de las plantas y se mezclaron bien el sustrato y las raicillas de cada maceta, cortadas en segmentos de aproximadamente 1 cm para determinar, a partir de alícuotas representativas, la colonización micorrízica (%), el total de raicillas producido (cm), el total de raicillas colonizadas (cm), el número de esporas producidas y la cantidad (cm) de micelio extramático adherido a las raicillas (MEVA-III), siguiendo el procedimiento de Herrera *et al.*, (en prensa). Tomando en consideración el hecho de que en un inóculo las raicillas son normalmente fragmentadas en segmentos de aproximadamente 1 cm, se determinó el total de propágulos como la suma de los centímetros de raicillas colonizadas y de MEVA-III, además de la cantidad de esporas producidas, calculados todos para 1 dm³ del inóculo obtenido al final del experimento. La tinción de las raicillas fue realizada por la técnica de Phillips y Hayman (1970) y los conteos de raicillas totales y colonizadas, así como el MEVA-III presente en las muestras fueron realizados por la técnica de Giovannetti y Mosse (1980).

Paralelamente, se determinaron para todos los sustratos ensayados las densidades aparentes aproximadas tomando un volumen en una probeta tarada y pesando luego de comprimir el sustrato con golpecitos verticales sucesivos. Igualmente, se determinaron las capacidades de retención de agua siguiendo la técnica descrita por Anderson e Ingram (1989).

Todos los datos fueron procesados por análisis de varianza factorial y test de rangos múltiples de Duncan, mediante el programa estadístico "Basica" (Sigarroa, 1987).

En ambos experimentos, cuando el análisis de varianza para diseño factorial no arrojó significación para las interacciones, los datos fueron reanalizados por análisis de varianza de clasificación doble para bloques al azar. La normalidad de los datos fue previamente comprobada y ajustada mediante el test de Kolmogorov-Smirlov, del propio programa.

RESULTADOS Y DISCUSION

Experimento 1. Los resultados de biomasa aérea seca (Tabla 3) presentaron interacciones entre las especies de hospederos y de hongos MVA que, analizadas de conjunto, tienden a producir valores significativamente mayores con todos los hongos en las dos variedades de sorgo ensayadas, seguidas por *Brachiaria* con valores de comportamiento similar a los de la variedad forrajera de sorgo, y *Paspalum* con valores inferiores a los de *Brachiaria* para todos los hongos MVA ensayados. La lechuga y la *Crotalaria* tuvieron comportamientos estadísticamente similares entre sí, a la vez que los más bajos valores de biomasa aérea seca de todo el experimento. En general, estos dos hospederos dieron los valores más bajos para todos los hongos MVA.

Los valores de dependencia micorrízica (Tabla 4) calculados según Pérez-Maqueo (1995), a partir de los promedios de biomasa aérea seca, señalaron a la lechuga y la *Crotalaria* como más dependientes de los hongos MVA que las gramíneas ensayadas, y de éstas, *Brachiaria* resultó la menos dependiente o la más parasitada por sus valores negativos más altos.

La lechuga mostró una mayor afinidad (mayor valor de dependencia micorrízica) por *G. manihotis* y *G. margarita* que por *A. morrowae* y *E. colombiana*; *Crotalaria* fue más afin, o lo que es lo mismo, respondió de manera más diferencial a *A. morrowae* seguido por *G. manihotis* y *G. margarita*, mientras que dio valores negativos para *E. colombiana*. *Paspalum* respondió mejor a *G. margarita* que a *A. morrowae* y resultó parasitado (valores negativos) por *E. colombiana* y *G. manihotis* al tiempo del desmonte del experimento.

El estado de parasitismo benigno (Crush, 1975), en que la simbiosis se desplaza hacia el mayor crecimiento del hongo a expensas del crecimiento de la planta hospedera, se produce normalmente en la plántula al establecimiento de la simbiosis, o después, si ocurren desbalances nutricionales que pueden llevar la simbiosis hacia este estado (Herrera *et al.*, 1984; Herrera y Ferrer, 1984), provocando mayores crecimientos del endófito -dentro de la raíz-, o del micelio extramático -fuera-, o ambos. Este estado, cuyo carácter benigno se debe a su eliminación después de establecida la simbiosis en condiciones naturales o a su reversibilidad al eliminar los desbalances nutricionales, podría ser manejado en la producción de inóculos micorrizógenos, y monitoreado mediante el cálculo de la dependencia micorrízica. En nuestros resultados se aprecia cómo la *Brachiaria*, con los valores más negativos de dependencia micorrízica, produjo los mayores valores de propágulos totales (ver más adelante).

Así, o bien mantener condiciones de crecimiento favorables a la alta producción de biomasa radical que a la vez contenga un buen nivel de colonización, y cambiar estas condiciones después para inducir el parasitismo benigno; o bien cultivar el hospedero desde el principio en condiciones que favorezcan el parasitismo benigno, de manera que aumente el nivel de colonización en las raíces, aún a expensas de la planta hospedera, podría ser una buena estrategia para la producción de inóculo micorrizógeno de alta infectividad. Herrera *et al.* (1984) plantearon la posibilidad de la obtención de la micorriza parásita benigna como conveniente para el establecimiento de posturas de forestales mediante su conversión a simbiótica por el cambio de las proporciones de macroelementos en el suelo. Numerosas interrogantes se abren ante esta posibilidad, las que deberán ser aclaradas mediante experimentación antes de que esto pueda instrumentarse como una técnica.

La longitud total de raicillas producidas por dm³ (Tabla 5) no presentó interacción planta-hongo en el análisis factorial; Tampoco hubo diferencias significativas entre las cantidades de raicillas totales producidas por los diferentes hospederos con cada uno de los hongos MVA ensayados. Sin embargo, sí se mostró la diferencia en las cantidades de raicillas producidas por cada hospedero, en presencia de los diferentes hongos. Así, todos los hospederos, en general, produjeron significativamente más raicillas si estaban colonizados por *G. margarita* que por *E. colombiana*, mientras que las cantidades producidas con *G. manihotis* o *A. morrowae* no difirieron del control.

Es de destacar que las gramíneas ensayadas como hospederos e inoculadas con *S. pellucida*, aunque no formaron micorriza en absoluto, se vieron estimuladas de alguna manera pues las cantidades de raicillas producidas superan significativamente a sus correspondientes testigos no inoculados. Esta estimulación no fue significativa para lechuga y *Crotalaria* y tampoco se observó para la variable biomasa aérea (Tabla 3). La misma ha sido observada antes, provocada por otros componentes biofertilizadores y bioestimuladores presentes en la flora no MVA acompañante del MicoFert®, que en nuestro caso fueron añadidos en el filtrado de microorganismos de los inóculos.

Todas las plantas inoculadas produjeron micorriza a excepción de las inoculadas con *S. pellucida* que no dio colonización en ningún caso (Tabla 6). Ello indicó que las esporas utilizadas como inóculo de esta especie, provenientes de un cultivo puro en crecimiento, o eran inmaduras, o estaban en dormancia (Tommerup, 1983). Ninguno de los controles o plantas testigo presentaron colonización.

La longitud de raicillas colonizadas por los hongos MVA inoculados (Tabla 6) presentó interacción hospedero-hongo MVA de forma tal que las mayores longitudes de raicillas colonizadas se presentaron en las dos variedades de sorgo y la *Brachiaria* inoculadas con *G. manihotis* y en la *Brachiaria* inoculada con *E. colombiana*. Las combinaciones de lechuga, *Crotalaria* y *Paspalum* inoculadas con *G. manihotis*, así como *Crotalaria* y sorgo forrajero con *A. morrowae* y *Brachiaria* con *G. margarita*, aunque no difirieron significativamente de los valores mayores, fueron algo más bajos. Por su parte, las combinaciones de lechuga o *Crotalaria* con casi todos los hongos -excepto *G. manihotis* en ambos casos y *A. morrowae* con *Crotalaria*- estuvieron entre los valores más bajos de colonización micorrízica, junto al *Paspalum* y el sorgo forrajero inoculados con *G. margarita* y *E. colombiana*, que no difirieron de los controles. El resto de las combinaciones tuvo valores, en general, intermedios.

Por su parte, los diferentes hongos prefirieron distintos hospederos para dar sus máximas longitudes de raicillas colonizadas. *G. manihotis*, sin embargo, fue estadísticamente indiferente al hospedero, aunque los mayores valores se presentaron para *Brachiaria* y las dos variedades de sorgo. *A. morrowae* prefirió a la *Crotalaria* y al sorgo forrajero. *G. margarita* prefirió francamente a la *Brachiaria*, así como también lo hizo *E. colombiana* para su producción de raicillas colonizadas.

El comportamiento individual de cada hospedero con la media de los cuatro hongos que colonizaron en el experimento se observa en la Fig. 1, donde se destaca la *Brachiaria* tanto en raicillas colonizadas como en esporas producidas, seguida por el sorgo de grano que superó a la variedad forrajera.

Las raicillas producidas que no están colonizadas no actúan como propágulos en un inóculo. Solamente son útiles como tales, las raicillas colonizadas, las esporas y el micelio extramático (no analizado en este experimento) producidos.

Las esporas representan probablemente el componente más importante de los inóculos y su producción por dm³ en esta experiencia (Tabla 7) estuvo afectada por la duración del experimento excepto en *G. manihotis*, del cual es conocida su rápida colonización y desarrollo. *A. morrowae* y *E. colombiana* no presentaron diferencias estadísticas con respecto a los hospederos. *S. pellucida*, que no produjo colonización, tampoco pudo producir esporas y *G. margarita* tuvo una producción de esporas tan errática que no permitió un análisis estadístico.

Para *G. manihotis*, que sí presentó un desarrollo normal o más temprano en su producción de esporas, el hospedero *Brachiaria* en primer lugar y *Paspalum* en segundo -sin diferencias estadísticas entre sí- produjeron las mayores cantidades de esporas, mientras que lechuga, *Paspalum* y las dos variedades de sorgo presentaron valores intermedios, no diferentes entre sí. *Crotalaria* fue el hospedero que menos esporas de *G. manihotis* produjo (Tabla 7), pero produjo 3,8 veces más esporas de *A. morrowae* que de *G. manihotis*.

La utilización de *B. decumbens* como hospedero parece promisoría. Su porte rastrero puede crear una barrera que protege al cultivo de posibles contaminaciones, pero la obtención de semillas certificadas se dificulta en el país y la posibilidad de que sus semillas caigan al inóculo y vayan luego como mala hierba deberá preverse. Sin embargo, ella produjo las mayores longitudes de raicillas colonizadas -casi el doble que las de sorgo- y la mayor cantidad de esporas (1.56 a 3.87 veces la de sorgo) de todos los hospederos ensayados, a la vez que resultó el hospedero más parasitado y menos específico.

Los sorgos, y mayormente la variedad de grano ensayada, resultaron también un buen hospedero y han sido ampliamente utilizados como tal (Sieverding, 1991; Morton, 1998) aunque su producción lineal de raicillas colonizadas fue menor.

Experimento 2. La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos para ambos hongos en los diferentes sustratos. La variable masa seca del follaje fue la única que no presentó interacción hongo-sustrato, por lo que los análisis se repitieron en este caso como análisis de varianza de clasificación doble, en bloques al azar, para cada hongo por separado.

Tanto para la cepa IES-4, como para la IES-8, la turba de *Sphagnum* (tratamiento TS), de los tres componentes orgánicos ensayados solos, produjo un crecimiento en las plantas significativamente menor que los otros dos ensayados (cachaza, CA y turba cubana, TC). Entre los tratamientos de suelo solo (fersialítico, ST y ferralítico, SC), el suelo más fértil (SC), como era de esperar, produjo crecimientos estadísticamente mayores. Los resultados, para las mezclas con ambos suelos en los dos hongos ensayados resultaron favorecidos en cuanto a la biomasa aérea producida, más cuando se mezclaron con CA y TC que con TS.

El hongo IES-4 en combinación con el sustrato TS produjo los mayores valores tanto para raicillas (totales) producidas como para raicillas colonizadas, pero en el caso de las raicillas colonizadas este valor no fue estadísticamente diferente ni del suelo más fértil (SC) ni del suelo fersialítico (ST) en mezcla con cualquiera de los tres componentes orgánicos ensayados. En cambio, en el caso del hongo IES-8 las raicillas colonizadas del tratamiento TS no difirieron estadísticamente de ninguno de los otros componentes orgánicos ensayados solos, aún cuando el sustrato TC dio un valor promedio casi cuatro veces mayor. Por otra parte, estadísticamente hubo mayor cantidad de raicillas colonizadas en las mezclas efectuadas con el suelo amarillo (ST), menos fértil, pero más aereado, que con el suelo rojo (SC).

Los valores obtenidos en raicillas totales y en menor grado en raicillas colonizadas, tanto para los suelos solos, como para estos mezclados con los componentes orgánicos ensayados fueron muy similares entre los dos suelos y entre los dos hongos, no existiendo en general diferencias estadísticas entre ellos.

Los mayores valores obtenidos para el sustrato TS en cuanto a raicillas producidas y colonizadas debieron estar influidos por los mayores contenidos de agua y menores nutrientes en general en este sustrato (Fig. 2b, Tabla 1) que evidentemente favoreció el crecimiento de las raíces de la gramínea hospedera utilizada, aunque no así el de su biomasa aérea.

Los componentes fúngicos del inóculo producido, formados fuera de la raíz - el MEVA y las esporas - sí resultaron definitivamente afectados por el tratamiento TS - de mayor humedad - y en menor grado por los otros dos compuestos orgánicos ensayados solos.

Para el MEVA-III, el mayor valor se registró para el tratamiento TC con la cepa IES-8, no estadísticamente diferente del obtenido para el suelo amarillo solo (ST). En general, los compuestos orgánicos solos ensayados fueron perjudiciales para ambos hongos, comparados con el resto de los tratamientos. No obstante, de entre ellos resultó mejor el tratamiento CA para el hongo IES-4 y el TC para el IES-8.

En cuanto a los suelos solos, la cepa IES-4 no mostró diferencias en sus preferencias, pero la cepa IES-8 francamente prefirió al suelo ST, mucho mejor aereado por ser más arenoso. Todos los tratamientos de mezclas dieron valores de MEVA-III estadísticamente similares entre sí y, en general, superiores a los compuestos orgánicos solos, aunque en algunos casos no difirieron.

En cuanto a las esporas, su producción se vio aparentemente beneficiada por los tratamientos de suelo solo o suelo en mezcla con los compuestos orgánicos, dando los valores estadísticamente menores para los compuestos orgánicos ensayados solos.

Tal como se mostró para el MEVA, la producción de esporas también se perjudicó en los tratamientos de compuestos orgánicos solos de manera significativa.

Siendo las esporas el componente más importante en un inóculo comercial debido a que garantizan su durabilidad y permiten establecer los niveles de dilución del inóculo, de acuerdo con nuestros resultados parece inconveniente la utilización de sustratos basados en compuestos orgánicos solos, con la finalidad de disminuir su peso.

Esto, además, puede ser apoyado por el resultado obtenido para el total de propágulos calculado en este experimento, como se observa en la Tabla 9. Los mismos datos se han graficado en la Fig. 3 para facilitar las comparaciones.

CONCLUSIONES

- ◆ La utilización de *Brachiaria decumbens* es una buena alternativa para la producción de inóculos micorrizógenos, si se tiene en cuenta un correcto manejo.
- ◆ La variedad ensayada de sorgo de grano (V6) produce más del doble de esporas que la forrajera y similares longitudes de raicillas colonizadas. Las facilidades de obtención de semilla certificada la convierten en una buena opción, aunque con ella puede producirse un inóculo menos infectivo que con la *Brachiaria*.
- ◆ *Paspalum notatum* produce tantas esporas como *B. decumbens*, aunque menos de la mitad de las raicillas colonizadas que ella. Esto permite utilizarlo como hospedero en ceparios con fines taxonómicos.
- ◆ De los sustratos orgánicos ensayados solos, la turba de *Sphagnum* es la menos adecuada, además de estar limitada por su imperativa necesidad de importación.
- ◆ Los sustratos que contienen una fracción de suelo resultan mejores que los compuestos sólo por materiales orgánicos.
- ◆ Uno de los hongos MVA ensayados en el experimento de sustratos prefirió la turba cubana -de alto contenido en calcio-, mientras que el otro prefirió la cachaza. Esto claramente sugiere que no es posible seleccionar un sustrato orgánico único para la reproducción de todos los hongos micorrizógenos.

RECOMENDACIONES

- ◆ Se recomienda la utilización de la *Brachiaria decumbens* como hospedero para la obtención de inóculos del mayor potencial infectivo.
- ◆ La posibilidad de manejar el parasitismo en la producción de inóculos debe ser estudiada.
- ◆ Se recomienda la inclusión de una parte de suelo en los sustratos, así como estudiar las proporciones adecuadas que permitan producir, simultáneamente, el mayor potencial de inóculo y el máximo aligeramiento del sustrato.

- ◆ Deberán investigarse, en un futuro, las preferencias de las diferentes cepas de hongos micorrizógenos VA por cada uno de los sustratos orgánicos que puedan ser empleados, de acuerdo con sus necesidades nutrimentales particulares y los costos fotosintéticos que representan los diferentes hongos para la planta hospedera.
- ◆ La forma en que se calcularon los propágulos totales no había sido usada antes. Se recomienda la realización de un estudio que permita relacionarla con el método de Porter (1979) para enumerar propágulos infectivos, de manera que se pueda obtener resultados de este tipo en mucho menos tiempo.

Agradecimientos. Los autores agradecen a las técnicas Esther Collazo y Maritza Portier por el esmerado cuidado de los experimentos y el trabajo de laboratorio; a la Dra. María E. Rodríguez y al MSc. Jorge Sánchez por la esmerada revisión del manuscrito. La turba de *Sphagnum* utilizada en el experimento 2 fue comprada con un donativo de la Fundación Internacional para la Ciencia (IFS) a uno de los autores (Grant No. 251).

REFERENCIAS

- Anderson, J. M. y J. S. I. Ingram. 1989. Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods. IUBS-ISSS-UNESCO MAB. C.A.B. International, U.K. pp.50.
- Crush, J. R. 1975. Occurrence of endomycorrhizas in soils of the Mackenzie Basin, Canterbury. *New Zealand J. Agr. Res.* 18:361-364.
- Gianinazzi-Pearson, V., S. Gianinazzi, y A. Trouvelot. 1985. Evaluation of the infectivity and effectiveness of indigenous vesicular-arbuscular fungal populations in some agricultural soils in Burgundy. *Can. J. Bot.* 63:1521-1524.
- Giovannetti, M. y B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Hayman, D. S. 1974. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VI. Effect of light and temperature. *New Phytol.* 73: 71-80.
- Herrera, R. A., R. L. Ferrer, T. Cabrera, S. Herrera, M. O. Orozco, A. Ferrer, y N. Bouza. 1983. Propuesta para el uso de las micorrizas en varios cultivos de Cuba. Memorias del VI Foro Científico Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba.
- Herrera, R. A. y R. L. Ferrer. 1984. Glosario de términos en español relativos al estudio de las micorrizas vesículo-arbusculares. *Acta Botánica Cubana* 20:176-180.
- Herrera, R. A., R. L. Ferrer, M. O. Orozco, Z. Prikryl, G. Hernández, y V. Vancura. 1984. Fertilización y micorrizas VA. I. Efectos del nitrógeno, el fósforo y el potasio sobre el crecimiento y las micorrizas de la majagua (*Hibiscus elatus* Sw.). *Acta Botánica Cubana* 20:93-110.
- Herrera, R. A., R. L. Ferrer, M. O. Orozco, E. Furrázola, S. Herrera, y T. Cabrera. 1985. Estudio de Biofertilizantes en Varios Ecosistemas. Informe Final del Tema 3050561628185. Archivos IBACC.
- Herrera, R. A., E. Furrázola, A. R. Valdés, Y. Torres, R. L. Ferrer, y F. Fernández. (en imprenta). Estrategias de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. En: *Biodiversidad en Iberoamérica: Ecosistemas, Evolución y Procesos Sociales* (Ed. Maximina Monasterio), Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Subprograma XII, Diversidad Biológica, Mérida.
- Morton, J. B 1998. The International Culture Collection of VA Mycorrhizal Fungi. <http://invam.caf.wvu.edu>.
- Mosse, B. y J. P. Thompson. 1984. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. I-Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture. *Can. J. Bot.* 62(7):1523-1530.
- Pérez-Maqueo, O. M. 1995. Análisis del efecto de los disturbios en la dinámica de la playa del Morro de la Mancha, Veracruz. Tesis de Maestro en Ciencias. UNAM, Fac. de Ciencias, Div. de Estudios de Postgrado, México D.F., 102 p.
- 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. Br. Mycol. Soc.*, 55:158-161.
- Porter, W. M. 1979. The "Most Probable Number" Method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Aust. J. Soil Res.* 17: 515-519.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Germany, 371 p.
- Sieverding, E. y S. R. Saif. 1984. VA Mycorrhiza Management -A New, Low Cost, Biological Technology for Crop and Pasture Production on Infertile Soils?. Discussion Paper. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Colombia, 19 p.
- Sigarroa, A. 1987. Manual de Prácticas de Biometría y Diseño Experimental. Editorial Pueblo y Educación. 154 p.
- Tommerup, I. C. 1983. Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 81: 37-45.
- Warner, A., B. Mosse, y L. Dingemann. 1985. The nutrient film technique for inoculum production. In: Molina, R. (ed.) *Proceedings of the 6th. NACOM*, 85-86. Oregon State University, Corvallis.

Tabla 1. Contenidos de nutrientes en los materiales orgánicos utilizados en el experimento de sustratos. Las muestras fueron consideradas como foliares para los análisis*.

Tratamiento	% N	% P	% K	% Ca	% Mg	% Cl	% M.O.
Cachaza (CA)	3.31	0.18	0.37	5.92	1.43	0.16	61.84
Turba de Sphagnum (TS)	2.17	0.17	0.12	2.98	0.14	0.16	90.06
Turba cubana (TC)	1.77	0.16	0.12	9.86	1.26	0.05	38.69

* Análisis realizados por el Laboratorio Provincial de Suelos y Fertilizantes del Ministerio de Agricultura.

Tabla 2. Contenidos de nutrientes en las mezclas utilizadas en el experimento de sustratos. Las muestras fueron consideradas como suelos para los análisis*.

Tratamiento	pH	mg/100g		meq/100 g					%
	(KCl)	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	Na	K	VT	M.O.
Suelo Fersialítico + arena sílice (3:1) (ST)	6.1	1.50	12.0	14.12	2.81	0.05	0.12	17.95	2.96
Suelo Ferralítico + arena sílice (3:1) (SC)	7.3	8.50	30.5	17.55	2.44	0.10	0.50	17.75	2.75
ST + CA (25%)	6.5	39.60	40.0	20.75	6.58	0.05	0.35	25.90	5.16
ST + TS (25%)	4.5	1.65	10.5	14.98	2.36	0.05	0.12	22.64	4.70
ST + TC (25%)	6.8	8.50	27.0	23.54	2.16	0.10	0.42	25.09	4.64
SC + CA (25%)	6.9	40.00	60.0	21.40	2.06	0.05	1.00	25.09	5.16
SC + TS (25%)	5.5	10.65	32.0	18.40	1.39	0.10	0.31	25.30	3.84
SC + TC (25%)	7.1	16.35	53.0	31.70	1.39	0.05	0.05	17.54	3.61

* Análisis realizados por el Laboratorio Provincial de Suelos y Fertilizantes del Ministerio de Agricultura.

Tabla 3. Biomasa aérea de seis hospederos inoculados con cinco hongos MVA. Letras comunes en toda la tabla representan valores estadísticamente similares ($P \geq 0,05$). Todos los valores representan la media de cuatro réplicas.

Biomasa Aérea Seca (g)						
	Control	<i>Glomus manihotis</i>	<i>Acaulospora morrowae</i>	<i>Scutellospora pellucida</i>	<i>Gigaspora margarita</i>	<i>Entrophospora colombiana</i>
<i>L. sativa</i>	4.60 i	6.23 hi	5.75 hi	4.44 i	6.27 hi	5.83 hi
<i>C. retusa</i>	4.91 i	6.02 hi	6.26 hi	4.69 i	5.88 hi	4.57 i
<i>B. decumbens</i>	21.77 ab	17.85 bcd	18.41 abcd	18.02 bcd	16.27 cd	17.02 bcd
<i>P. notatum</i>	10.73 efg	10.67 efg	11.52 ef	7.96 gh	13.90 de	9.69 fg
Sorgo forraje	20.96 abc	19.20 abc	18.92 abc	19.89 abc	19.52 abc	20.03 abc
Sorgo V6	24.09 a	24.23 a	18.75 abcd	21.97 ab	22.31 ab	24.48 a

Tabla 4. Dependencia micorrízica (según Pérez-Maqueo, 1995) de seis hospederos inoculados con cuatro hongos MVA en el experimento 1.

Dependencia Micorrízica				
	<i>Glomus manihotis</i>	<i>Acaulospora morrowae</i>	<i>Gigaspora margarita</i>	<i>Entrophospora colombiana</i>
<i>L. sativa</i>	26.00	18.34	26.63	19.62
<i>C. retusa</i>	17.73	21.57	15.50	-5.43
<i>B. decumbens</i>	-18.01	-15.43	-25.26	-21.82
<i>P. notatum</i>	-0.43	5.68	22.81	-7.48
Sorgo forraje	-8.40	-9.73	-6.87	-4.44
Sorgo V6	0.57	-21.81	-7.27	1.59

Tabla 5. Longitud de raicillas de seis hospederos inoculados con cinco hongos MVA. Letras comunes en la misma línea representan valores estadísticamente similares ($P \geq 0,05$). Todos los valores representan la media de cuatro réplicas.

Longitud de raicillas (m/dm ³)						
	Control	<i>Glomus manihotis</i>	<i>Acaulospora morrowae</i>	<i>Scutellospora pellucida</i>	<i>Gigaspora margarita</i>	<i>Entrophospora colombiana</i>
<i>L. sativa</i>	444.12 C	400.58 C	1378.51 BC	1680.44 BC	5385.26 A	3235.26 B
<i>C. retusa</i>	473.91 C	547.22 C	1002.55 C	961.86 C	4943.84 A	2688.58 B
<i>B. decumbens</i>	502.05 D	600.82 D	1224.38 CD	2121.05 BC	6577.66 A	3095.36 B
<i>P. notatum</i>	347.76 D	487.85 CD	934.40 CD	1664.98 C	9130.02 A	4197.24 B
Sorgo forraje	349.67 C	372.56 C	1125.80 BC	2212.83 B	7160.63 A	2358.97 B
Sorgo V6	567.22 D	397.48 D	1014.07 CD	1606.73 BC	5628.84 A	2289.28 B

Tabla 6. Longitud de raicillas colonizadas de seis hospederos inoculados con cinco hongos MVA (*Scutellospora pellucida* fue excluida del análisis). Letras comunes en toda la tabla representan valores estadísticamente similares ($P \geq 0,05$). Todos los valores representan la media de cuatro réplicas.

Longitud de raicillas colonizadas (m/dm ³)						
	Control	<i>Glomus manihotis</i>	<i>Acaulospora morrowae</i>	<i>Scutellospora pellucida</i>	<i>Gigaspora margarita</i>	<i>Entrophospora colombiana</i>
L. sativa	0.00 h	376.61 abc	13.05 gh	0.00	99.49 def	241.68 bcd
C. retusa	0.00 h	378.27 abc	423.36 ab	0.00	91.37 efg	117.50 def
B.decumbens	0.00 h	582.69 a	205.44 cde	0.00	360.74 abc	513.64 a
P.notatum	0.00 h	439.53 ab	195.51 cde	0.00	23.17 fgh	34.12 fgh
Sorgo forraje	0.00 h	570.91 a	329.49 abc	0.00	33.82 fgh	24.40 fgh
Sorgo V6	0.00 h	585.61 a	118.86 def	0.00	147.83 de	76.71 efg

Tabla 7. Cantidad de esporas producidas por seis hospederos inoculados con cinco hongos MVA (*Scutellospora pellucida* fue excluida de los análisis). Letras comunes, mayúsculas en la misma línea o minúsculas en la misma columna, representan valores estadísticamente similares ($P \geq 0,05$). Todos los valores representan la media de cuatro réplicas.

Esporas (No./dm ³)						
	Control	<i>Glomus manihotis</i>	<i>Acaulospora morrowae</i> *	<i>Scutellospora pellucida</i> **	<i>Gigaspora margarita</i> **	<i>Entrophospora colombiana</i> *
<i>L. sativa</i>	0.0 D	13360.7 A bc	6921.3 B	0.0	1372.0 C	816.7 CD
<i>C. retusa</i>	0.0 C	3546.4 AB c	13646.5 A	0.0	1880.4 BC	2652.1 BC
<i>B.decumbens</i>	0.0 C	41166.1 A a	6841.6 B	0.0	0.0 C	1733.4 BC
<i>P.notatum</i>	0.0 C	35639.3 A ab	12237.8 B	0.0	73.5 C	1139.3 C
Sorgo forraje	0.0 C	10473.8 A bc	1470.0 B	0.0	183.8 C	716.6 BC
Sorgo V6	0.0 C	23226.0 A abc	7172.4 B	0.0	324.6 C	1133.1 BC

*No hubo diferencias significativas.

**No se realizó el análisis.

Tabla 8. Resultados obtenidos en el experimento 2. La nomenclatura de los tratamientos está explicada en el texto, o resumida en las Tablas 1 y 2. Letras diferentes dentro de toda la columna, excepto para la biomasa aérea seca, en que las diferencias deben analizarse para cada cepa por separado (a-e para IES-4 y m-p para IES-8), representan diferencias significativas ($P \geq 0,05$). Todas las cifras representan medias de cuatro plantas. TRAT.-Tratamientos.

TRAT.	Biomasa Aérea Seca (g)	Raicillas Producidas (cm/dm ³)	Raicillas Colonizadas (cm/dm ³)	MEVA-III (cm/dm ³)	Esporas Producidas (No./dm ³)
CEPA IES-4					
CA	11,72 a	1651 de	956 f	75.3 efg	6185 ghi
TS	4,05 e	13086 a	5533 a	2.6 j	157 i
TC	10,58 ab	1492 e	933 f	50.6 ghi	7835 fghi
ST	5,18 de	2762 bcde	2121 bcdef	83.8 defgh	14097 defg
SC	8,90 bc	3918 bcde	3079 abcde	87.3 efg	91249 a
CA-ST	10,63 ab	6640 b	5070 ab	133.0 cdef	9781 efg
TS-ST	6,57 cd	4360 bcde	2684 abcdef	291.3 bc	6530 fghi
TC-ST	8,38 bc	4142 bcde	2826 abcdef	178.5 cde	14250 defg
CA-SC	10,89 ab	2977 bcde	2211 bcdef	73.0 defgh	32433 bcde
TS-SC	7,44 cd	2617 bcde	1832 cdef	131.6 cdefg	31987 bcde
TC-SC	8,57 bc	1992 cde	1537 def	138.0 cdefg	104400 a
CEPA IES-8					
CA	11,13 m	1390 e	940 ef	44,5 hi	1193 hi
TS	4,44 p	5878 b	1384 def	21,3 i	1683 hi
TC	10,79 m	6591 bc	4111 abcdef	944,1 a	20049 defg
ST	3,77 p	6196 bcde	4270 abc	535,1 ab	55625 b
SC	7,72 no	3133 bcde	1639 def	57,8 fgh	54634 b
CA-ST	8,30 no	3710 bcde	2416 bcdef	167,3 cdef	23967 cdefg
TS-ST	4,95 p	5164 bcd	3369 abcd	104,4 defgh	45120 bc
TC-ST	9,98 mn	3735 bcde	2284 bcdef	237,0 cde	25485 bcdef
CA-SC	10,00 mn	3106 bcde	1683 def	111,7 cdefg	47686 bc
TS-SC	7,45 o	3248 bcde	1638 def	133,6 cdef	36628 bcd
TC-SC	7,73 no	4104 bcde	2051 bcdef	223,9 cd	48303 bc

Tabla 9. Totales de propágulos obtenidos para los tratamientos en el experimento 2. La nomenclatura de los tratamientos está explicada en el texto, o resumida en las Tablas 1 y 2. Letras diferentes en toda la tabla representan diferencias significativas ($P \geq 0,05$). Todas las cifras representan medias de cuatro plantas. TRAT.-Tratamientos.

Total de Propágulos (No./dm ³)		
TRAT.	IES-4	IES-8
CA	7216,8 hijk	2177,2 k
TS	5691,7 ijk	3088,0 jk
TC	8818,4 ghijk	25103,4 efghi
ST	16302,1 efghij	60429,7 bc
SC	94415,5 ab	56330,6 bed
CA-ST	14983,8 efghijk	26549,8 defgh
TS-ST	9505,6 fghijk	48594,0 cd
TC-ST	17254,1 efghij	28005,7 cdefg
CA-SC	34716,7 cde	49480,6 cd
TS-SC	33950,6 cdef	38399,5 cde
TC-SC	106074,4 a	50577,4 cd

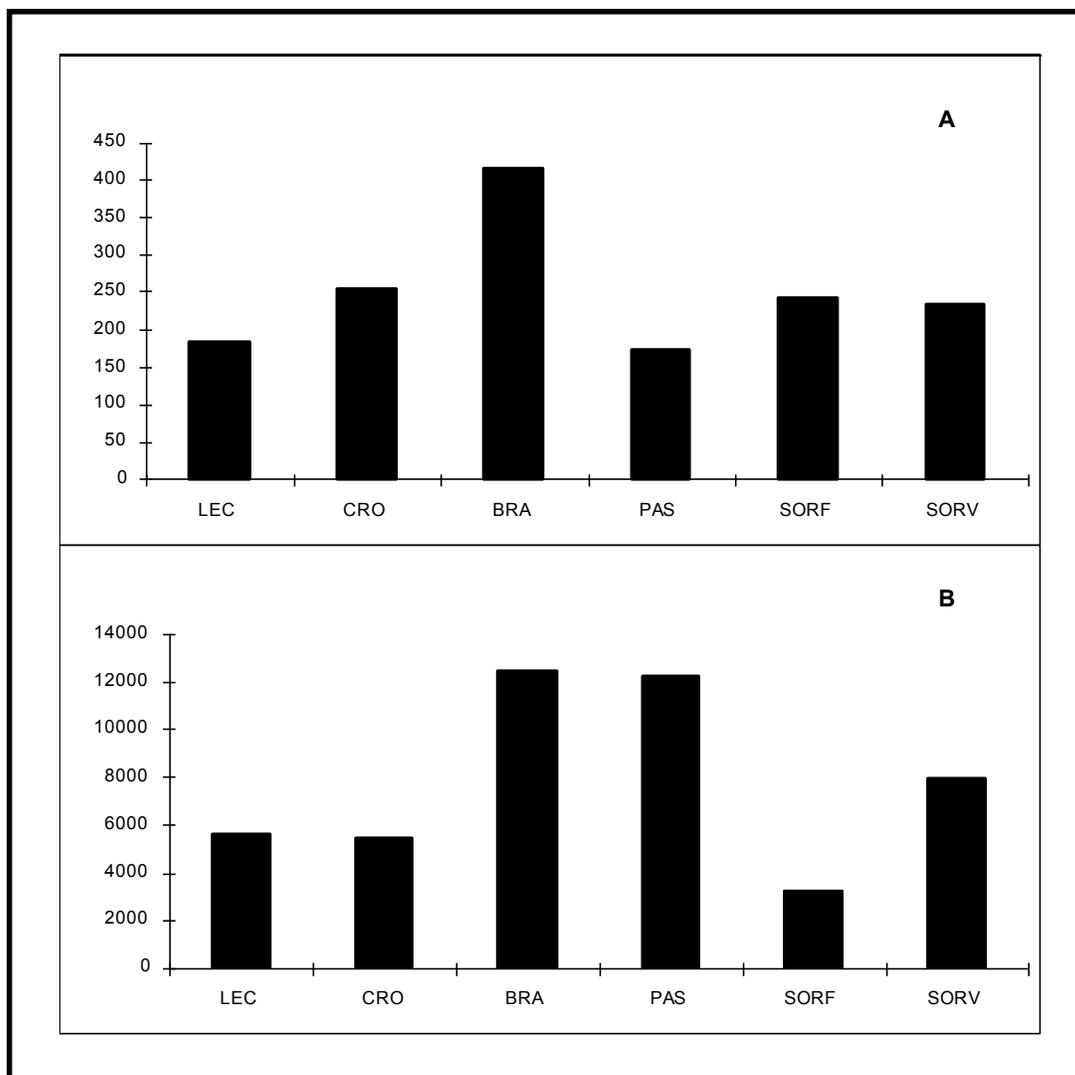


Fig. 1. Promedios de los cuatro hongos que produjeron colonización en el experimento 1, para los seis hospederos. **A)** Longitud de raicillas colonizadas (m/dm³); **B)** No. de esporas por dm³.

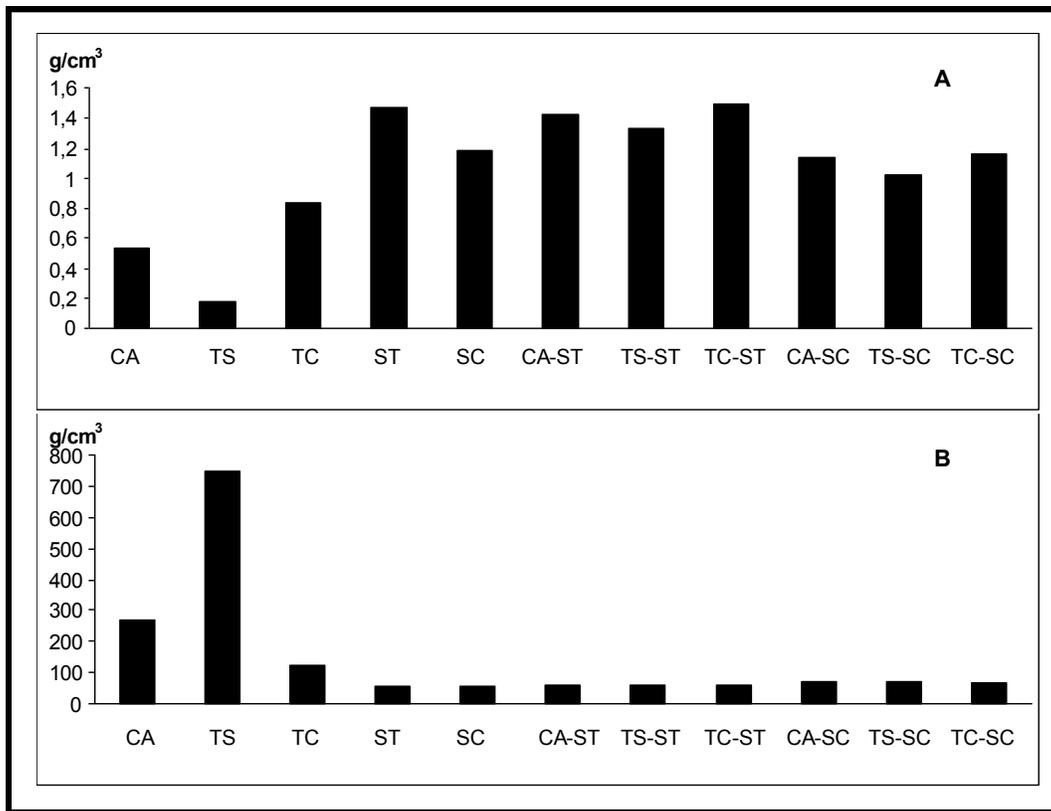


Fig. 2. Características de los sustratos ensayados en el experimento 2: **A)** Densidades de los sustratos; **B)** Capacidades de retención de agua.

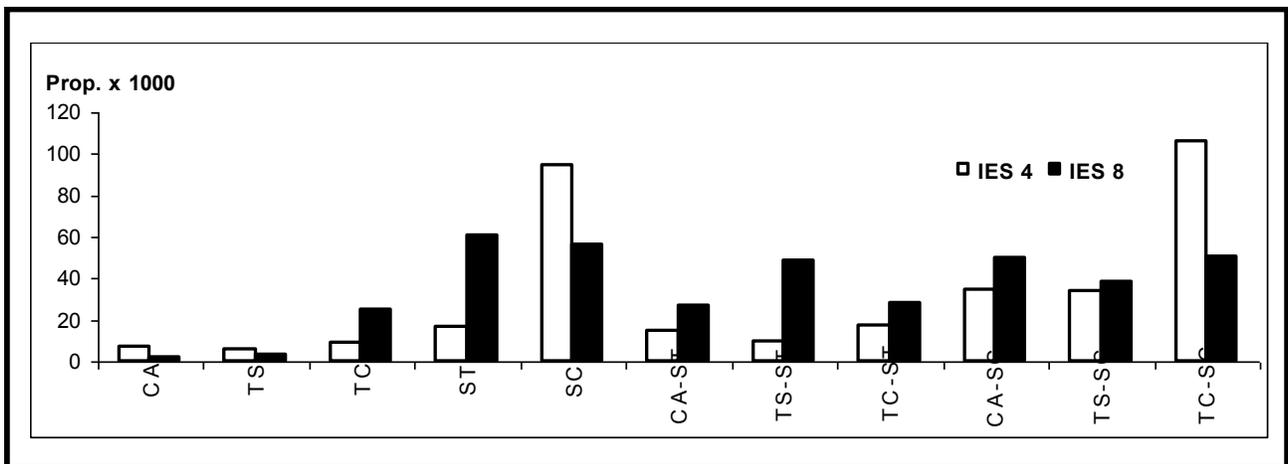


Fig. 3. Total de propágulos por dm³ en los diferentes sustratos ensayados en el experimento 2.