



Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas

**Estudios para optimizar la Calidad en
la producción del inoculante
micorrízico EcoMic[®]**

Tesis presentada en opción al título académico de
Maestro en Ciencias en Nutrición de las Plantas y
Biofertilizantes

Aspirante: Ing. Bannie Vázquez Del Llano

Tutores: Dr. C. Ramón A. Rivera Espinosa
Ms. C. Kalyanne Fernández Suárez

La Habana
2010

Dedicatoria

A mi Hija, mi Mamá, mi Hermano y mi esposo

Agradecimientos

En primera instancia quisiera agradecer al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas por haber contribuido en mi formación como profesional.

A mis tutores el Dr. C. Ramón A. Rivera Espinosa y la Ms. C. Kalyanne Fernández Suárez que constituyeron la guía del trabajo de investigación y realizaron la revisión minuciosa del documento de Tesis, por darme ánimo durante todo el desarrollo de los experimentos y del proceso de defensa.

Quisiera agradecer a mis TIOS Julio Cesar, Raúl y Domingo por ayudarme en la realización de los experimentos y a Juan de Dios por priorizar siempre mi trabajo.

A mis excelentes amigos del Grupo de Micorrizas por brindarme en todo momento apoyo y a nuestro Julio Calvo, por su y compañía en la realización de las muestras.

A Cosito por portarse bien para que Kaly me revisara la tesis.

A Mario Varela por soportarme día a día con un nuevo análisis estadístico.

A los militantes y universo juvenil de mi C/B, por el apoyo en el funcionamiento del mismo.

A Tere por su cafecito para aliviar tensiones en las madrugadas.

A Araselis Mena y Laura Medina por su colaboración en la impresión del documento.

A David Lara por sus consejos oportunos en el plano profesional cuando recién comencé a trabajar en el centro.

A Tomás, Roxana y Caruncho por todos los análisis químicos realizados.

A Pablo y sus muchachos por su colaboración en el llenado de los canteros.

A mis compañeros del departamento de Biofertilizante y Nutrición de las plantas y a otros del INCA que me apoyaron siempre.

A mi Hija Erika por quedarse dormidita muchas noches lejos de su mami. A mi esposo Alberto por siempre brindarme su amor y comprensión.

A mi mamá por su amor y dedicación desde mi primer día de vida, por convertirme en lo que hoy soy. A mi hermano Manolo por su cariño incondicional y su compañía en las madrugadas de

trabajo intenso y a mi cuñi Wendi. No importa el orden, lo que importa es que los quiero mucho a todos.

A mis familia Luisa, Yaimira y Yaidili por cuidarme tantas veces a mi hija para que yo pudiera trabajar en la tesis.

A mis amigas y vecinas Yanelis, Deisy y Nelita por darme tantos momentos de distracción y alegría en los momentos más difíciles.

Todos ellos han sido un importante soporte, dándome ánimo y colaborando en la realización de la presente Tesis.

A TODOS MUCHAS GRACIAS

Resumen

Con el objetivo de perfeccionar el proceso de producción del inoculante micorrízico EcoMic[®] para aumentar la calidad del producto final, se desarrollaron tres experimentos en condiciones de producción. Primeramente se estudió la metodología de muestreo, conjuntamente con la época del año más adecuada para la producción. La planta hospedera utilizada fue *Brachiaria decumbens* inoculada con *Glomus hoi-like* sobre un sustrato arcilloso. Para la toma de muestras se subdividieron los canteros en tres partes iguales y se realizaron muestreos a los 30, 60, 90 y 120 días. Se evaluó Masa seca aérea y de las raíces correspondientes a dos profundidades (0-10 y 10-20 cm) así como Colonización fúngica y Densidad visual. Se determinó además el Número de esporas tomándose dos muestras compuestas por tres y cinco submuestras en ambas profundidades. Para determinar la variabilidad espacial del número de esporas en los canteros se tomó una muestra compuesta por tres submuestras cada 1,5 m, a lo largo del cantero. Este procedimiento se realizó en dos periodos, enero-mayo y junio-octubre. En el segundo experimento se determinó la influencia del periodo de secado y del molinado sobre el contenido de esporas del inoculante. Para determinar el contenido de esporas se realizaron muestreos a los 5 y 15 días de encontrarse el sustrato en esta área. Para el muestreo los cuarterones se subdividieron en diez partes y en cada una se tomó una muestra compuesta por diez submuestras. También se determinó el contenido de esporas después de molinado el producto tomando una muestra compuesta por 10 submuestras de uno cada cinco sacos de 20 Kg. En el tercer experimento se realizó la implementación del proceso de control y análisis de cada uno de los canteros de la Planta de producción. Como plantas hospederas se utilizó *B. decumbens* y *B. mulato*. Se muestreó a los 60, 90 y 120 días. Se tomaron muestras de sustrato en cada parte del cantero compuestas por cinco submuestras. Se extrajeron además cinco plantas completas que presentaran un crecimiento promedio y se determinó el Número de esporas y el porcentaje de Colonización micorrízica. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los valores de Masas secas aéreas y radicales en ambas épocas, obteniéndose mayores índices en el periodo de enero-mayo. La profundidad del muestreo influyó significativamente sobre el contenido de esporas, pero no sobre el porcentaje de Colonización micorrízica. Resultó adecuado, para estimar el Número de esporas, dividir el cantero en tres partes y tomar una muestra compuesta por 5 submuestras en toda la profundidad. La producción de esporas en los canteros presentó una elevada variabilidad y mostró mayores producciones en el periodo de junio a octubre. Se encontraron pérdidas entre 10 y 20% durante el periodo de secado y después del molinado entre 20 y 60 %.

ÍNDICE		Págs.
I. INTRODUCCIÓN		1
II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA		4
2.1	Definición y ubicación taxonómica de los HMA	4
2.2	Establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular	5
2.3	Caracterización morfológica de la cepa <i>Glomus hoi-like</i>	7
2.4	Importancia de los HMA como biofertilizantes para la agricultura	8
2.5	Influencia de algunos factores sobre la micorrización	11
2.5.1	Variables climáticas	12
2.6	Principales características que debe poseer un HMA para ser utilizado como inoculante	13
2.7	Definiciones de biofertilizantes e inoculantes como productos	15
2.8	Requisitos y proceso de producción del inoculante	16
2.8.1	Definición de inoculante certificado y comercial	18
2.8.2	Etapas del proceso de producción del inoculante	18
2.8.2.1	Producción de inóculo certificado	18
2.8.2.2	Producción del inoculante comercial EcoMic®	19
2.9	Características botánicas y exigencias edafoclimáticas y nutricionales de la especie <i>Brachiaria decumbens</i>	21
2.10	Generalidades de métodos de muestreos en el suelo	22
2.11	Generalidades del Control de Calidad	25
2.12	Control de Calidad de inoculantes micorrízicos	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS		28
3.1	Experimento 1. Establecimiento de una metodología de muestreo y de la época del año más adecuada para la producción de EcoMic®	28
3.1.1	Muestreos y evaluaciones realizadas	30
3.1.2	Variabilidad espacial del número de esporas	32
3.1.3	Análisis estadístico	33
3.2	Experimento 2. Influencia del periodo de secado y del molinado sobre el contenido de esporas del inoculante	34
3.2.1	Determinación de la variabilidad del indicador esporas.g ⁻¹ de inoculante en el producto terminado	35
3.2.2	Análisis estadístico	36
3.3	Experimento 3. Implementación del proceso de control y análisis de cada uno de los canteros de la planta de producción de EcoMic®	36
3.3.1	Análisis estadístico	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		40
4.1	Experimento 1. Establecimiento de una metodología de muestreo y del periodo del año más adecuado para la producción de EcoMic®	40
4.1.1	Caracterización del sustrato	40
4.1.2	Producción de Masa seca aérea y radical de <i>B. decumbens</i> inoculada en ambos periodos	40
4.1.3	Comportamiento de las variables micorrízicas durante el ciclo del cultivo	46
4.2	Experimento 2. Influencia del periodo de secado y del molinado sobre el Número de esporas del inoculante	66

	4.2.1	Evaluación del número de sacos a muestrear por canteros	69
	4.3	Experimento 3. Implementación del proceso de control y análisis de cada uno de los canteros de la planta de producción de EcoMic®	70
	4.4	Metodología de muestreo propuesta en las diferentes fases del proceso de producción de EcoMic®	74
V. CONCLUSIONES			75
VI. RECOMENDACIONES			76
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS			77
VIII. ANEXOS			98

I- INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microorganismos simbiotes pertenecientes al *phylum* Glomeromycota (Schüßler y col. 2001) que establecen una asociación mutualista y benéfica con las plantas. Es la simbiosis más extendida sobre el planeta, no sólo por su distribución, sino porque se establece con más del 90% de las plantas terrestres (Remy y col., 1994).

Su distribución está influenciada por aspectos ecológicos relacionados con el clima, la disponibilidad nutrimental y con el tipo de suelo (Rivera y col. 2003). Estos hongos son decisivos para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres, pues influyen tanto en su diversidad como en su productividad (Augé y col. 2001; Burrows y Pfleger, 2002; Jeffries y col. 2003), de ahí su importancia para poder desarrollar una agricultura sostenible, con adición de bajos insumos externos (Muthukumar y Udaiyan, 2002).

Los HMA contribuyen de forma eficiente a la supervivencia y crecimiento de las plantas micorrizadas, al reducir los estreses asociados con la nutrición, las relaciones con el agua, la estructura del suelo, el pH, las sales, los metales tóxicos y los patógenos (Vosatka y col., 1999; Rai, 2001). Por los beneficios que le brindan a la mayoría de los cultivos y porque conservan el medioambiente, son muy importantes al actuar como biofertilizantes y bioprotectores (Azcón-Aguilar y col., 2002).

Los productos biofertilizantes se basan en preparados que contienen organismos viables y se utilizan en la inoculación de semillas o en aplicaciones directas al suelo (Alfonso y Monedero, 2004).

La adopción y uso eficaz de biofertilizantes microbianos (inoculantes) en la agricultura está llamada a ser una de las tecnologías clave para asegurar la sustentabilidad y productividad de este sector tan importante para las economías y las sociedades de los países iberoamericanos (Adholeya y col., 2005).

Los HMA pueden ser aislados, seleccionados, multiplicados e incorporados al suelo o a las plantas en forma de inóculos. El proceso integral de inoculación es complejo, ya que por una parte, implica diseñar métodos de aislamiento, selección, multiplicación e incorporación adecuados para cada especie de HMA o efecto deseado; por otra parte, implica determinar las condiciones y técnicas culturales que permitan una óptima manifestación de los efectos (Barea, 2003). En relación con lo anterior en el país se

dispone de una adecuada información sobre cepas de HMA eficientes, los criterios para su recomendación y su manejo agrícola en una amplia gama de cultivos, los modos de producción agrícola y las condiciones edáficas (Rivera y col., 2007).

Asimismo en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) se ha desarrollado una tecnología de producción de inoculante micorrízico en canteros multiplicadores la cual, si bien ha sido efectiva en la obtención de inóculos, se encuentra aún en fase de perfeccionamiento en varios de sus aspectos (Rivera y col. 2007); éstos abarcan el manejo del sustrato y su selección, teniendo en cuenta el tipo de cepa a reproducir (Mederos, 2009), la optimización del muestreo, la caracterización de las etapas y su manejo sobre la calidad del producto y el seguimiento de los indicadores de calidad en diferentes etapas del proceso.

De forma general, los inoculantes deben presentar una adecuada calidad para garantizar una mayor eficiencia en su funcionamiento, de ahí la importancia de realizar un riguroso control de la misma (Manjarrez y col. 2000). Hace más de 50 años Ishikawa planteó que desde tiempos remotos la historia de la humanidad está directamente ligada con la calidad. El control de la calidad en pocas palabras fue definido como el proceso para desarrollar, diseñar, manufacturar y mantener un producto con calidad (Otero y col., 2002).

En el caso específico de la producción de los inoculantes micorrízicos, las especies de HMA utilizadas, el ciclo biológico del hospedero, la calidad y homogeneidad del sustrato influyen directamente determinando la complejidad del proceso de control de la calidad, aunque existen otros factores que también pueden intervenir en el proceso.

Durante la producción del inoculante en los canteros multiplicadores debe evaluarse el comportamiento micorrízico en cada una de las etapas del proceso y la dinámica del mismo a través de diferentes indicadores como la colonización micorrízica, la densidad visual y la producción de esporas; siendo esta última variable el componente determinante de la calidad del producto final.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

Hipótesis: El perfeccionamiento del proceso de producción del inoculante micorrízico EcoMic[®] contribuye a aumentar la calidad del producto final.

Objetivo general: Incrementar la calidad del inoculante micorrízico EcoMic[®] en el proceso de producción.

Objetivos específicos:

- Establecer un eficiente método de muestreo en la etapa de reproducción del inoculante en canteros.
- Evaluar la influencia de las épocas de establecimiento y crecimiento de *Brachiaria* inoculada sobre la producción de esporas en cantero.
- Evaluar la influencia del tiempo de secado y de molinado sobre el contenido de esporas del inoculante.
- Establecer indicadores para el muestreo en producto terminado.
- Implementar el sistema de muestreo en el seguimiento de diferentes canteros en la fase productiva.

II- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definición y ubicación taxonómica de los HMA

Los HMA se encuentran ampliamente distribuidos desde los trópicos hasta el ártico (Harley y Smith, 1983) y han sido encontrados en Briophytas, Pteridophytas, Angiospermas y Gimnospermas. Son considerados simbioses obligados por lo que no pueden cultivarse en ausencia de las raíces vivas de las plantas, de ahí que dependan totalmente de éstas (Smith y Read, 1997) para completar su ciclo de vida.

Pertenecen al phylum Glomeromycota (Schüßler y col. 2001) y según Herrera y col. (1988); Azcón Aguilar y col. (1991) y Smith y Read, (1997) colonizan más del 95% de las especies vegetales de interés agrícola

A continuación se presenta la más reciente clasificación taxonómica de los HMA (*Glomeromycota* TAXONOMY, 2009).

Phylum Glomeromycota			
Clase Glomeromycetes			
Ordenes -4	Familias -13	Géneros -19	No. Especies -214
<i>Glomerales</i>	<i>Glomeraceae</i>	<u><i>Glomus</i></u>	105
<i>Diversisporales</i>	<i>Gigasporaceae</i>	<u><i>Gigaspora</i></u>	9
	<i>Scutellosporaceae</i>	<u><i>Scutellospora</i></u>	10
	<i>Racocetraceae</i>	<i>Racocetra</i> y <i>Cetraspora</i>	9 y 5
	<i>Dentiscutataceae</i>	<i>Dentiscutata</i> , <i>Fuscutata</i> y <i>Quatunica</i>	7, 4 y 1
	<i>Acaulosporaceae</i>	<u><i>Acaulospora</i></u> y <u><i>Kuklospora</i></u>	34, 2
	<i>Entrophosporaceae</i>	<u><i>Entrophospora</i></u>	2
	<i>Pacisporaceae</i>	<u><i>Pacispora</i></u>	7
	<i>Diversisporaceae</i>	<u><i>Diversispora</i></u> y <u><i>Otospora</i></u>	4 y 1
<i>Paraglomerales</i>	<i>Paraglomeraceae</i>	<u><i>Paraglomus</i></u>	3
<i>Archaeosporales</i>	<i>Geosiphonaceae</i>	<u><i>Geosiphon</i></u>	1
	<i>Ambisporaceae</i>	<u><i>Ambispora</i></u>	8
	<i>Archaeosporaceae</i>	<u><i>Archaeospora</i></u> , <u><i>Intraspora</i></u>	1 y 1

Evidencias fósiles y datos de secuencias de ADN han mostrado la naturaleza ancestral de estos hongos (Phipps y Taylor, 1996 y Remy y col. 1994), los cuales coexisten con las plantas hace alrededor de 460 millones de años (Redecker, 2000). Esta persistencia indica que los mismos han desarrollado estrategias eficientes que les han permitido a sus individuos y poblaciones sobrevivir por tan largo periodo de tiempo (Logi y col., 1998).

Ambos organismos, durante la simbiosis, establecen sucesivos intercambios de sustancias nutritivas, metabolitos esenciales y sustancias hormonales, así como también conducen a la creación de nuevas estructuras, representando un beneficio mutuo para ambos simbioses. Durante este “diálogo” molecular ocurre la activación de numerosos sistemas enzimáticos que producen cambios significativos en la morfología y fisiología de los simbioses, de manera que queden listos para comenzar el proceso de intercambio (Espinosa -Victoria, 2000).

2.2 Establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular

Durante el proceso de desarrollo de la simbiosis micorrízica arbuscular tienen lugar cambios anatómicos y citológicos en la raíz; sin embargo, la expresión morfológica no se detecta a simple vista; quizás por ello la simbiosis ha sido ignorada en estudios sobre fisiología de las plantas, cuando realmente forma parte de la misma (Sylvia y col., 1998; Douds y Nagahashi, 2000).

Diferentes autores han trabajado en definir los eventos que ocurren durante el proceso de establecimiento de esta simbiosis (Bago y col. 1998; Douds y Nagahashi, 2000). Existen diferentes grados de dependencia entre las especies de plantas y los hongos micorrizógenos que intervienen en la asociación, de los cuales va a depender la intensidad de su desarrollo. Al parecer, en el establecimiento de la simbiosis, actúan señales, que controlan las modificaciones fisiológicas y anatómicas entre ambos participantes, como los compuestos de los exudados radicales, los cuales estimulan la germinación de la espora (Buée y col., 2000; Vierheiling y col., 2001).

Durante la micorrización se inducen respuestas de defensa de forma transiente y en menor nivel, que las observadas en las interacciones planta-patógeno (Gardezy y col. 2001), las cuales frecuentemente son suprimidas en los estadios posteriores de la interacción. Este patrón de expresión sugiere la participación de compuestos que

pueden actuar como elicitores, en los primeros estadios de formación de las micorrizas (García Garrido y Ocampo, 2002).

Bonfante y Perotto (1992) sugieren tres fases o estadios del establecimiento simbiótico: (1) germinación de las esporas y crecimiento hifal, (2) estimulación del crecimiento hifal e inicio del proceso de colonización y (3) desarrollo fúngico intracelular con la formación de arbusculos.

Las esporas germinan, estimuladas por la acción de los exudados radicales (Buée y col. 2000; Vierheilig y col. 2003) y posteriormente se produce una hifa de penetración la cual se extiende como respuesta a diferentes condiciones ambientales y edáficas; sin embargo, estos hongos son incapaces de extender el micelio y completar su ciclo de vida sin establecer una relación funcional con la planta hospedera.

Durante el proceso de establecimiento ocurre una secuencia de eventos morfogénéticos representados por la germinación de la espora, el crecimiento micelial presimbiótico y la ramificación de las hifas en presencia de las raíces hospederas. Posteriormente se produce la formación del apresorio sobre la célula epidérmica, debido al incremento de la presión hidrostática de la zona apical de la hifa infectiva, seguido por la colonización radical y el desarrollo de los arbusculos (Malloch y col. 1980; Taylor y col. 1995). Estos constituyen una característica común de los HMA y son los responsables del intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta (Bonfante-Fasolo, 1984). Seguidamente ocurre el crecimiento del micelio extrarradical (Giovanetti, 2000) y por último la formación de las esporas (Rodríguez, 2005). La asociación micorrízica con la planta se mantiene hasta que el hongo complete su ciclo de vida (Alarcón y col., 2004).

El funcionamiento micorrízico es dependiente del ciclo del cultivo, con una etapa inicial en que comienza la colonización y surgen las estructuras fúngicas, una zona de incremento de la micorrización, que da lugar posteriormente a una zona de estabilización del funcionamiento, donde se informan los mayores beneficios para ambos simbioses y se alcanzan los mayores valores de densidad visual, porcentajes de colonización, longitudes de micelio extramático y luego una zona de disminución con la consiguiente desaparición de la simbiosis asociada con la senescencia de la planta. Por esto, las posibilidades de la planta de garantizar los productos de su

metabolismo necesarios para el crecimiento de las estructuras fúngicas y la no necesidad de las plantas de nutrientes en este periodo final, conlleva a un incremento notable de la esporulación como mecanismo de supervivencia (Rivera y col., 2003).

De esta forma, la colonización fúngica ocurre de manera continua en dos sentidos, hacia el interior y hacia el exterior de la raíz (Fernández, 2003a).

Los arbusculos ocupan aproximadamente un 35% del volumen de la célula, distribuidos en un 20% como ramificación y un 15% como tronco arbuscular (Alexander y col. 1988) y son las estructuras más importantes en la interacción planta-HMA, pues en ellos ocurre la transferencia bi-direccional de nutrientes y de elementos esenciales en la funcionalidad de la simbiosis, como los grupos fosfatos y las fuentes carbonadas (de la Noval, 2008).

La penetración de las células del hospedero ocurre sin dañar su integridad ni provocar respuestas restrictivas por parte de la planta, mediante procesos mecánicos y enzimáticos bien localizados y controlados, lo cual evidencia una integración perfecta entre estos dos organismos (Siqueira y Franco, 1988). Durante la colonización, las hifas del hongo invaginan la membrana de la célula vegetal, la que subsecuentemente la envuelve, creándose así un nuevo compartimento donde se deposita material de una elevada complejidad molecular, el cual se ha denominado espacio apoplástico o interfase arbuscular. En esta zona se produce el contacto directo entre el hongo y la planta (Alexander y col. 1988). Paralelamente, se originan las células de almacenamiento, que contienen en su interior gránulos de fosfolípidos como material de reserva y reciben su nombre de acuerdo al género que los origine (Fundora, 2006).

Al estudiar el desarrollo de las raíces micorrizadas, se ha encontrado que en ellas se producen una amplia variedad de elicitores, vinculados a la fase de pre-colonización, los cuales son inductores de respuestas de defensa (de la Noval, 2008).

2.3 Caracterización morfológica de la cepa *Glomus hoi-like* (Rodríguez y col., 2009)

La cepa del hongo micorrizógeno arbuscular (HMA) INCAM-4, procedente del cepario del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, ha mostrado resultados satisfactorios en su inoculación con distintos cultivos de interés económico y en los diferentes suelos en los que se ha aplicado. Sobresalen por su importancia el incremento en el rendimiento

de los cultivos entre 30 y 45 %, un mejor aprovechamiento de los nutrientes del suelo y de los fertilizantes químicos que se requieren en menor dosis (Rivera y col. 2003), ofrece cierta “protección” contra patógenos en tomate (de la Noval y col. 2007), aumenta la tolerancia al déficit hídrico (Fundora, 2006), así como favorece la aclimatización de vitroplantas de papa (Rodríguez y col., 2006; Rodríguez, y col., 2008).

Sus características morfológicas son las siguientes: color hialino, forma globosa a elipsoide, tamaño entre 50-120 μm . La unión de la hifa a la espora es en forma recta o cilíndrica (4.8-5.5 μm de diámetro), en ocasiones se encuentra rodeada por una capa granulada (8.0-10.5 μm) de apariencia similar a la que rodea a la espora. No se observan septos y el poro se encuentra abierto. Presentan de 2 a 3 capas, siendo la tinción con el reactivo de Melzer negativa. La capa más externa es hialina, 1.5-8.0 μm de grosor, más delgada o casi ausente en esporas jóvenes, la superficie es ornamentada e irregular, rodeada por células de diferentes diámetros que la conforman. Esta capa externa no puede ser debris de suelo porque: 1) está ausente en esporas jóvenes, 2) es separable de la espora como una concha, 3) siempre es del mismo tipo de material y 4) un material de textura similar aparece a lo largo de toda la hifa de sostenimiento. La mayoría de las veces la capa interna es única, pero en algunas esporas es doble, hialina, 1.0-1.5 μm y semi-flexible. Las esporas generalmente aparecen en forma de agregados que se ramifican de una hifa común.

La confrontación de las características morfológicas de estas esporas con las que aparecen en el catálogo INVAN no coinciden con las de ninguna de las especies descritas hasta el momento por lo que es considerada una especie nueva según Dalpé (2007), pero presentan cierta semejanza con las de *Glomus hoi* pudiendo sugerirse, por el momento, clasificarla como *Glomus hoi-like* según Herrera, (2007).

2.4 Importancia de los HMA como biofertilizantes para la agricultura

El uso de biofertilizantes en los sistemas productivos constituye una alternativa viable y sumamente importante para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad (Terry, 2005); no obstante la biofertilización no tiene por qué quedar restringida a un modelo

agrícola de bajos insumos y se puede integrar plenamente en una agricultura intensiva con aplicaciones complementarias de fertilizantes químicos (Rivera y col., 2003).

El desarrollo vegetal puede ser incrementado por la utilización de elementos biológicos que actúan de forma coordinada en la interfase suelo - raíz, entre los cuales se encuentran, como factor imprescindible, los hongos HMA (Barea y col., 1991 y Fernández, 1999).

Se ha demostrado que en las plantas micorrizadas se incrementa la captación de nutrientes minerales, especialmente aquellos que son poco móviles en el suelo, como fósforo, cobre y zinc (Smith y Read, 1997; Souchie y col. 2006); no obstante, en la actualidad se reconoce su efecto directo en la nutrición de los diferentes elementos esenciales (George, 2000; Gazey y col., 2004; Oehl y col., 2005).

El incremento en la absorción de fósforo puede ser producido por diferentes procesos, entre los que se encuentran la exploración física del suelo; aumento del movimiento dentro de la hifa; incremento en su almacenamiento, eficiencia en la transferencia del elemento a las raíces de la planta y su eficiente utilización dentro de la planta (Bolan, 1991). La mejora nutricional que aportan estos hongos conlleva a un significativo incremento en el crecimiento de las plantas que poseen esta asociación, especialmente en aquellos suelos donde estos nutrientes son escasos.

Las asociaciones micorrízicas son de gran importancia para el incremento productivo de las plantas en países tropicales (Rubio y col. 2002; Tanaka y Yano, 2005); estos hongos aportan muchos beneficios a su cosimbionte, dentro de los cuales se encuentran:

- Incremento en el volumen de suelo que puede ser explorado (Augé, 2004). El micelio es muy importante en la captación y transporte de nutrientes y agua hacia la planta (Faber y col., 1991; Sánchez Díaz y Honrubia, 1994).
- Reducción de la tensión fisiológica causada por microorganismos patógenos de la raíz (Azcón Aguilar y col., 1992; Linderman, 1992).
- Pueden cambiar el balance competitivo entre los hospederos (Allen y Allen, 1990).

- Favorecen la parte epigea de la planta hospedera, optimizando el proceso fotosintético y por tanto, el crecimiento y supervivencia del vegetal (Eissenstat y Newman, 1990).
- Influyen sobre la dinámica de las comunidades y en la composición de especies (Castillo, 2005), esto es muy favorable y se ha demostrado que las interacciones microbianas pueden determinar la biodiversidad de las plantas y dirigir las funciones del ecosistema tales como, productividad y variabilidad (Van der Heijden y col., 1998).
- Aumentan la capacidad absortiva de la raíz (efecto fisiológico).
- Proporcionan hormonas estimuladoras del crecimiento de las plantas, que incluye auxinas, citoquininas y giberelinas.
- Promueve modificaciones morfológicas y fisiológicas en las raíces.
- Utilizan los nutrientes que se encuentran en formas no disponibles en el suelo, a través de modificaciones en la dinámica del equilibrio de nutrientes entre la fase sólida y líquida del suelo.
- Almacenan temporalmente los nutrientes en la biomasa micorrízica y contribuyen a la reducción de la inmovilización causada por las reacciones de absorción con los coloides del suelo, la precipitación y las pérdidas por lixiviación.
- Se establecen microorganismos mineralizadores, solubilizadores de nutrientes y diazotróficos en la micorrizosfera.
- Favorecen, en suelos salinos, la tolerancia y el crecimiento de la planta en casos de salinidad (Entry y col., 2002; Yano Melo y col., 2003; Carvalho y col., 2004; Wang y col., 2004; García y col., 2007).

La simbiosis tiene un efecto beneficioso sobre el crecimiento y la productividad de los cultivos (Harley y Smith, 1983; Siqueira y Franco, 1988; Fernández, 1999; Rivera y col., 2003).

En el manejo de la simbiosis la poca especificidad cepa eficiente - cultivo, se fundamenta en el poco número de especies y cepas de hongos endomicorrízicos que se asocian con una gran cantidad de especies vegetales y que se expresa en que una especie adecuada o “eficiente” para una condición edáfica dada, establece una

simbiosis eficiente con una gran variedad de cultivos (Ruiz, 2001; Rivera y col. 2003), siendo esta una de las características de la simbiosis de mayor repercusión práctica para su manejo. Ciertamente esta baja especificidad simplifica el manejo productivo de la simbiosis, e incluso es el fundamento de la permanencia del efecto del inoculante aplicado sobre el primer cultivo posterior en secuencia de cultivos (Rivera y col. 2003) o con el uso de los abonos verdes inoculados (Martín, 2009).

En la actualidad, el uso de estos inoculantes microbianos como complementos de fertilizantes químicos y plaguicidas ha recibido especial atención en el desarrollo de las prácticas de producción agrícola sostenible (Gara, 1996) y se ha logrado encontrar una regularidad en los efectos alcanzados con la inoculación de las especies de HMA (Fernández, 1999; Sánchez, 2001; Rivera y col. 2003), destacándose una importante especificidad suelo - cepa eficiente.

Se han utilizado satisfactoriamente estos hongos como principio activo de inoculantes micorrízicos en la mayoría de los sistemas de producción agrícola, empleándose tres vías fundamentalmente: la aplicación directa al suelo debajo de la semilla, en mezcla con los sustratos y el recubrimiento de la semilla. Esta última vía de aplicación se utilizó inicialmente en los granos y cereales (Rivera y col. 2003) y posteriormente se ha extendido a la inoculación de raíces, tubérculos (Ruiz y col., 2006) y frutales (Fundora, 2009).

2.5 Influencia de algunos factores sobre la micorrización

Los factores que afectan a las plantas también inciden directa o indirectamente sobre el establecimiento de los HMA, entre estos se encuentran el potencial fotosintético, la fertilidad del suelo y la intensidad luminosa elevada.

En un principio las pequeñas raíces crecen rápidamente, a pesar de que contienen pocos azúcares simples, debido a la fertilidad del suelo y a la presencia de los HMA que las “protege” del ataque de patógenos. A su vez el desarrollo del hongo está regulado por la temperatura, el pH (Read y col., 1976; Porter y col., 1987a; Porter y col., 1987b; Wang y col., 1993), el exceso de humedad y la presencia de ciertos organismos antagónicos en el área cercana a la raíz (Cruz-Ulloa, 1995).

2.5.1 Variables climáticas

Las variables climáticas como el efecto estimulante de la luz, la temperatura y la cantidad y distribución de las lluvias, representan otro grupo de factores que actúan sobre el establecimiento y desarrollo de los HMA (Hayman, 1974; Furlan, 1977).

Durante el desarrollo del proceso de establecimiento de la micorrización arbuscular, la ausencia de luz, tanto por sombras o por poca iluminación, no sólo reduce el porcentaje de colonización micorrízica de las raíces y por ende la normal producción de esporas, sino que también puede afectar la respuesta de las plantas a la asociación (Hayman, 1974; Furlan y Fortin, 1977). Este fenómeno se origina en gran medida debido a la reducción del grado de suministro de metabolitos a las estructuras fúngicas presentes en las raíces; en consecuencia se restringe el desarrollo externo del hongo y por supuesto la translocación de nutrientes a través de la interfase hongo - planta (Moawad, 1979).

Según Siqueira y Franco (1988) esta variable (la radiación solar) controla la distribución espacial y temporal de las poblaciones vegetales superiores, ejerciendo una influencia marcada sobre las características físicas y químicas del suelo. Controla además, de forma directa, la distribución geográfica de diversas especies de HMA, sus variaciones estacionales y la composición cualitativa y cuantitativa en los ecosistemas.

Esta relación entre la radiación solar y los niveles de infección se explica a partir del incremento de la tasa fotosintética en presencia de altos niveles de radiación, lo que implica una mayor producción e intercambio de metabolitos y por lo tanto una mayor posibilidad de mantener un simbionte con altos valores o niveles de colonización (Fernández, 2003a).

Uno de los factores climáticos que merece ser destacado es la temperatura del suelo. Se ha determinado que existe un amplio rango de temperaturas óptimas en el proceso de germinación, las que varían según la especie (Fernández, 2003a).

En cuanto a las precipitaciones existen algunos criterios contradictorios. Allen y Allen, (1986) plantean que su influencia sobre la colonización no es clara, mientras que Apple y col. (2005) aseguran que los cambios estacionales en la colonización están influenciados por las precipitaciones.

2.6 Principales características que debe poseer un HMA para ser utilizado como inoculante

De forma general la respuesta a la inoculación es dependiente no sólo de la colonización y eficiencia de la cepa aplicada, sino que también es consecuencia de la existencia y cantidad de propágulos nativos (Dodd y Thompson, 1994) y de la propia competitividad de la cepa inoculada.

La infectividad está determinada por la capacidad del hongo para colonizar rápidamente bajo un amplio margen de condiciones, especialmente en compatibilidad con ciertos contenidos de P soluble. Esta es la capacidad del hongo para penetrar e invadir la raíz intensamente y explorar el suelo, así como su habilidad de persistir en el sistema productivo. Un hongo micorrízico con una elevada eficiencia mejora el desarrollo del hospedante ya sea en forma directa o indirecta. Indirectamente la simbiosis micorrízica es efectiva al “proteger” contra patógenos del suelo y condiciones de estrés y directamente incrementa la agregación del suelo y la estabilidad del mismo, cualidades en las que el desarrollo hifal es fundamental (Abbott y col., 1992).

La efectividad no siempre está relacionada con la capacidad infectiva y de competitividad de estos hongos. Por otra parte se ha logrado una relación entre el grado de extensión de la colonización dentro y fuera de la raíz con la infectividad de la misma, por lo que el crecimiento de las hifas debe influir sobre el funcionamiento de la simbiosis y esta característica debe considerarse al hacer la selección de la cepa (Abbott y col., 1992; Bagyaraj, 1992).

El enfoque de inoculación de cepas previamente seleccionadas, bien sea por el conocimiento del área y de los requerimientos edáficos de las especies de HMA a emplear o por la existencia de aislamientos previos y basados siempre en evaluaciones experimentales sobre el comportamiento de las mismas en áreas similares (Rivera y col. 2003) es un enfoque adecuado para la introducción de estos microorganismos en la agricultura. En principio se corresponde con lo planteado por Dodd y Thompson, (1994), quienes aseguran que en presencia de cantidades bajas de propágulos naturales infectivos y para cultivos micótrofos dependientes o facultativos, la

inoculación con cepas eficientes y adaptables a las características del suelo constituye una práctica exitosa.

No obstante, en los últimos años se encontraron resultados que demuestran una alta efectividad de la inoculación de cepas eficientes aún en presencia de altas cantidades de propágulos nativos (González y col. 2006; Martín, 2009), dejando clara la importancia de la competitividad de la cepa aplicada como condición para que éstos sean efectivos, ampliando el rango de utilización de los inoculantes micorrízicos (Rivera y col., 2009).

Claramente los factores determinantes de la eficiencia simbiótica están relacionados con el tipo de hongo micorrizógeno (tasa de crecimiento, translocación de nutrientes y metabolismo del P en el micelio externo, capacidad infectiva, tasa de crecimiento del endófito arbuscular y la producción de arbusculos en el micelio interno), con la planta hospedera (morfología de la raíz, tasa de crecimiento de las raíces, requerimientos nutricionales de las plantas, tasa fotosintética y tolerancia a las situaciones de estrés) y la interfase simbiótica (área de contacto entre los simbioses, tasa de toma de nutrientes y tasa de flujo de carbohidratos (Sieverding, 1991); no obstante en este enfoque no se reconoce la importancia del tipo de suelo sobre la efectividad de la cepa en cuestión.

En los trabajos desarrollados en Cuba y valorados integralmente por Rivera y col. (2003), se deja establecida la importancia de la especificidad cepa eficiente HMA-suelo, como criterio fundamental para la recomendación de cepas eficientes a inocular en los sistemas de producción agrícola; no obstante esto no significa que cada tipo de suelo requiere de una cepa eficiente diferente, sino que los suelos que poseen características de fertilidad química cercanas o de cantidades de Ca y Mg intercambiable se asocian efectivamente con una misma cepa o cepas de HMA. La importancia de la especificidad cepa- suelo como criterio de recomendación de cepas eficientes también ha sido planteado por (Hamel y Strullu, 2006).

Es conveniente que el inoculante tenga una capacidad reproductiva elevada, sus propágulos germinen con facilidad y sus hifas crezcan y se extiendan abundantemente en el suelo; de esta forma, aumentan las posibilidades de contacto entre el hongo y

distintas raíces del suelo, facilitándose así la colonización de nuevas raíces y la dispersión del inóculo.

La supervivencia del inóculo y la persistencia de sus efectos están asociadas con la capacidad de producir estructuras (esporas, esporocarpos, vesículas intrarradicales, arbuscúlos, entre otros) que le confiera resistencia a una amplia gama de condiciones ambientales adversas, con lo cual se asegura el mantenimiento de la capacidad de colonización de la cepa sin necesidad de tener que practicar reinoculaciones en el inicio de cada periodo de crecimiento.

2.7 Definiciones de biofertilizantes e inoculantes como productos

La norma cubana NC ISO 9000: 2005 define a un producto como el resultado de un conjunto de actividades mutuamente relacionadas o que interactúan, las cuales transforman elementos de entrada en resultados.

Definición de biofertilizante: son aquellos productos a base de microorganismos que viven normalmente en el suelo, aunque en poblaciones bajas, y que, al incrementar sus poblaciones por medio de la inoculación artificial, son capaces de poner a disposición de las plantas, mediante su actividad biológica, una parte importante de los nutrientes que necesitan para su desarrollo, así como de suministrar sustancias hormonales o promotoras del crecimiento (Martínez Viera, 2006).

Definición de inoculante: es aquel producto biológico que facilita la introducción de microorganismos con diversa actividad fisiológica que favorece el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ferrera y col., 2006).

La posibilidad de obtener elevados rendimientos agrícolas y al mismo tiempo preservar el medio ambiente está irremediablemente ligada al uso generalizado de estos productos, como alternativa al uso masivo de plaguicidas y fertilizantes de origen químico, que son costosos y tienen un impacto muy negativo sobre la salud y el medio ambiente.

Los inoculantes son productos tecnológicos cuyo principio activo es un microorganismo vivo (bacterias y hongos), que tiene la propiedad de mejorar la nutrición y el crecimiento vegetal, permitiendo así un mejor aprovechamiento de los recursos naturales del suelo y del ambiente.

La obtención, comercialización y aplicación eficiente de un inoculante eficaz y de alta calidad es un proceso largo y complejo en el que se ven involucrados muchos y muy diversos especialistas: microbiólogos, fisiólogos vegetales, ingenieros agrónomos, ingenieros industriales, técnicos extensionistas, economistas, agencias fiscalizadoras, legisladores, etc., incluidos los propios agricultores como usuarios finales del producto. La necesaria implicación de todos ellos en una o varias etapas del proceso y las complejas interrelaciones que pueden llegar a establecerse son determinantes para el éxito o fracaso de un producto de esta naturaleza (Adholeya y col., 2005).

Los inoculantes pueden presentar diferentes aspectos físicos, ya sean líquidos o sólidos, en los que se utilizan soportes como la arcilla, la turba, el carbón activado, aceites, alginatos y otros compuestos orgánicos e inorgánicos. De este modo, el inoculante puede ser manejado con el fin de establecer los microorganismos en las hojas, tallo o raíces y así implantarlos en los diversos sistemas de producción agrícola. Estos contribuyen al desarrollo sustentable por ser técnicamente factibles dentro del nivel científico técnico de un país y que proveen beneficios tangibles a los destinatarios, son ambientalmente seguros y socioeconómico y culturalmente aceptables (Adholeya y col., 2005).

En el caso de los hongos micorrízicos el inoculante puede contener esporas, hifas, fragmentos de cuerpos fructíferos y fragmentos de raíces colonizadas (Alarcón y Ferrera Cerrato, 1999).

2.8 Requisitos y proceso de producción del inoculante

Para la propagación de los HMA se necesita la utilización de plantas hospederas (Strullu, 1991; Dumas y col. 2000), debido a su condición de simbioses obligados (Bago y col., 2000a; Usura y col., 2008).

El desarrollo de sus estructuras a nivel radical conlleva a la funcionalidad de la asociación, con una serie de beneficios para las plantas en términos de eficiencia en la toma de nutrientes del suelo y la resistencia a factores adversos: bióticos y abióticos. Lo anterior ha motivado la utilización de este recurso con fines agronómicos, por lo cual se requiere optimizar sus procesos de multiplicación y aplicación.

La planta hospedera debe sembrarse en un sustrato que facilite una eficiente simbiosis, el mismo debe presentar una adecuada capacidad de intercambio catiónico, aeración y

una retención de humedad apropiada (Habte y Osorio, 2001; Sempere y Santamarina, 2001); no obstante, el tipo de cepa a reproducir determinará las características físico-química óptimas del sustrato (Mederos y col., 2008).

El sustrato, además, debe permitir la reproducción de abundantes propágulos, ser de fácil manipulación, que abunde y sea de fácil extracción y que no sea costoso. El reto del uso de estos hongos en la agricultura como inoculante, implica la creación de sistemas de producción de inóculos eficientes (Manjarrez y col., 2000).

La selección de una cepa para la fabricación de un inoculante implica un proceso prolongado y complejo que incluye pruebas de comportamiento en laboratorio, en invernadero y en campo, durante varios años, cubriendo diversas situaciones ambientales y agronómicas (Bago y col., 2002).

Estas pruebas de comportamiento consideran aspectos cualitativos de las cepas como: efectividad, habilidad competitiva, habilidad industrial, adaptabilidad ecológica, estabilidad genética, compatibilidad con otros microorganismos y comportamiento frente a factores limitantes del suelo (Bago y col., 2000a; Vega, 2003).

En la selección de la planta hospedera se deben tener en cuenta diferentes criterios como: poseer una buena tasa de crecimiento, ser de fácil manejo, de sus semillas y en la poda y que sea tolerante a plagas y enfermedades (Cuenca y col. 2003) y (Sylvia, 2004). Se debe seleccionar una especie preferentemente 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*. (Fernandez, 2003b).

Se han propuesto diversas metodologías para la producción de inoculantes micorrízicos, unas más complejas que otras, lo que las diferencia realmente es el medio en el cual se desarrolla la simbiosis.

En el caso de los HMA, la fuente de inoculante proviene inicialmente del conjunto de hongos nativos que están asociados a las raíces de las plantas o que se encuentran en el suelo rizosférico, ya sea en ecosistemas o en agroecosistemas. Los propágulos conocidos como esporas son separados y propagados en plantas trampa mantenidas

en invernadero, para lo cual se utilizan sustratos estériles. Estos propágulos son separados del suelo con el fin de seleccionar aquellas cepas que tengan mayor capacidad de micorrización y a la vez, favorezcan el crecimiento de las plantas. Las esporas extraídas del suelo sirven para realizar estudios taxonómicos correspondientes a los hongos involucrados (Morton y Redecker, 2001).

Todas las estructuras propias de los HMA son fuentes de inóculo potenciales, aunque en la práctica sólo tres tipos de propágulos han demostrado ser efectivos: las raicillas infectadas, los fragmentos de micelio externo y las esporas (Liu y Luo, 1914).

2.8.1 Definición de inoculante certificado y comercial (Rivera, 2009)

Inóculo certificado: Es aquel que se obtiene en condiciones semicontroladas, el cual generalmente tiene un contenido entre 80 y 120 esporas.g⁻¹ de sustrato, presenta una elevada pureza de la cepa en cuestión y se utiliza para producir inoculante comercial.

Inóculo comercial: Es aquel que se obtiene en canteros de producción bajo condiciones ambientales normales, con un contenido mínimo de esporas entre 15 y 20 esporas.g⁻¹ de sustrato y se utiliza para aplicar a escala agrícola productiva.

2.8.2 Etapas del proceso de producción de inoculante micorrízico

2.8.2.1 Producción de inóculo certificado

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 y col., 1993).

Como primer paso se realiza la multiplicación a partir de inoculantes monospóricos el cual, después del segundo o tercer ciclo, en su totalidad garantiza la presencia de un morfotipo específico que es empleado como fuente para la obtención del inóculo certificado (Verma y col., 2008).

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, este cultivo se realiza en recipientes con sustrato natural arcilloso, sólido y estéril (Fernández, 2003b).

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 simbiosis. Para evitar este fenómeno, se aplican diferentes soluciones nutritivas de acuerdo a las necesidades de las plantas micorrizadas, sin afectar el funcionamiento micorrízico (Fernández, 2003b).

Durante este proceso se necesita que 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, y se deja 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 como inoculante comercial a utilizar en la producción agrícola (Fernández, 2003b).

Posterior al secado, se empaca en bolsas de polietileno para su almacenamiento en cámara fría a 4 °C. En ocasiones, en el INCA se han mantenido inoculantes sólidos almacenados de forma viable hasta dos años y con una concentración final que oscila entre 120 y 350 esporas. g⁻¹ de sustrato, de acuerdo al tipo de especie multiplicada y la época del año en que se desarrolló la simbiosis (Fernández, 2003b).

2.8.2.2 Producción del inoculante comercial EcoMic[®]

La producción del inóculo comercial es similar a la obtención del certificado en cuanto a las normas de procedimiento, sin embargo varían las condiciones y los materiales que se emplean para su obtención (Fernández, 2003b).

De forma general se utiliza la metodología descrita por Sieverding (1991), la cual se basa 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.

Los canteros o áreas de reproducción se pueden construir sobre el propio suelo, con un metro de ancho y 0,20 m de profundidad efectiva; cada cinco metros lineales y con sustratos con densidad aparente de 1 g.cm^{-3} , se puede cosechar alrededor de una tonelada métrica de producto final. Los canteros pueden ser construidos de diferentes materiales: de polietileno negro y por tanto temporales y se cambian en cada ciclo productivo o de concreto o materiales similares y ser utilizados durante un grupo de años para esta función (Rivera y col. 2007), los mismos se llenan con el sustrato natural arcilloso previamente escogido.

El sustrato utilizado se esteriliza, en dependencia del contenido de esporas nativas presentes en el mismo. Posteriormente se coloca una cantidad de inoculante certificado en el fondo de los pequeños surcos delineados para la siembra, la semilla se recubre con inóculo certificado mediante la tecnología de recubrimiento y se siembra. Al término del ciclo de vida de la planta hospedera se desecha la parte aérea, se seca el sustrato enriquecido con los propágulos micorrízicos en un área techada con suficiente ventilación y se procede al procesamiento del inoculante, a través de un potente molinado y posterior empaque en bolsas para su comercialización (Fernández, 2003b).

La calidad de un inoculante micorrízico se indica en el número de propágulos y dentro de éstos, en el número de esporas; la mayor calidad del inoculante es directamente proporcional al mayor número de propágulos. Para que un inoculante presente una adecuada calidad no basta con tener sólo esporas, es más eficiente si tiene una combinación de los tres tipos de propágulos fundamentales (esporas, fragmentos de raíces colonizadas e hifas), porque eso potencia la actividad de colonización del mismo (Rivera y col., 2007).

Los rangos de concentración de esporas. g^{-1} de inoculante, establecidos para ambos tipos de inoculantes, según Fernández (2003b) son:

- Inóculo Certificado
 - *Glomus hoi* - like 125 - 250 esporas. g^{-1} de sustrato
 - *Glomus clarum*: 250 - 350 esporas. g^{-1} de sustrato
 - *Glomus mosseae*: 70 - 50 esporas. g^{-1} de sustrato
- Inóculo comercial
 - Cualquiera de las cepas anteriores: 20-30 esporas. g^{-1} de sustrato

Desde hace algunos años se establece como contenido mínimo de esporas.g⁻¹ del producto EcoMic[®], 20 esporas.g⁻¹ y este contenido mínimo se incrementará en la medida que se establezcan los mayores contenidos de esporas en el proceso productivo (Rivera y col., 2007).

La tecnología inicial de producción desarrollada por Fernández y col. (1999), garantiza que en ambos tipos de inoculantes los productos obtenidos estén libres de patógenos, siempre que se sigan los protocolos de esterilización y del sistema de control de la calidad que evalúa todo el proceso.

2.9 Características botánicas y exigencias edafoclimáticas y nutricionales de la especie *Brachiaria sp.*

Las gramíneas generalmente presentan elevada diversidad, facilidad de siembra, rápido crecimiento y establecimiento, garantía de cobertura y protección del suelo.

Los hongos micorrízicos arbusculares asociados a las gramíneas, ejercen gran influencia sobre estas plantas, constituyéndose en importantes componentes bióticos del ecosistema (Gómez, 2002).

Brachiaria pertenece al orden Glumiflorae, tribu Panacea. Es una gramínea perenne, rastrera, con estolones largos que arraigan en los nudos y forman rápidamente una postura densa, hasta alcanzar una altura de 80 cm. El tallo del género es herbáceo, posee una panícula de 11 a 24 cm de largo, que presenta pocos (a veces uno solo) o diversos racimos con espiguillos sésiles o subsésiles desprovistos de pedicelos, arraigadas en dos filas y en un raquis usualmente achatado. Sus hojas son lanceoladas o linealmente lanceoladas (se estrechan hasta terminar en punta), formadas por cinco a ocho espigas verdosas, de 3,6 cm de largo, con espiguillas bifloras de cinco a seis cm de largo, dispuestas en dos series alternativas sobre un raquis dorciplano. Las semillas son de tamaño medio, algo redondeadas y normalmente muy fértiles (Gutiérrez y col. 1990). Presenta un fruto cariopse y la planta se propaga vegetativamente y por semilla (Cortéz, 1984).

La especie *Brachiaria* es nativa de Uganda y otros países tropicales del África Oriental, de hábito decumbente y alto potencial de adaptación a un amplio rango de suelos y climas. Fue introducida en Cuba en la década del 70 y ha llamado la atención por los

resultados alcanzados en zonas tropicales, que incluye a Brasil, Australia, Colombia y otros, donde ha sido muy apreciada por los ganaderos (Hernández y Hernández, 1980). En nuestro país, los estudios han evidenciado sus características promisorias, donde se ha obtenido buena adaptación con altos rendimientos en suelos de pH ligeramente ácido, neutros y ligeramente alcalinos con buena fertilidad, así mismo se obtienen rendimientos adecuados en suelos de pH ácido y poco fértiles, pero con buen drenaje interno y externo. Resiste muy bien los periodos de sequía (Gutiérrez y col., 1990; Vega y col., 2006).

Esta especie se adapta a suelos de textura variada, incluyendo los de baja fertilidad y ácidos y no son exigentes a la irrigación, aunque requiere riegos periódicos y fertilizantes, fundamentalmente nitrogenados. Produce un alto rendimiento de biomasa que permite intensificar su producción (Paretas, 1991).

Es resistente a la sequía, pero no tolera el encharcamiento y se adapta bien a suelos de media a baja fertilidad, mostrando un rápido rebrote después de un corte o pastoreo junto a una efectiva competencia con las malezas (Mederos, 2009).

A continuación se presenta la dependencia micorrízica de gramíneas y leguminosas forrajeras tropicales (Howeler y col., 1987)

Dependencia micorrízica en Gramíneas		
> 80%	60-80%	30-60%
<i>Brachiaria decumbens</i>	<i>Centrosema macrocarpum</i>	<i>Stylosanthes guianensis</i>
<i>B. brizantha</i>	<i>C. brasilianum</i>	<i>S. macrocephala</i>
<i>Andropogon gayanus</i>	<i>C. pubescens</i>	<i>Arachis pintoi</i>
	<i>B. humidicola</i>	<i>Pueraria phaseoloides</i>
	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Desmodium ovaliflorum</i>
	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	<i>Panicum maximum</i>
	<i>S. capitata</i>	

2.10 Generalidades sobre la toma de muestras en el suelo

La toma de muestras de suelo es un aspecto que merece consideración detallada. Existen diferentes maneras de realizar un muestreo con el objetivo de obtener una muestra representativa del área muestreada. La toma de muestras incluye la selección

del material que forma el suelo de modo tal que tenga en cuenta la mayor variabilidad (Lozano y col., 2004).

En el proceso de toma de muestras se deben tener en cuenta las variaciones del suelo de acuerdo con la profundidad del perfil y el área del terreno. Estos factores pueden considerarse en función del tipo de suelo y del lugar donde se realice el muestreo. El límite de exactitud de un muestreo está dado por la forma de realización del mismo y no por el análisis (Cline, 1944).

Tipos de métodos de muestreo

La parte más crítica en un buen programa de análisis de suelos es la obtención de una muestra que sea representativa del campo. Existen diferentes maneras de obtener una muestra representativa según Ferraris, (2003). A continuación se verán algunas de ellas:

La más sencilla consiste en el muestreo al azar, recolectando submuestras que luego son mezcladas para formar una muestra compuesta que es enviada al laboratorio. El inconveniente de este tipo de muestreo es que frecuentemente no se tiene en cuenta la variabilidad existente en sectores no homogéneos del suelo.

Otra variante es el muestreo en áreas de referencia, que consiste en muestrear intensamente un sector homogéneo, que se asume representativo del suelo total.

El tipo más intensivo de muestreo es el muestreo sistemático o en grilla, donde las muestras son tomadas a intervalos regulares en todas las direcciones, analizándose por separado. Es muy preciso y refleja la variabilidad del suelo.

Otro plan de muestro consiste en dividir el campo en subunidades homogéneas, dentro de las cuales se toman muestras compuestas al azar, evitando cualquier falta de uniformidad que pueda aparecer en el suelo. Este tipo de muestreo es conocido como muestreo al azar estratificado (Darwich, 2003).

Profundidad de muestreo

La profundidad de muestreo está determinada por el nutriente, propiedad del suelo o especie de HMA que se pretende cuantificar. Por ejemplo la materia orgánica, el pH y el fósforo se miden habitualmente en la capa superficial (0-20 cm), ya que es la profundidad donde ejercen mayor influencia (Zamuner y col., 2003). En el caso de los

HMA se debe muestrear en los primeros 20 cm de profundidad que es donde se presentan en mayor abundancia (Peña Venegas y col., 2007).

Impacto de la variabilidad sobre el muestreo de suelo

Para controlar la variabilidad espacial de los suelos es necesario realizar un diseño de muestreo de tal forma que la medición de los cambios temporales no se confunda con la variación espacial del terreno evaluado (Lozano y col., 2004).

La fertilidad de un suelo en un lote no presenta una distribución normal. Una variable con distribución normal se distribuye siguiendo la forma de una campana, y el valor promedio coincide con el valor mas frecuente. En cambio, al evaluar el contenido de nutrientes de un lote encontramos muchos puntos con fertilidad algo por debajo del promedio y unos pocos muy por encima (Ferraris, 2003).

Las principales causas de variabilidad en el suelo pueden manifestarse entre las diferentes muestras tomadas de un mismo volumen (error de la toma de muestras), la introducida entre las diferentes muestras parciales de una misma muestra (error de la submuestras), la realizada de una determinación química a otra, realizada sobre la misma muestra (error analítico) (Jackson, 1964).

El mismo autor también plantea que se ha demostrado que el error procedente de la toma de muestras y su manipulación es de tres a seis veces mayor que el que se ocasiona por la toma de porciones y por los procedimientos de análisis.

Tipo de muestras a tomar

- **Muestra simple:** Es la que se obtiene con una sola extracción de suelo. Son usadas en trabajos de investigación y en suelos muy homogéneos (Ferraris, 2003).
- **Muestra compuesta:** Se refiere a la muestra de suelo obtenida por la extracción de varias muestras simples o submuestras, reunidas en un recipiente y bien mezcladas (Ferraris, 2003).

Número de submuestras a recolectar por muestra compuesta

En la toma de una muestra compuesta se debe tener en cuenta que cada submuestra sea del mismo volumen que las demás y representar la misma sección transversal del volumen de que se toma la muestra (una misma profundidad). Las muestras deben

tomarse al azar con respecto al volumen de donde se toman. Hay que tomar un número suficiente de muestras individuales para que quede representado adecuadamente el volumen total del que se toma la muestra. La unidad de suelo escogida para formar una muestra compuesta debe ser homogénea para el objetivo del análisis (Jackson, 1964).

La calidad del muestreo depende del número de submuestras que se tomen en cada muestra compuesta (Swenson y col. 1984). El aumento del número de muestras individuales hace que disminuya la variabilidad de las características de las muestras (Jackson, 1964).

Un inadecuado diseño de muestreo combinado con un insuficiente número de muestras colectadas puede ocasionar un sesgo en la estimación de los parámetros a evaluar, restándole validez a los resultados (Arrouays y col., 2000).

2.11 Generalidades del control de calidad

Cuando se dice que algo tiene calidad, se designa un juicio positivo con respecto a las características del objeto, el significado del vocablo calidad en este caso pasa a ser equivalente al significado de los términos excelencia, perfección (Otero y col., 2002).

Según Juran, (1990), el control de la calidad es el que permite comparar las metas de calidad con la realización de las operaciones y su resultado final es conducir las operaciones de acuerdo con el plan de calidad.

Definición de calidad según la Norma cubana NC ISO 9000: 2005

Calidad: Es el grado en el que un conjunto de características inherentes o asignadas, cualitativas o cuantitativas cumplen con los requisitos establecidos, ya sean implícitos u obligatorios.

Glosario de la definición de calidad

- El término "calidad" puede utilizarse acompañado de adjetivos tales como: pobre, buena o excelente.
- "Inherente", en contraposición a "asignado", significa que existe en algo, especialmente como una característica permanente.
- Una característica puede ser cualitativa o cuantitativa.
- "Generalmente implícita" significa que es habitual o que es una práctica común para la organización.

Definición de Gestión de la calidad según la Norma cubana NC ISO 9000: 2005:

Gestión de la calidad: Son las actividades coordinadas para dirigir y controlar un conjunto de personas e instalaciones con una disposición de responsabilidades, autoridades y relaciones en lo relativo a la calidad, esta última no es más que el grado en el que un conjunto de características inherentes cumple con la necesidad o expectativa establecida, generalmente implícita u obligatoria.

Control de calidad: Parte de la gestión de la calidad orientada al cumplimiento de los requisitos de la calidad.

Son todas aquellas acciones planificadas y sistemáticas necesarias para proporcionar la confianza adecuada de que un producto o servicio satisface los requisitos de calidad establecidos.

Involucra la orientación de la organización a la calidad manifestada en la calidad de sus productos, servicios, desarrollo de su personal y contribución al bienestar general. La definición de una estrategia puede asegurar que la organización cumpla con sus objetivos. La definición de su sistema determinará si está haciendo estas cosas correctamente (Juran, 1990). La calidad de los procesos se mide por el grado de adecuación de estos a lograr la satisfacción de sus clientes (internos o externos). Esto implica la definición de requerimientos del cliente o consumidor, los métodos de medición y estándares contra que comparar la calidad (Juran y Gryna, 2000).

2.12 Control de calidad de inoculantes micorrízicos

La calidad de un inoculante puede definirse como la capacidad que posee el mismo para lograr un contenido de esporas que se encuentre en el rango estipulado por las normas, con la pureza requerida y con un valor productivo para el productor (Fernández, 2003b).

En la producción de cualquier inoculante micorrizógeno se aplica un riguroso control de la calidad, y se monitorea de forma sistemática, tanto la dinámica del desarrollo de la simbiosis micorrízica, como el contenido de esporas, la producción de micelio externo y el grado de pureza de las poblaciones de hongos micorrizógenos que se cultivan para este fin en todas las fases del proceso productivo (Rivera y col., 2003).

Durante el periodo de crecimiento y desarrollo de la planta hospedera se espera que al unísono se produzca la colonización por los hongos micorrizógenos y se establezca e incremente la simbiosis entre la planta y los hongos (Mehrotra y Baijal, 1995).

Paneque y Calaña (2004), plantearon que para hacer la evaluación del sistema de producción en la fase de cantero es necesario realizar muestreos periódicos y sistemáticos de la arcilla o del sustrato que pueden ser los medios donde se establezca la simbiosis. El comienzo de estos muestreos varía en dependencia de la planta hospedera que se utilice para el establecimiento.

III- MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios referidos al presente trabajo se realizaron en la planta de producción del inoculante micorrizógeno EcoMic[®] situada en el Área Central del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), el cual se encuentra ubicado en el Km 3½ de la carretera a Tapaste, Municipio San José de Las Lajas, Provincia La Habana.

Con la finalidad de dar respuesta a los objetivos propuestos se realizaron tres experimentos que se nombran a continuación:

Experimento 1. Establecimiento de una metodología de muestreo y de la época del año más adecuada para la producción de EcoMic[®]

Experimento 2. Influencia del tiempo de secado y de molinado en los contenidos de esporas del inoculante

Experimento 3. Implementación del proceso de control de la calidad de EcoMic[®]

3.1 Experimento 1. Establecimiento de una metodología de muestreo y del periodo del año más adecuado para la producción de EcoMic[®]

Este experimento se ejecutó en canteros multiplicadores durante los periodos de enero a mayo y de junio a octubre del año 2008, con el objetivo de establecer una metodología de muestreo capaz de garantizar un adecuado control de la calidad del producto EcoMic[®] y de evaluar la influencia de la época del año, en la cual se produce el inóculo, sobre la producción de esporas, propágulo indicativo de la calidad final del inoculante.

Primeramente se recopilaron los valores de temperatura máxima, mínima y promedio, la humedad relativa promedio y las precipitaciones medias mensuales



correspondientes al periodo enero-octubre de 2008 (Tabla 1). Tomando como referencia la Estación Meteorológica número 78374 ubicada en el Km 3½ de la carretera a Tapaste, municipio San José de Las Lajas, provincia La Habana.

Se prepararon canteros de polietileno negro (100 a 150 micras de espesor) de 15,0 m de largo x 1,0 m de ancho y una altura de 0,20 m, identificados como C5 y C6 en el

primer periodo de siembra y como B5 y B6 en el segundo. En la base de los canteros se realizaron perforaciones para facilitar el drenaje del agua.

Tabla 1: Variables climatológicas mensuales durante el periodo experimental del año 2008

Meses	Temperatura (°C)			Humedad relativa promedio (%)	Precipitaciones medias mensuales (mm)
	Máxima	Mínima	Promedio		
Enero	27,1	14,9	21,0	73,0	28,3
Febrero	29,0	17,0	23,0	72,1	27,1
Marzo	30,3	17,6	23,9	71,0	115,3
Abril	29,2	16,9	23,1	71,0	145,6
Mayo	32,1	20,4	25,8	75,0	139,2
Junio	31,6	21,7	26,7	80,8	222,2
Julio	32,2	21,3	26,7	80,9	180,2
Agosto	32,4	21,5	26,9	80,7	247,5
Septiembre	31,1	21,8	26,4	84,5	347,5
Octubre	29,5	20,0	24,6	82,0	120,4

Los canteros se llenaron con un sustrato natural arcilloso proveniente de la laguna "La Sierra" ubicada en el Guayabal, municipio San José de las Lajas, provincia La Habana, el cual se extrajo a una profundidad de entre 1,0 y 2,0 m. El suelo asociado se clasificó como Hidromórfico Gley Vértico Carbonatado (Hernández y col., 1999) y sus características químicas se presentan en la tabla 4.

Tabla 2: Características químicas del sustrato utilizado en los canteros en ambos periodos estudiados.

Periodos	Canteros	pH	MO	P	Ca	Mg	Na	K
		H ₂ O	(%)	(ppm)	(cmol. kg ⁻¹)			
Enero-Mayo	C5	8,0	1,95	5,00	50,00	6,83	0,38	0,41
Enero-Mayo	C6	7,9	1,86	3,33	47,50	8,17	0,30	0,40
	x	7,95	1,90	4,16	48,75	7,5	0,34	0,40
Junio-Octubre	B5	8,5	2,24	56,00	36,30	10,10	1,20	0,44
Junio-Octubre	B6	8,4	2,06	48,00	36,60	9,00	1,27	0,46
	x	8,45	2,15	52,00	36,45	9,55	1,23	0,45

El pH en H₂O se determinó por potenciometría, utilizando una relación suelo- disolución 1:2,5. El contenido de materia orgánica (% M.O) se determinó siguiendo la metodología descrita por Walkley y Black y el fósforo (P₂O₅) por Oniani. Los cationes intercambiables se determinaron por una extracción con NH₄AC 1 mol.L⁻¹ a pH 7; calcio (Ca) y magnesio (Mg) por Complejometría y potasio (K) por Fotometría de llama (Paneque, 2002).

Se empleó un inóculo de HMA que contenía 80 esporas por g⁻¹ de la cepa *Glomus hoi-like* (INCAM-4), suministrado por el cepario de HMA del INCA.

El sustrato se esterilizó con una solución de formol al 2,5% aplicada a razón de 5 L.m⁻², el cantero se cubrió cuidadosamente con polietileno negro por 72 horas para que accionara la solución aplicada, posteriormente se destapó dejándolo reposar por 72 horas hasta expulsar los gases remanentes y finalmente se procedió a sembrar.

La siembra se realizó a chorrillo en la primera semana del mes de enero y en la segunda semana del mes de junio, utilizando semillas de *Brachiaria decumbens* plantadas a una densidad de 13 g.m⁻² y distribuidas en 7 surcos por cantero. Las semillas fueron recubiertas con inóculo micorrízico antes de la siembra mediante la tecnología descrita por Fernández y col. (1999b). El inóculo sólido se aplicó a razón del 10 % del peso de la semilla.

En el momento de la siembra se aplicó 150 g de la fórmula completa NPK (9 – 13 – 17) en cada cantero y a los 30 días de germinadas las semillas se aplicaron 75 g de Urea (46 – 0 – 0), ambas aplicaciones se realizaron por cantero de 15 m de largo, para garantizar un suministro de nutrientes adecuado para un funcionamiento micorrízico eficiente de *Brachiaria decumbens*.

3.1.1 Muestreos y evaluaciones realizadas

Para establecer una metodología eficiente en la toma de muestras de las diferentes variables, los canteros multiplicadores se subdividieron en tres partes de cinco metros cada una como se muestra en la figura 1.

Los muestreos en el periodo enero-mayo fueron realizados a los 30, 60, 90 y 120 días después de la siembra. En el periodo junio-octubre se realizaron muestreos a los 60, 90 y 120 días después de la siembra (no se realizó muestreo a los 30 días porque hubo

abundantes precipitaciones y el sustrato presentó una acumulación excesiva de agua, lo cual impidió la realización del muestreo).

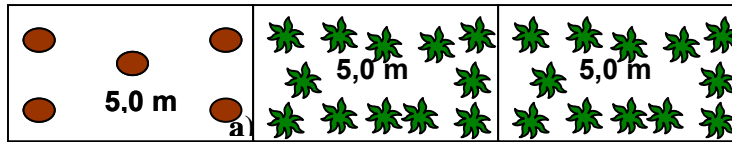


Figura 1. Diagrama representativo de un cantero multiplicador de EcoMic® de 15,0 m de largo dividido en tres partes de igual longitud. a)- Muestra la distribución espacial de las muestras compuestas tomadas en cada parte.

En cada una de las partes del cantero se tomó una muestra compuesta por una, tres y cinco submuestras de sustrato en las profundidades de 0-10 cm y 10-20 cm. También se extrajo un cubo de 25 cm que incluía el sustrato hasta 20 cm de profundidad y las plantas correspondientes. El bloque de sustrato fue dividido en dos partes de 10 cm, para evaluar el sistema radical en las dos profundidades.

Se determinó la masa seca aérea y radical de las plantas muestreadas. Las raíces se extrajeron lavándolas con abundante agua y se secaron en estufa a temperatura de 65 °C durante 48 horas hasta obtener masa constante.

Se determinaron los porcentajes de Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K) presentes en la parte aérea de las plantas por digestión húmeda ($H_2SO_4 + Se$), evaluando N por el método de Nessler, P por formación de azul de molibdeno y K por Fotometría de llama (Paneque y col., 2002).

En las raíces extraídas a ambas profundidades se evaluaron los porcentajes de Colonización micorrízica y de Densidad visual, siguiendo las metodologías descritas por Phillips y Hayman (1970) y por Herrera y col. (1995). La cuantificación del porcentaje de Colonización micorrízica se realizó a través del método de los interceptos descrito por Giovanetti y Mosse (1980). El cálculo matemático del porcentaje de Densidad visual se realizó a través de la metodología descrita por Trouvelot y col., (1986).

El número de esporas de HMA en el sustrato se determinó en cada momento de muestreo, para lo cual se tomaron dos muestras compuestas por tres y cinco submuestras en cada uno de los cuadrantes, en las dos profundidades estudiadas. En

el periodo junio-octubre se tomaron asimismo tres muestras de sustrato compuestas por una, tres y cinco submuestras.

Para la toma de las muestras se utilizó una barrena de 6,0 cm de diámetro y 10,0 cm de profundidad. Las esporas se aislaron por el método de Tamizado húmedo y decantado (Gerdemann y Nicholson, 1963, modificado por Herrera y col. 1995) y se contaron con ayuda de una placa de conteo de nemátodos en un microscopio estéreo modelo Stemi 2000-C (40x).

Las labores de deshierbe se realizaron tres veces en el ciclo del cultivo y el riego se aplicó manteniendo la humedad del sustrato en un límite cercano a la capacidad de campo. Durante todo el periodo del cultivo no fue necesaria la aplicación de productos fitosanitarios.

3.1.2 Variabilidad espacial del número de esporas

Con el objetivo de determinar la variabilidad espacial del número de esporas de HMA en los canteros C5, C6, B5 y B6, se procedió a tomar una muestra compuesta por tres submuestras cada 1,5 m, para un total de 10 muestras por cantero, a lo largo del mismo. Las submuestras que componían cada muestra compuesta se tomaron en los surcos dos, cuatro y seis y a cada una se determinó el número de esporas.g⁻¹ de sustrato.

Con el objetivo de valorar como la variabilidad longitudinal de las esporas.g⁻¹ en el cantero, se refleja en el método de muestreo de subdividir cada cantero en tres partes iguales, se procedió a agrupar las 10 muestras tomadas para la evaluación de la variabilidad longitudinal, promediando los valores de las muestras que coincidían en cada una de las partes en que se dividió el cantero.

Tratando de encontrarle una causa a la variabilidad encontrada en el número de esporas dentro de los canteros, se realizó un nuevo análisis de variabilidad a otros dos canteros (B3 y B4), sembrados en marzo del año 2009, en los cuales se utilizó la misma planta hospedera, el tipo de sustrato y la cepa de HMA inoculada en los canteros C5, C6, B5 y B6.

Con posterioridad se relacionó la variabilidad existente en la producción de esporas con la variabilidad presente en los contenidos químicos del sustrato y el muestreo se realizó

similar al referido anteriormente. A cada muestra de sustrato se le determinó el número de esporas y los contenidos químicos del mismo, en los dos canteros anteriormente referidos (B3 y B4), correspondientes al experimento 3.

3.1.3 Análisis estadístico

La influencia de los momentos de muestreo sobre la Masa seca aérea y radical en las dos profundidades se evaluó mediante la Comparación de las medias con sus Intervalos de confianza al 95%. De la misma forma se procedió con el análisis del efecto de los momentos de muestreo sobre los contenidos de macronutrientes en la biomasa aérea.

Para determinar la influencia de la profundidad de muestreo sobre el porcentaje de Colonización y el Número de esporas de HMA se analizaron los datos estadísticamente mediante el Análisis de medias y una Prueba t para muestras relacionadas. De forma similar se procedió para evaluar la influencia del número de submuestras por muestra compuesta sobre el Número de esporas.

Para determinar la influencia del porcentaje de Colonización y la masa seca radical sobre la producción de esporas se realizó un Análisis de Correlación para el cual se tomaron los datos del porcentaje de Colonización micorrízica promedio de ambas profundidades y la Masa seca total radical, con las determinaciones de esporas realizadas, a partir de utilizar 5 submuestras para conformar las muestras compuestas en la profundidad de 0-20 cm. Se utilizaron los porcentajes de Colonización micorrízica y Masa seca radical a los 90 días y la producción de esporas a los 120 días. Los resultados de porcentaje de Colonización micorrízica fueron transformados para el análisis estadístico mediante el empleo de la función $2\arcsen\sqrt{x}$, de acuerdo con Lerch, (1977).

La variabilidad del Número de esporas.g⁻¹ de sustrato a lo largo del cantero, se determinó mediante el establecimiento del porcentaje de variación de cada muestra con el valor promedio, así como el coeficiente de variación obtenido en cada uno de los canteros.

Para evaluar la variabilidad entre las partes de muestreo de cada cantero se obtuvieron las medias de esporas.g⁻¹ de sustrato en cada cuadrante, estas se compararon con los

valores de esporas.g⁻¹ promedio de cada cantero y se determinó su intervalo de confianza al 95% de probabilidad.

En todos los casos, para evaluar el efecto de los periodos de siembra sobre las diferentes variables se compararon las medias con sus intervalos de confianza al 95% respectivamente.

Todos los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS 11.5 para Windows.

3.2 Experimento 2. Influencia del periodo de secado y del molinado sobre el contenido de esporas del inoculante

Con el objetivo de evaluar la influencia del periodo de secado y del molinado sobre el contenido de esporas del inoculante se realizó este experimento.

En los canteros C5 y C6 se retiró el riego 15 días antes del cumplimiento del ciclo biológico de *Brachiaria decumbens* (120 días), coincidente con la posible fecha de extracción del inoculante producido, para propiciar la disminución del agua en el sustrato y por tanto estimular la esporulación micorrízica. Una semana después se efectuó el corte y extracción del follaje (parte aérea) para contribuir al aumento de la esporulación, como mecanismo de sobrevivencia del hongo al eliminarle el flujo de fotosintatos hacia el sistema radical. Finalmente se removió el sustrato de ambos canteros y se trasladó hasta el área de secado.



El material extendido en el cuartón fue homogenizado y se le extrajeron las raíces más gruesas. Los terrones que aún quedaron fueron fraccionados diariamente a medida que iban perdiendo humedad, continuando con la homogenización del mismo.

Se determinó el contenido de esporas de HMA realizando muestreos a los 5 y 15 días de encontrarse el producto en esta área. Para la toma de las muestras el material extendido dentro de los cuartones se subdividió en diez partes y en cada una se tomó una muestra compuesta por diez submuestras, con un total de 10 muestras de material por cuartón.

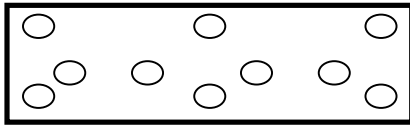


Figura 2. Diagrama representativo de la distribución espacial de las muestras compuestas por diez submuestras tomadas en el material extendido sobre el área de secado.

A los 15 días se determinó el porcentaje de humedad del material extendido en cada cuartón. El porcentaje de humedad se utilizó como indicador para trasladar el material a la fase de molinado, lo cual se realiza siempre que la humedad sea menor de 13,0 % (Paneque y Calaña, 2004).

El molinado del producto se realizó con un molino de martillo, modelo Vencedora Maqtron, a 3600 rpm y con un tamiz de dos mm. El producto molinado se envasó en sacos de 20 Kg y se verificó su calidad de producto terminado, tomando una muestra compuesta por 10 submuestras en uno de cada cinco sacos de 20 Kg, para determinar la cantidad de esporas.g⁻¹ de sustrato. Muestreando un total de 10 sacos por cuartón.

Este procedimiento se repitió en el mes de mayo del 2009 con los canteros B5 y B6, aunque el inoculante, por problemas técnicos relacionados con el funcionamiento del molino, permaneció en el área de secado por un periodo aproximado de 4 meses.

3.2.1 Determinación de la variabilidad del indicador esporas.g⁻¹ de inoculante en el producto terminado

Para determinar la variabilidad del indicador esporas.g⁻¹ en el producto terminado se procedió a muestrear producciones de 20 sacos continuos de producto (400 kg) por cantero, donde se tomó una muestra compuesta por 10 submuestras en cada saco.

El material molinado perteneció a los canteros A3 y A4 con fecha de siembra en agosto del 2008, los cuales fueron incluidos en el grupo de canteros estudiados en el experimento 3.

A partir de estas muestras se estudió la variabilidad de este indicador y el número mínimo de sacos que se deben muestrear para garantizar diferentes precisiones entre ± 2 y ± 5 esporas.g⁻¹ de inóculo, así como evaluar como se cumple el criterio de número mínimo de 20 esporas.g⁻¹ de inoculante como indicador de calidad en el proceso productivo de EcoMic®.

3.2.2 Análisis estadístico

Los resultados de la influencia del periodo de permanencia del producto bruto en el área de secado sobre el contenido de esporas y del molinado sobre el producto final, se procesaron mediante una Prueba t para muestras relacionadas.

El número mínimo de sacos que se deben muestrear para garantizar las diferentes precisiones en la determinación del número de esporas.g⁻¹ de inóculo se realizó mediante la fórmula del Tamaño de muestra.

$$n = (\sigma \cdot Z_{1-\alpha/2} / d)^2$$

n-Tamaño de muestra

σ -Desviación típica

$Z_{1-\alpha/2}$ – Percentil (es una constante =1.96)

d- La diferencia mínima de error a detectar

3.3 Experimento 3. Implementación del proceso de control y análisis de cada uno de los canteros de la planta de producción de EcoMic[®]

Para realizar la implementación del proceso de control y seguimiento de cada uno de los canteros de la planta de producción de EcoMic[®], se trabajó durante el periodo de siembra de febrero del 2008 a mayo del 2009, con un total de 9 canteros. En todos los casos se utilizó la cepa de HMA *Glomus hoi-like* así como las especies *Brachiaria decumbens* y *Brachiaria* híbrido cultivar mulato, como plantas hospederas.

Se realizaron evaluaciones del comportamiento micorrízico a cada uno de los canteros de producción (10) a los 60, 90 y 120 días. Para realizar la toma de muestras los mismos se subdividieron en tres partes de cinco metros cada una (Figura 1).

En cada cuadrante se tomaron muestras de sustrato compuestas por cinco submuestras, así como cinco plantas que presentaran un crecimiento promedio con todo su sistema radical, realizando un moteado de 5,0 cm alrededor del tallo para poder extraer adecuadamente las raíces. Se determinó el Número de esporas.g⁻¹ de sustrato y el porcentaje de Colonización micorrízica.

Los canteros evaluados se agruparon según la época de siembra (en cada mes escogido se sembraron dos canteros), quedando establecida una época poco lluviosa y de bajas temperaturas (siembra en noviembre) con cuatro canteros, una época

intermedia (siembra en mayo) con dos canteros y otra época lluviosa y de altas temperaturas (siembra en junio) con cuatro canteros (tabla 3), teniendo en cuenta la temperatura dentro de la época.

Tabla 3: Características de los canteros agrupados por épocas de siembra

Épocas de siembra	Canteros	Planta hospedera	Fecha de siembra
Época poco lluviosa y de bajas temperaturas	C5	<i>Brachiaria decumbens</i>	Enero 2008
	C6	<i>Brachiaria decumbens</i>	Enero 2008
	B1	<i>Brachiaria</i> híbrido cultivar mulato	Noviembre 2008
	B2	<i>Brachiaria</i> híbrido cultivar mulato	Noviembre 2008
Época intermedia	B3	<i>Brachiaria</i> híbrido cultivar mulato	Marzo 2009
	B4	<i>Brachiaria</i> híbrido cultivar mulato	Marzo 2009
Época lluviosa y de altas temperaturas	B5	<i>Brachiaria decumbens</i>	Junio 2008
	B6	<i>Brachiaria decumbens</i>	Junio 2008
	A3	<i>Brachiaria</i> híbrido cultivar mulato	Agosto 2008
	A4	<i>Brachiaria</i> híbrido cultivar mulato	Agosto 2008

También se realizó el análisis químico del sustrato de los diferentes canteros analizados en cada época (Tabla 4), independientemente de que todos se llenaron con el mismo tipo de sustrato, ya descrito y utilizado en el experimento 1. Se evaluó la influencia de las principales características químicas del sustrato en cada cantero y la temperatura del aire sobre los contenidos de esporas en el momento de la extracción de cada cantero (120 días).

Se tomaron las temperaturas del aire promedio existentes en todo el periodo del ciclo del cultivo para cada época de siembra.

Tabla 4: Características químicas del sustrato utilizado en cada cantero

Épocas	Canteros	Na	K	Ca	Mg	P	MO	pH
		(cmol. kg ⁻¹)				(ppm)	(%)	H ₂ O
Época poco lluviosa y de bajas temperaturas	C5	0,38	0,41	50,00	6,83	5,00	1,95	8,0
	C6	0,30	0,40	47,50	8,17	3,33	1,86	7,9
	B1	0,20	0,41	40,90	4,70	65,33	3,75	8,03
	B2	0,22	0,40	39,67	4,80	72,67	3,51	7,97
	x	0,27	0,40	44,58	6,08	36,63	2,81	7,98
Época intermedia	B3	0,13	0,30	37,13	3,36	35,22	1,32	7,27
	B4	0,12	0,28	36,52	4,44	60,56	3,01	7,24
	x	0,19	0,35	39,48	4,67	51,27	2,66	7,62
Época lluviosa y de altas temperaturas	B5	1,20	0,44	36,30	10,10	56,00	2,24	8,5
	B6	1,27	0,46	36,60	9,00	48,00	2,06	8,4
	A3	0,12	0,31	37,2	3,3	35,2	1,6	7,3
	A4	0,12	0,28	36,2	4,4	63,5	3,0	7,2
	x	0,80	0,41	38,03	8,08	44,63	2,42	8,15

La tabla 5 muestra las temperaturas de aire promedios mensuales desde noviembre del año 2008 hasta febrero del año 2009. Los otros valores de temperaturas se tomaron de la tabla 1 perteneciente al experimento 1.

Tabla 5: Temperaturas promedios mensuales de algunos meses del periodo experimental 2008-2009.

Meses	Año	Temperatura del aire promedio mensual
		(°C)
Octubre	2008	24,6
Noviembre	2008	21.3
Diciembre	2008	21.2
Enero	2009	19.8
Febrero	2009	19.4

3.3.1 Análisis estadístico

Para determinar la influencia de las épocas de siembra sobre la producción de esporas y los porcentajes de Colonización micorrízica, se realizó mediante la comparación de las medias y sus Intervalos de confianza al 95%.

Se efectuó también un Análisis de correlación entre las principales características químicas del sustrato, la temperatura del aire promedio y el número de esporas.

IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Experimento 1. Establecimiento de una metodología de muestreo y del periodo del año más adecuado para la producción de EcoMic®

4.1.1 Caracterización del sustrato

El sustrato en estudio pertenece al Agrupamiento de suelos Hidromórficos que se desarrollan en regiones o zonas llanas o depresionales, en los cuales predominan las condiciones de hidromorfia por la presencia de un manto freático cercano a la superficie (1,0 - 3,0 m de profundidad), presentando en ocasiones una capa impermeable (arcillosa) poco profunda. Estas condiciones de hidromorfia se advierten por sus propiedades gléyicas a menos de 50 cm de profundidad (Mederos, 2009).

La caracterización química del sustrato (Tabla 2) reflejó valores muy similares entre los dos canteros utilizados en la primera fecha de siembra (C5 y C6) y entre los dos utilizados en la segunda (B5 y B6).

De forma general, se presentaron valores de pH ligeramente alcalinos, altos contenidos de Ca y Mg y valores bajos de K. Los contenidos de materia orgánica fueron medios según Paneque (2002), aunque si se tiene en cuenta que el sustrato fue extraído a 2 m de profundidad los mismos pueden ser considerados altos. Los contenidos de P disponible y Na intercambiable representaron los indicadores con mayor variación, entre las dos fechas de siembra.

4.1.2 Producción de Masa seca aérea y radical de *B. decumbens* inoculada en ambos periodos

Al analizar los valores de las variables Masa seca aérea y radical, en los dos periodos o épocas de muestreo, pudo apreciarse, de manera general, un progresivo incremento de ambas variables durante todo el ciclo del cultivo (Figuras 3A, B, C y D).

En el caso de la Masa seca aérea, en el periodo de enero a mayo (Figura 3A), se observó, hasta los 90 días, un crecimiento paulatino de la variable y con posterioridad, en el intervalo enmarcado entre los 90 y los 120 días, un incremento exponencial que alcanzó valores máximos de $1,81 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$, estos valores fueron significativamente superiores a los encontrados en el resto de los momentos de muestreo.

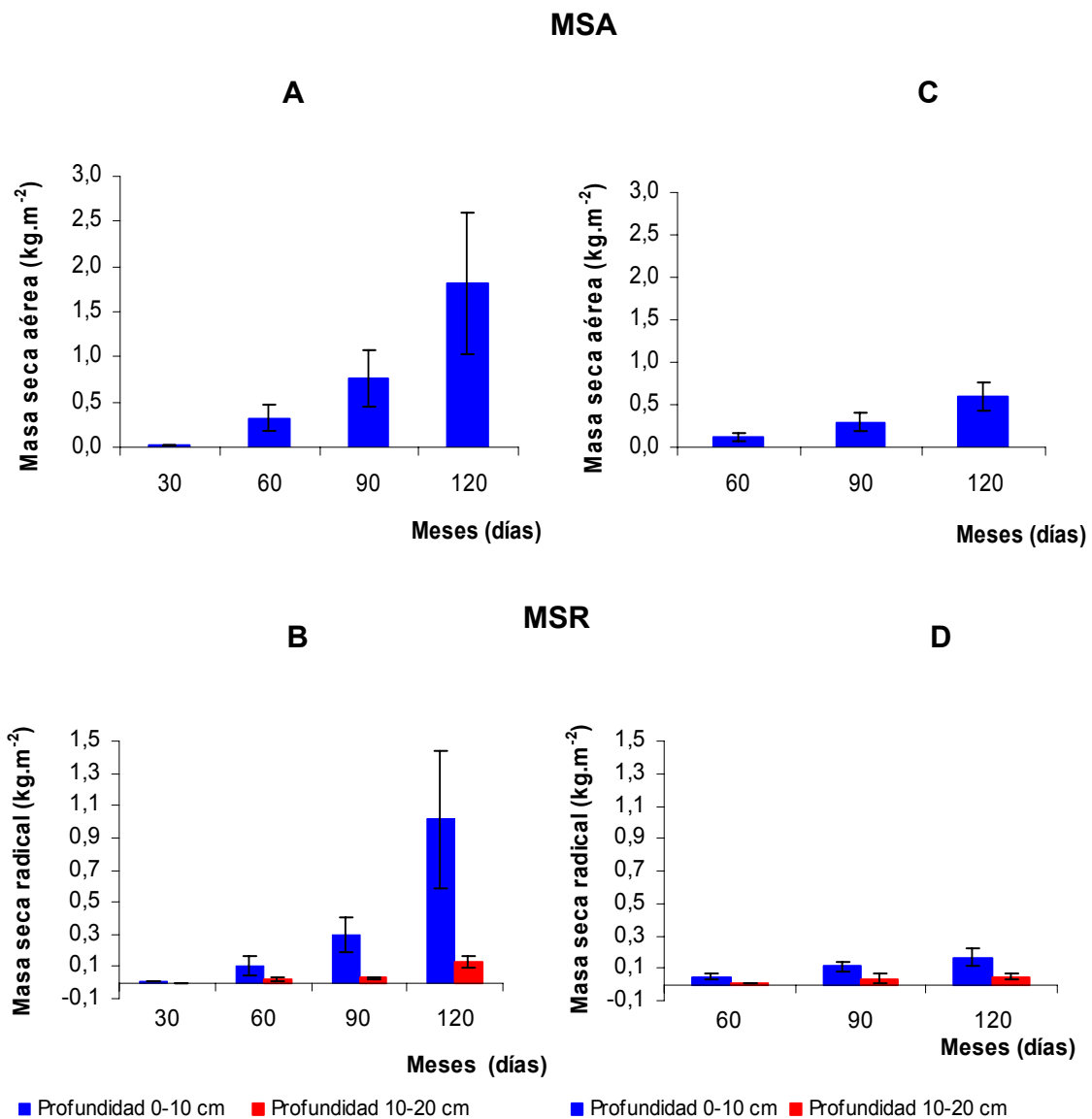


Figura 3: Desarrollo vegetativo de *Brachiaria decumbens* inoculada con *Glomus hoi-like* en los dos periodos de crecimiento. Periodo de enero a mayo, (A) Masa seca aérea (MSA) y (B) Masa seca radical (MSR) en dos profundidades. Periodo de junio a octubre, (C) Masa seca aérea y (D) Masa seca radical en dos profundidades.

Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0,05$).

En el periodo de junio a octubre (Figura 3C), a partir de los 90 días, se observó un incremento significativo de la Masa seca aérea que fue significativamente superior a los 120 días y alcanzó valores máximos de $0,58 \text{ kg.m}^{-2}$.

La Masa seca radical en la profundidad de 0-10 cm (Figura 3B) mostró un crecimiento progresivo hasta los 90 días y a continuación se desarrolló considerablemente hasta alcanzar, a los 120 días, valores de $1,01 \text{ kg.m}^{-2}$ en el periodo de enero a mayo y en el periodo de junio a octubre (Figura 3D) los valores máximos solo alcanzaron los $0,16 \text{ kg.m}^{-2}$.

En la profundidad de 10-20 cm (Figura 3B y Figura 3D) ocurrió un incremento lento hasta los 120 días. Los valores obtenidos a los 120 días fueron los mayores en cualquier época, aunque no se alcanzaron diferencias significativas en la Masa seca radical entre los momentos de muestreo.

Analizando los valores de las medias y los Intervalos de confianza que se presentan en las figuras (3A, B, C y D) se pueden distinguir diferencias significativas entre los valores de Masas secas aéreas y radicales en ambas épocas, obteniéndose mayores índices de ambas variables en el periodo de enero a mayo.

Teniendo en cuenta que la *Brachiaria* es un cultivo resistente a la sequía (Argel y col. 2005), pero no tolera las condiciones de encharcamiento (Medero, 2009) y que en el periodo de junio a octubre no se realizó muestreo a los 30 días por las abundantes precipitaciones existentes en ese momento. Esta pudo ser la causa de que se retardara el crecimiento del cultivo debido a la falta de oxígeno en el sistema radical, que afectó la respiración del mismo y provocó que se mostraran los menores valores de Masa seca aérea encontrados en este periodo.

Estos resultados difieren de los obtenidos por González y col. (2008) quienes en campo abierto informaron valores superiores en el rendimiento de Masa seca en la época lluviosa con $20 \text{ t de masa seca. ha}^{-1}$ y menores en la época de poca lluviosa con acumulados de $5 \text{ t de masa seca. ha}^{-1}$.

En ambos periodos, la Masa seca radical en la profundidad de 0-10 cm mostró valores superiores a los obtenidos en la profundidad de 10-20 cm. Precisamente, es en la parte superior del sistema radical de *Braquiaria* donde se concentran las raíces más gruesas, independientemente de que este cultivo presenta un sistema radical muy profuso, en sentido general.

Los resultados relacionados con la Masa seca radical coinciden con los informados por Ramírez y col. (2009) quienes afirman que más del 80% de las raíces se encuentran en

las capas superficiales, en especial, en los primeros 10 cm de profundidad. Paneque y col. (2006) obtuvo resultados similares en estudios realizados en canteros multiplicadores de HMA.

Consecuentemente, Mederos (2009) encontró, en un experimento desarrollado en cajuelas plásticas utilizando *Braquiaria* inoculada con la misma cepa, entre un 64 y 73% de las raíces en los primeros 10 cm de profundidad y el resto en la profundidad de 10 - 20 cm.

Contenido de macronutrientes en la biomasa aérea de *B. decumbens*

Al analizar los contenidos de macronutrientes (N, P y K) en la biomasa aérea, correspondientes a la época de enero-mayo (Figura 4), se puede observar una disminución rápida a partir de la primera evaluación realizada a los 30 días después de la siembra. Estos valores se mantuvieron muy similares en el resto de las evaluaciones posteriores, manifestándose el mismo comportamiento para cada uno de los nutrientes analizados.

Este comportamiento puede encontrarse asociado al rápido crecimiento en la Masa aérea encontrada en este periodo que propicia el consumo de nutrientes. También coincidió con lo planteado por Azcón Bieto y Talón (2001) quienes plantean que a medida que las plantas van envejeciendo ocurre una disminución del contenido mineral en la masa seca con excepción de Ca y en algunas ocasiones B y Fe.

Según estos mismos autores, esta tendencia puede ser provocada, principalmente, por el aumento relativo del porcentaje de Masa seca del material estructural (pared celular y lignina) y de los compuestos de reserva como el almidón. También plantean que puede estar influenciado por la edad fisiológica y la parte muestreada de la planta, así como por el aporte de nutrientes. En los resultados del presente experimento la dilución de los nutrientes en la biomasa fue una consecuencia, principalmente, de la propia fisiología del cultivo.

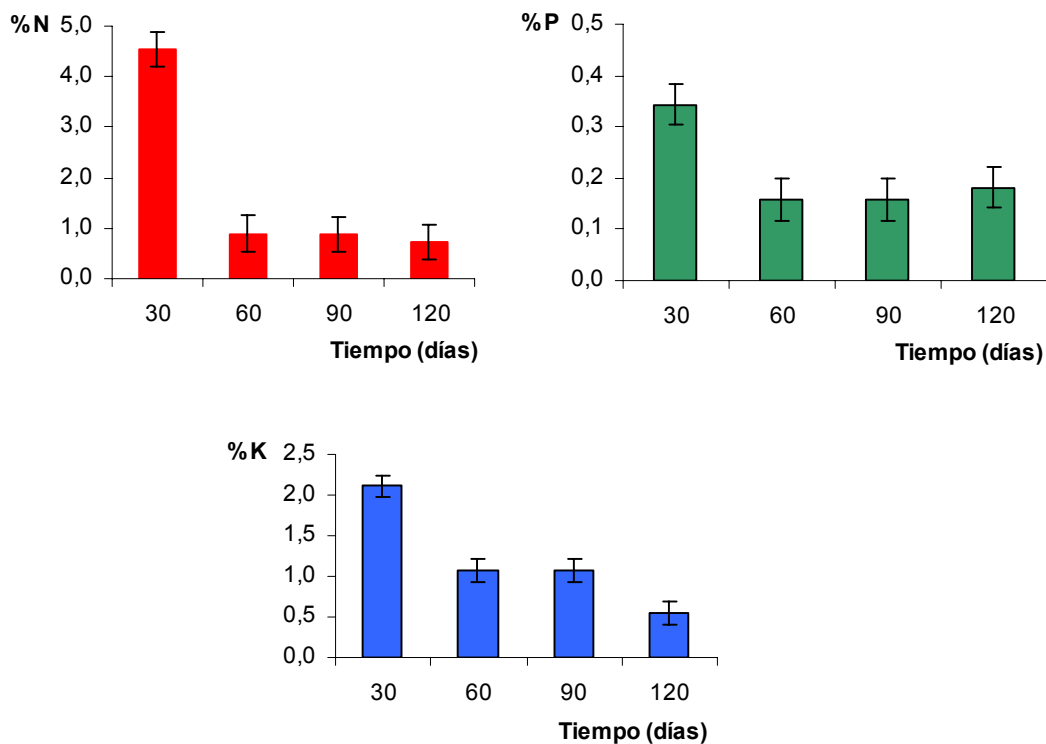


Figura 4: Dinámica del contenido de macronutrientes en la biomasa aérea de *B. decumbens* inoculada con *Glomus hoi-like* en el periodo correspondiente a enero-mayo. Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0,05$).

En la figura 5 se muestran los contenidos de estos macronutrientes pero en el periodo correspondiente a junio-octubre. Es de señalar que en esta época los muestreos comenzaron a los 60 días y no existe información de los contenidos de estos nutrientes a los 30 días.

La dinámica de los contenidos de nutrientes en esta época fue diferente a la anterior, presentando un crecimiento de los contenidos hasta los 90 días, con una posterior estabilización hasta los 120 días.

En este caso los contenidos de N y K se incrementaron significativamente a partir de los 60 días, manteniendo valores constantes entre los 90 y los 120 días, que coinciden con los encontrados en las plantas sembradas en el periodo enero-mayo. Los contenidos de P si bien no presentaron diferencias significativas entre los diferentes

momentos de muestreo, si fueron superiores a los encontrados a partir de los 60 días en el periodo antes descrito.

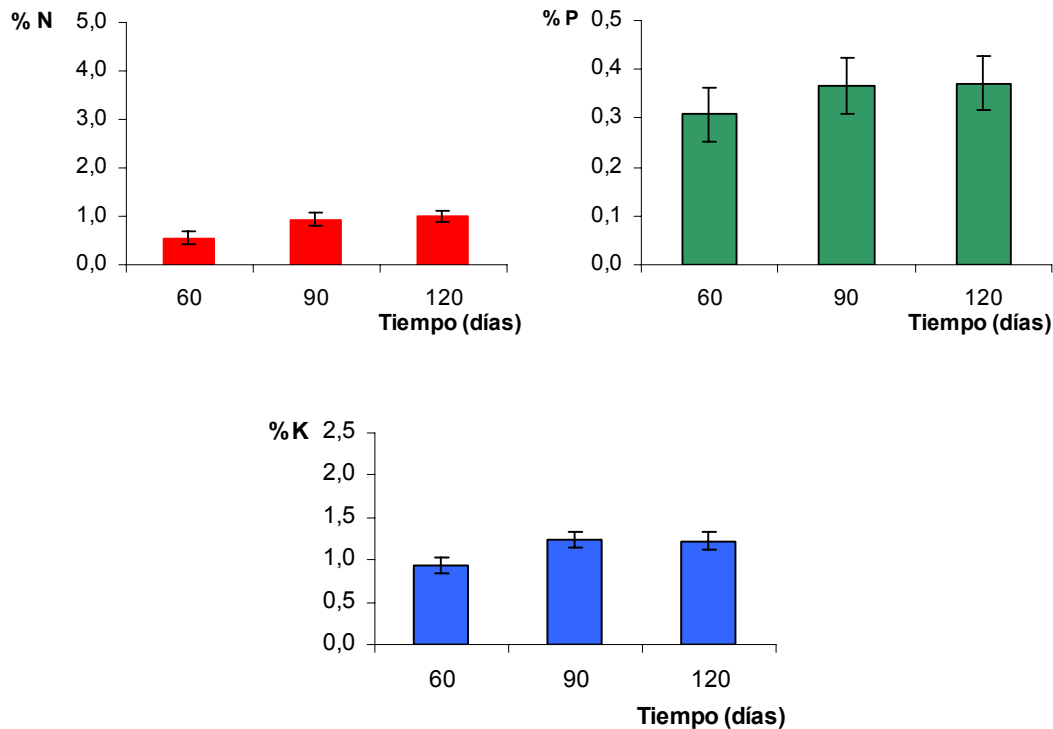


Figura 5: Dinámica del contenido de macronutrientes en la biomasa aérea de *B. decumbens* inoculada con *Glomus hoi-like* en el período correspondiente a junio-octubre. Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0,05$).

La comparación del incremento de la Masa seca entre los dos periodos (Figura 3A y C) sugiere un retardo en el desarrollo vegetativo durante el periodo junio-octubre, lo cual parece estar en correspondencia con la dinámica de los contenidos nutricionales en la biomasa aérea, que no presentó la típica disminución con la edad del cultivo, apreciada en el periodo enero-mayo a partir de los 30 días.

La dinámica obtenida en los contenidos de N y K en el periodo junio-octubre estuvo asociada con el retardo del crecimiento encontrado anteriormente en este mismo periodo.

El sustrato utilizado en el periodo de junio a octubre presentó contenidos de fósforo disponible superiores al utilizado en el periodo enero-mayo (Tabla 2), con

independencia de ser el mismo tipo de material arcilloso. Esta situación parece estar en correspondencia con los contenidos superiores de P encontrados en la biomasa aérea de *Brachiaria* en el periodo de junio-octubre con respecto al de enero-mayo según la comparación de las respectivas medias con sus intervalos de confianza; sin embargo esto no explica el cambio en el patrón de la dinámica de los contenidos de N y K.

Por otra parte, Azcón y col. (2003) encontraron que en plantas micorrizadas de lechuga, el suministro de altos niveles de N y P disminuyó el contenido de nutrientes absorbidos por unidad de masa radical; sin embargo, no parece ser esta la situación presentada en el periodo junio-octubre y por tanto se hace necesario evaluar la dinámica del porcentaje de Colonización y de producción de esporas para tratar de explicar este comportamiento.

4.1.3 Comportamiento de las variables micorrízicas durante el ciclo del cultivo

Porcentajes de Colonización y de Densidad visual

En el periodo enero-mayo los porcentajes de Colonización micorrízica se incrementaron paulatinamente desde un 40% a los 30 días, hasta alcanzar cerca de 61% a los 90 días con valores significativamente superiores a los muestreos de 30 y 60 días, manteniendo valores similares hasta los 120 días (Figura 6A).

Esta conducta fue similar a la encontrada por Mederos, (2009) quien trabajó en condiciones semicontroladas con el mismo hospedero y cepa de HMA; no obstante, en dichos resultados el porcentaje de colonización a los 120 días decayó notablemente asociado con la eliminación del riego para estimular la esporulación de los HMA, al provocar el cese de los procesos de absorción y por ende la traslocación de fotosintatos al sistema radical. En este experimento los canteros se encontraban situados a cielo abierto y las precipitaciones comenzaron en el mes de mayo y aunque el riego se dejó de efectuar, se mantuvo una humedad alta en los canteros producto de las lluvias y las condiciones fueron propicias para un funcionamiento micorrízico estable de *Brachiaria decumbens* a los 120 días.

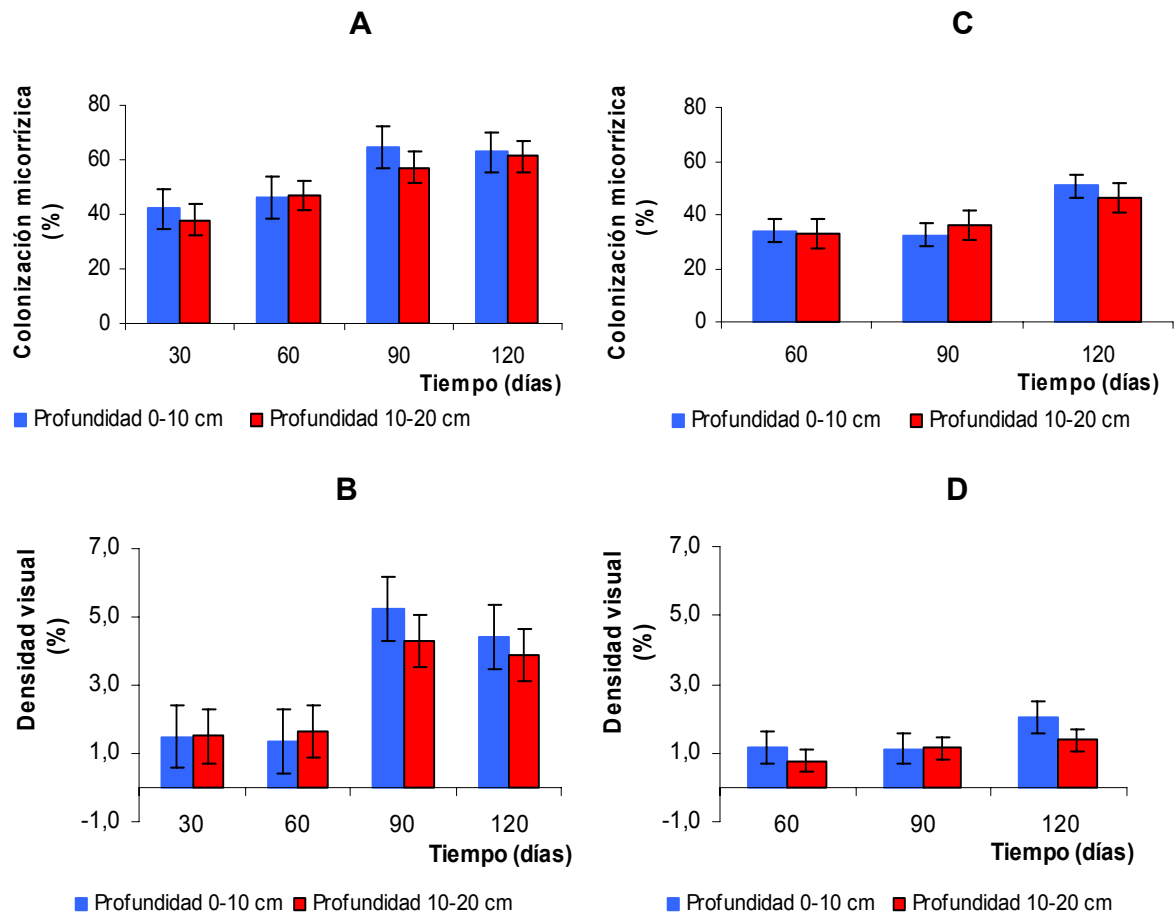


Figura 6: Dinámica de porcentajes de Colonización micorrízica y de Densidad visual en raíces de *B. decumbens* evaluadas en dos profundidades. Periodo enero-mayo (A) porcentaje de Colonización micorrízica y (B) de Densidad visual. Periodo junio-octubre (C) porcentaje de Colonización micorrízica y (D) de Densidad visual. Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0,05$).

En la época de junio a octubre (Figura 6C) correspondiente al periodo de lluvia, los porcentajes de colonización micorrízica no presentaron diferencias estadísticas hasta los 90 días y los valores no sobrepasaron el 38%. A los 120 días se presentaron incrementos significativos de los valores de la variable con respecto a las anteriores fechas de muestreo, pero sin sobrepasar el 50% de colonización micorrízica.

Al analizar los valores obtenidos de esta variable se puede explicar por la de un crecimiento típico microbiano definido por tres fases, que en el caso de los HMA se

describen de la siguiente manera: primero, una fase de adaptación donde en el caso de los HMA coincide con la fase parasítica y que en esta dinámica no se observó y debe por tanto presentarse en etapas iniciales antes de los 30 días. Luego una fase de crecimiento exponencial en la cual comienza la producción de arbusculos y el intercambio de nutrimentos y finalmente una fase estacionaria en la que se mantienen constantes los porcentajes de colonización hasta el final del ciclo vegetativo; después cesa el envío de fotosintatos al sistema radical y los HMA pasan a una fase de esporulación (Daniels y Trappe, 1980 y Fernández y col., 2006).

Los valores alcanzados en los porcentajes de colonización fueron indicativos de una micorrización adecuada de *B. decumbens*, al compararla con los resultados obtenidos por González y col. (2006) en condiciones de campo, en el mismo cultivo e inoculando con igual cepa, en este trabajo se obtuvieron porcentajes de colonización del orden del 60%.

Este estimador del establecimiento micorrízico en las plantas mostró diferencias entre las dos épocas de crecimiento de los canteros, con valores mayores de porcentajes de Colonización en los meses de enero a mayo.

El aumento de la temperatura puede propiciar que el metabolismo de las plantas se incremente (Abbot y Robson, 1991 y García y Mendoza, 2008), lo que puede facilitar el establecimiento y la funcionalidad de los endófitos, debido principalmente, a la disponibilidad de compuestos ricos en carbono (glucosa y fructosa) requeridos por los HMA (Bago y col. 2000b).

Por otra parte, en este periodo (junio-octubre) también se encontraron los mayores contenidos de fósforo en el análisis químico inicial realizado al sustrato, a pesar de haber empleado sustratos correspondientes a la misma fecha y área de extracción, en ambas épocas se deja clara la variabilidad existente en este material. En la literatura pueden encontrarse numerosos autores que se refieren a la existencia de una relación inversa entre la disponibilidad de P en el suelo y el porcentaje de Colonización micorrízica (Amijee y col., 1989; Mäder y col., 2000; Friberg, 2001; Curtis y Swift, 2004; Ortas y Akpınar, 2006; Aguilera y col., 2007; Smith y Read, 2008). Precisamente los valores de porcentaje de Colonización micorrízica encontrados en junio-octubre fueron

inferiores a los del periodo enero-mayo, lo cual puede ser explicado por alta disponibilidad de P en el suelo (Ruiz, 2001).

También es conocido que el exceso de agua en el suelo afecta la respiración radicular por lo que debería pensarse que también afecte la de su cosimbionte micorrízico, no obstante, según Augé (2004), en esta simbiosis las relaciones con el agua y las propiedades de retención de humedad de suelo son fenómenos pocos conocidos.

El porcentaje de Densidad visual es un estimador de la intensidad de la Colonización en el interior del sistema radical. El mismo reflejó un comportamiento similar al del porcentaje de Colonización en ambos periodos evaluados (Figura 6B y D). En el periodo de enero a mayo esta variable mostró un crecimiento paulatino hasta los 60 días y a partir de los 90 se observó un incremento exponencial que se mantuvo constante hasta los 120 días con valores de hasta 4.7%. Estos valores fueron superiores a los alcanzados por González y col. (2008), quien obtuvo 3.28% de Densidad visual en *B. decumbens* inoculada con *Glomus hoi-like*.

La Densidad visual en el periodo de junio a octubre (Figura 6D) mostró un comportamiento similar al del porcentaje de Colonización micorrízica (Figura 6C), en el cual se obtuvieron diferencias significativas a los 120 días.

Es interesante destacar que los porcentajes de Colonización micorrízica y de densidad visual no mostraron diferencias significativas entre las profundidades estudiadas para cada uno de los momentos de muestreo. El hecho de que las plantas micorrizadas mantuvieron un porcentaje de Colonización micorrízica y Densidad visual relativamente similares con independencia de la profundidad del muestreo (0-20 cm), podría estar relacionado con que la micorrización es la respuesta de la planta a la inoculación con hongos micorrízicos y esta se expresa en todo el sistema radical con la misma intensidad.

Estos resultados coinciden con los informados por Montilla (2002), en pastos, quien tampoco obtuvo diferencias significativas entre los porcentajes de Colonización micorrízica en las profundidades de 0-10 y 10-20 cm.

Resultados similares fueron propuestos por Covacevich y col. (2006), en trigo (*Triticum aestivum*) y Mederos (2009), en *Brachiaria decumbens* inoculada con la misma cepa de

HMA, los cuales tampoco encontraron afectación de la colonización micorrízica por la profundidad de muestreo.

Los resultados obtenidos se corroboran con los estudios realizados por Abbot y Robson, (1991) y Peña Venegas y col. (2007) quienes encontraron que la mayoría de las esporas y la colonización micorrízica arbuscular se presentan en los primeros 20 cm del suelo y van disminuyendo de forma exponencial con la profundidad. De forma general se mostró un comportamiento similar del porcentaje de Colonización micorrízica en canteros multiplicadores y en campo abierto según los autores anteriormente referidos, cuando se trabajó en ambos casos hasta los 20 cm de profundidad.

Es de destacar que los diferentes patrones de crecimiento de *Brachiaria* obtenidos en cada periodo de siembra, se reflejaron en la dinámica de los contenidos de nutrientes y en los porcentajes de colonización micorrízica, no obstante no están claras las causas de esta conducta.

Número de esporas en la fase de cantero

Primeramente se definirá la importancia del número de submuestras por muestra compuesta y después la profundidad, para a partir de ese momento simplificar la información y estudiar la dinámica y el efecto del periodo de crecimiento sobre la variable número de esporas.g⁻¹ de sustrato.

Influencia del número de submuestras en la determinación del Número de esporas

La tabla 6 muestra la influencia del número de submuestras por muestra compuesta sobre el Número de esporas.g⁻¹ de sustrato durante el periodo de enero a mayo, en todos los momentos de muestreo y en las dos profundidades estudiadas, comparadas como muestras relacionadas.

Los valores absolutos de los análisis realizados en las tablas 6 y 7 se encuentran en los anexos.

La influencia del número de submuestras por muestra compuesta, en ambas profundidades, sobre el Número de esporas en el periodo de enero–mayo, no mostró diferencias estadísticas a los 30 días, por lo que se puede inferir que en ese periodo de desarrollo del cultivo es igual que se tome una muestra compuesta por tres o cinco

submuestras. Esto pudiera deberse a que en las etapas iniciales comienza la producción de nuevas esporas y los contenidos de estas en el sustrato son bajos, lo cual hace que no se presenten diferencias significativas entre el número de submuestras, por lo que se recomienda no muestrear a los 30 días.

Tabla 6: Influencia del número de submuestras por muestra compuesta y momento de muestreo en la determinación del Número de esporas.g⁻¹ de suelo. Periodo enero-mayo.

Identificación	Días de muestreo	Profundidad (cm)	t
relación entre 5 y 3 submuestras	30 días	0-10	0,434
		10-20	-0,526
	60 días	0-10	2,842*
		10-20	3,226*
	90 días	0-10	4,316*
		10-20	3,491*
	120 días	0-10	1,545
		10-20	0,535

La prueba t para muestras pareadas se realizó con un intervalo de confianza de 95 %.

Los hongos micorrízicos presentan un modelo de crecimiento caracterizado por una colonización intensa y acelerada del sistema radical en los primeros días después de la penetración a las raíces, produciendo estructuras de intercambio de nutrientes y de almacén como arbusculos, vesículas y células auxiliares; posteriormente y en conjunto con el crecimiento y dispersión del micelio externo, comienzan a desarrollar las estructuras reproductoras, en este caso las esporas, para asegurar su supervivencia y distribución.

Numerosos autores han caracterizado el comportamiento de la simbiosis micorrízica arbuscular en condiciones *in vitro* para variadas especies de diferentes géneros, así como la capacidad productora de esporas, inherente a cada especie (Strullu y col., 1997; Bago y col., 2000a; Bi y col., 2004; y de la Providencia y col., 2005).

A los 60 y 90 días se observaron diferencias significativas entre el número de submuestras en las profundidades estudiadas, debido entre otros aspectos a que en este periodo el Número de esporas se incrementó paulatinamente, además de que la distribución espacial de las mismas no es homogénea y su producción va dirigiéndose a diferentes puntos en la amplia red de micelio externo.

Las estructuras similares a arbusculos o BAS (branching absorbing structures) descritas por Bago y col. (2000a) relacionadas con la absorción de nutrientes, están frecuentemente asociadas a numerosas esporas, contribuyendo a establecer un patrón diferenciado de distribución de las mismas dentro de la colonia.

A los 120 días no se mostraron diferencias significativas, aunque la muestra compuesta por 5 submuestras presentó el mayor valor de contenido de esporas, esta conducta pudo ser consecuencia de un aumento de la variabilidad espacial de las mismas.

Este comportamiento ha sido poco tratado en la literatura y puede estar influenciado por diferentes factores que actúan sobre la esporulación, los cuales producen una variabilidad en cuanto al número de esporas en un espacio dado y en su distribución en la colonia. No obstante, en numerosas investigaciones realizadas en cultivos *in vitro* de HMA en raíces transformadas, sobre el desarrollo de la asociación micorrízica, se han podido observar con detalle diferentes aspectos, que no permiten las condiciones de experimentación *in vivo*, relacionados con el patrón de distribución del micelio y la falta de homogeneidad en cuanto a la producción de esporas (Fortin y col., 2002).

En los casos donde se mostraron diferencias estadísticas, la muestra compuesta por cinco submuestras mostró siempre mayores valores de contenidos de esporas, independientemente de que esta muestra compuesta es más representativa del área muestreada. Estos resultados contribuyen a optimizar una metodología de muestreo para un mejor control de calidad del funcionamiento micorrízico.

La tabla 7 muestra la influencia del número de submuestras por muestras compuestas sobre el Número de esporas en todos los momentos de muestreo y en ambas profundidades en el período de junio-octubre.

La relación del Número de esporas en las muestras compuestas por uno, tres y cinco submuestras en los diferentes momentos de muestreo y en ambas profundidades en el periodo de junio-octubre, mostró diferencias significativas entre las submuestras en todos los momentos de muestreos. A los 60 días se mostraron diferencias estadísticas entre las combinaciones de las muestras compuestas por una, tres y cinco submuestras en las dos profundidades estudiadas, excepto la relación de la submuestra cinco con la tres que no mostró diferencias significativas en la profundidad de 10-20 cm.

Tabla 7: Influencia del número de submuestras por muestra compuesta y momento de muestreo en la determinación del Número de esporas.g⁻¹ de sustrato. Periodo junio - octubre.

Días de muestreo	Identificación	Profundidad (cm)	t
60 días	relación entre 5 y 1 submuestras	0-10	5,846*
		10-20	-2,759*
	relación entre 5 y 3 submuestras	0-10	2,740*
		10-20	-1,084
	relación entre 3 y 1 submuestras	0-10	3,127*
		10-20	5,669*
90 días	relación entre 5 y 1 submuestras	0-10	5,023*
		10-20	2,416
	relación entre 5 y 3 submuestras	0-10	3,056*
		10-20	1,034
	relación entre 3 y 1 submuestras	0-10	3,699*
		10-20	0,775
120 días	relación entre 5 y 1 submuestras	0-10	5,953*
		10-20	10,900
	relación entre 5 y 3 submuestras	0-10	3,940*
		10-20	1,728
	relación entre 3 y 1 submuestras	0-10	5,097*
		10-20	3,789*

La prueba t para muestras pareadas se realizó con un intervalo de confianza de 95 %.

A los 90 y 120 días se encontraron diferencias entre las muestras compuestas por una, tres y cinco submuestras, en este caso solo se expresaron los efectos significativos en los primeros 10 cm de profundidad y únicamente en la relación de la submuestra tres con la uno se mostró diferencias estadísticas en la profundidad de 10-20 cm. Quedando claro que independientemente de que el empleo de 5 submuestras por muestra compuesta permitió detectar mayores contenidos de esporas que cuando se utilizaron una y tres submuestras por muestra compuesta, ésta muestra fue más representativa del área muestreada.

De forma general en las dos épocas de crecimiento se encontró que los mayores valores de Número de esporas estuvieron asociados con el mayor número de submuestras por muestra compuesta. La influencia del número de submuestras por muestra compuesta fue evidente en los momentos de mayor producción de esporas coincidentes con el último momento de muestreo y se explica con que los mayores

contenidos de esporas permiten que se manifiesten significativamente las diferencias entre las muestras.

Los resultados muestran la importancia de definir un método de muestreo que tenga en cuenta la propia variabilidad de los indicadores del comportamiento de la simbiosis y sobre todo de la producción de esporas, por poseer esta una mayor variabilidad espacial que el porcentaje de Colonización. Téngase en cuenta además que el Número de esporas es el indicador más importante en la valoración de la calidad del inoculante micorrízico, a partir de los métodos de determinación que se ejecutan en el laboratorio de HMA del INCA.

Influencia de la profundidad sobre el Número de esporas

Una vez definido que el método de muestreo debe ser el de 5 submuestras por muestra compuesta, se pasará a establecer la influencia de la profundidad sobre el Número de esporas, pero utilizando solo los datos correspondientes a 5 submuestras. Los datos originales de los análisis realizados en las tablas 8 y 9 se encuentran en los anexos.

En el periodo de enero-mayo (Tabla 8) si bien los contenidos de esporas de 0-10 cm de profundidad, siempre fueron mayores que los de 10-20 cm, no se mostró diferencias significativas al 95% en ninguno de los momentos de muestreo, posiblemente asociado a la variabilidad encontrada en este indicador de calidad.

Tabla 8: Análisis estadístico de esporas.g⁻¹ de sustrato para muestras relacionadas en las dos profundidades y para la muestra compuesta por 5 submuestras. Periodo enero-mayo.

Identificación	Días de muestreo	t
	30	1,28
Relación profundidad 0-10 cm y 10-20 cm	60	0,50
	90	1,37
	120	1,98

La prueba t para muestras pareadas se realizó con un intervalo de confianza de 95 %.

En el periodo de junio-octubre (Tabla 9) se alcanzaron en todos los momentos de muestreo diferencias significativas, de forma tal que el Número de esporas en la profundidad de 0-10 cm fue siempre mayor que de 10-20 cm.

Tabla 9: Análisis estadístico de esporas.g⁻¹ de sustrato para muestras relacionadas en las dos profundidades y para la muestra compuesta por 5 submuestras. Periodo junio-octubre.

Identificación	Días de muestreo	t
Relación profundidad 0-10 cm y 10-20 cm	60	4,50*
	90	11,34*
	120	7,36*

La prueba t para muestras pareadas se realizó con un intervalo de confianza de 95 %.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pattinsib y col. (1990), Seguel y col. (2008) y Lovera Cuenca (2007), quienes plantearon que las principales fuentes de inóculo de HMA están ampliamente distribuidas en los 10 cm superficiales del suelo. Castillo y col. (2006) también plantean que la cantidad de propágulos de HMA en el suelo disminuye con la profundidad.

En el periodo de junio- octubre (Tabla 9) se presentó un incremento creciente de las diferencias entre el Número de esporas con la profundidad y con la edad de la planta.

A partir de estos resultados teniendo en cuenta la variabilidad del número de esporas y la influencia de la profundidad en la determinación de esta variable, se recomienda tomar la muestra compuesta en toda la profundidad (0-20 cm).

El análisis integral del número de submuestras por muestra compuesta y la influencia de la profundidad sobre el Número de esporas, conlleva a que el método de muestreo para determinar el contenido de esporas en cantero se debe realizar tomando 5 submuestras de 0-20 cm por muestra compuesta para canteros de 20 cm de profundidad.

Dinámica del contenido de esporas en los dos ciclos de crecimiento

Una vez definida la metodología de muestreo para determinar el Número de esporas.g⁻¹ de suelo basada en la toma de 5 submuestras de 0-20 cm por muestra compuesta, se procedió a estudiar la dinámica de producción de esporas en los dos periodos de crecimiento. Para esto se estimaron los contenidos de esporas en la profundidad total de 0-20 cm para muestras formadas por 5 submuestras en los diferentes momentos de muestreo.

En ambos periodos (Figura 7A y B) el Número de esporas obtenido mostró un incremento en el tiempo, lo cual se encuentra asociado con el propio desarrollo de la asociación micorrízica y con el completamiento del ciclo de vida del hongo.

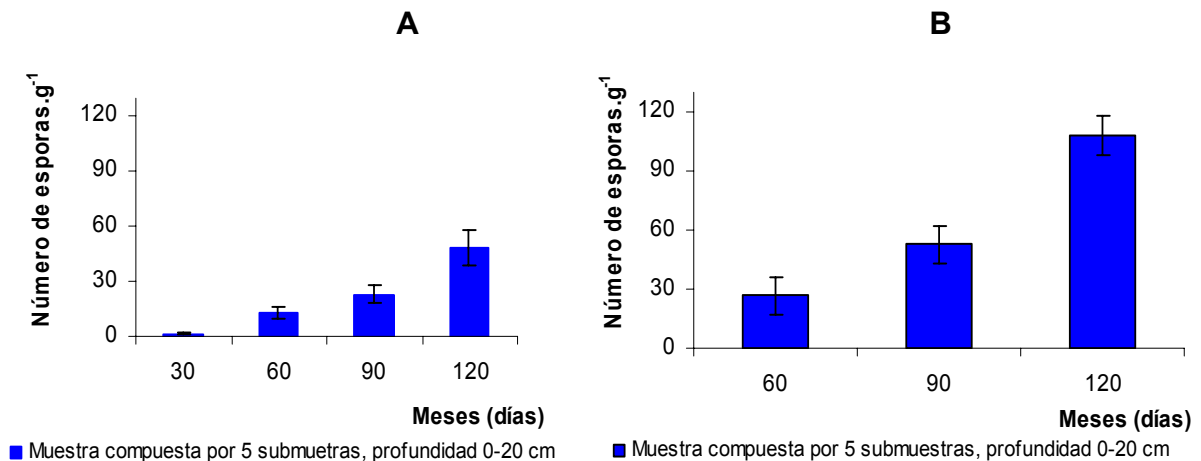


Figura 7: Dinámica del Número de esporas de la muestra compuesta por 5 submuestras en toda la profundidad en los meses de enero a mayo (A) y de junio a octubre (B). Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0,05$).

En la figura 7A se muestra la dinámica del Número de esporas del periodo de crecimiento enero-mayo, el incremento de este indicador ocurrió lentamente hasta los 60 días con la producción de nuevas esporas. Posteriormente se refleja otro incremento a los 90 días y a los 120 días se alcanzan los mayores valores con 39 esporas.g⁻¹ de sustrato y estos fueron significativamente diferentes al resto de los momentos de muestreo.

Este número de esporas supera la cantidad de propágulos mínimos requeridos por el inóculo comercial EcoMic[®] para tener una adecuada calidad, que se corresponde con 15-20 esporas.g⁻¹ de sustrato en cantero terminado.

En el periodo de enero- mayo (Figura 7A) la dinámica dejó claro que es importante llevar el cantero hasta los 120 días, para asegurar el cumplimiento del contenido de esporas mínimo requerido, ya que a los 90 días apenas estos llegaron a las 20 esporas.g⁻¹.

En el periodo de junio-octubre (Figura 7B) se encontró de forma similar un incremento entre los diferentes momentos de muestreos, pero en este caso se alcanzaron diferencias significativas entre los tres momentos de muestreo. Los valores alcanzados a los 120 días fueron de 108 esporas.g⁻¹ de sustrato.

Si bien en este periodo a los 60 días se obtuvieron 30 esporas.g⁻¹ de sustrato, los altos valores alcanzados a los 120 días sugieren la importancia de este momento para obtener un magnifico inoculante y puede permitir disminuir dosis de aplicaciones para cultivos con altos requerimientos de inoculante (Rivera y col., 2009).

Fernández (2003b) planteó que en condiciones de producción de inoculantes micorrízicos utilizando plantas trampas, los valores de esporas pueden duplicarse una vez muerto el tejido vegetal ya que ocurre una translocación de nutrientes desde las raíces hacia las hifas y éstas a su vez continúan formando nuevas esporas.

Teniendo en cuenta los intervalos de confianza al comparar los dos periodos de muestreo estudiados se encontró que los valores de Número de esporas fueron estadísticamente superiores en el periodo junio-octubre con relación a enero-mayo.

Según Titus y col. (2002), las fluctuaciones en el número de esporas de hongos micorrízicos arbusculares podrían relacionarse con factores ambientales, estacionales y del suelo que afectan a la esporulación del hongo, además del ciclo de vida de la planta huésped y de la fisiología propia de la simbiosis.

Relacionado con la humedad, los datos en la literatura son contradictorios, ya que no se ha observado una conducta clara que relacione la producción de esporas de HMA con los niveles de humedad del suelo o las inundaciones (Carvalho y col., 2001; Entry y col., 2002).

Estos resultados concuerdan con lo planteado por Lovera y Cuenca (2007), presentaron resultados relacionados con el desarrollo de la densidad de esporas en condiciones nativas y si bien muestran valores bajos en la época lluviosa (julio), presentan un número de esporas aún menor en época poco lluviosa (enero), esto podría estar asociado con la existencia de dos máximos de esporulación, que se vieron reflejados en el bioensayo como una mayor actividad micorrízica.

Camargo y Esperón (2005) también afirman que el número total de esporas de HMA en el suelo tiende a ser mayor durante la estación de lluvias y menor durante la estación

de seca. De forma similar González y col. (2008) encontraron mayores contenidos de esporas en la época lluviosa que en la época de seca, en plantaciones de *Brachiaria Mulato* inoculadas con cepas eficientes. Independientemente de que el presente trabajo se realizó en producción de inóculo micorrízico y los autores mencionados anteriormente trabajaron en cultivos inoculados con cepas de HMA, de forma general se obtuvo en todos los casos un comportamiento del número de esporas mayor en el periodo lluvioso y menor en el periodo poco lluvioso.

En un estudio realizado en un cafetal joven, Fernández y col. (1990) informaron cambios en el número de esporas a lo largo de las estaciones, que variaron marcadamente con diferentes especies de hongos micorrízicos arbusculares.

Correlación entre el Número de esporas, la Colonización micorrízica y la Masa seca radical

Las tablas 10 y 11 muestran la influencia del porcentaje de Colonización micorrízica y la Masa seca radical total sobre la producción de esporas en cada uno de los periodos de crecimiento incluyendo todos los muestreos desde los 30 hasta los 120 días.

Tabla 10: Correlación entre las variables porcentaje de Colonización micorrízica, Masa seca radical total y Número de esporas en el periodo enero- mayo.

Correlación de Pearson	Número de esporas.g ⁻¹	Colonización micorrízica (%)	Masa seca radical (g)
Número de esporas.g ⁻¹	1	0,628(**)	0,183
Colonización micorrízica (%)	0,628(**)	1	0,388(**)
Masa seca radical (g)	0,183	0,388(**)	1

** La correlación es significativa al nivel 0,01.

Valorando integralmente los dos periodos de crecimiento se encontró que las asociaciones más estables se obtuvieron entre el porcentaje de Colonización micorrízica y el Número de esporas, con coeficientes de correlación de 0,5 a 0,6; los que fueron estadísticamente significativos en cualquiera de los periodos de crecimiento.

Tabla 11: Correlación entre las variables porcentaje de Colonización micorrízica, Masa seca radical total y Número de esporas en el periodo junio- octubre.

Correlación de Pearson	Número de esporas.g ⁻¹	Colonización micorrízica (%)	Masa seca radical (g)
Número de esporas.g ⁻¹	1	0,523(**)	0,383(**)
Colonización micorrízica (%)	0,523(**)	1	0,568(**)
Masa seca radical (g)	0,383(**)	0,568(**)	1

** La correlación es significativa al nivel 0,01.

En ambos casos, a medida que aumentó el porcentaje de Colonización se incrementó el Número de esporas, aunque resulta interesante destacar que esta relación positiva entre ambos indicadores no siempre se comporta de igual modo. Según Hayman y Stovold, (1979), el número de esporas de HMA del suelo no necesariamente refleja la capacidad de colonización de estos hongos.

La conducta de la Masa seca radical varió con el periodo de crecimiento lo que es explicable, al menos parcialmente, durante el periodo enero-mayo, en el cual el crecimiento vegetativo acelerado de *B. decumbens* micorrizada no estuvo en correspondencia con la producción de esporas.

Este fenómeno pone de manifiesto el efecto de la etapa fisiológica del cultivo sobre el funcionamiento simbiótico, de forma tal que hay una disminución del metabolismo de la planta y del flujo de fotosintatos hacia las raíces y por lo tanto, una disminución en las estructuras fúngicas inherentes al intercambio, por lo que se incrementa la esporulación como mecanismo de supervivencia en la fase final del ciclo del cultivo (Fernández y col., 1990).

La relación entre el porcentaje de Colonización y el Número de esporas no es una relación sencilla y única. En la literatura se plantean opiniones diversas como las de Hayman y Stovold, (1979) quienes refieren que el número de esporas de HMA provenientes del suelo, no necesariamente está reflejando la capacidad de colonización de estos hongos, por lo que no es un buen indicador del comportamiento micorrízico, sin embargo Rivera y col. (2009) dejan clara la necesidad de incluir la necesaria esporulación como un indicador a cumplir para la recomendación de cepas eficientes de HMA por tipo de suelo.

Dhillion y Anderson (1993), Camargo Ricalde y Dhillion, (2003) infieren que la asociación micorrízica puede variar a través del tiempo y del espacio, no encontrando estos autores relaciones significativas entre el Número de esporas de HMA y la Colonización micorrízica de la raíz.

Montilla y col. (2005), en plantas de cafeto, encontraron una relación inversa entre las variables que definen el comportamiento fúngico (Densidad visual, porcentaje de Colonización, Micelio extramático) y Número de esporas.

Al analizar la relación entre las variables Número de esporas y Masa seca radical en el periodo enero-mayo (Tabla 10) se observó que no existió correlación entre ellas, lo cual pudo estar influido porque para determinar la Masa seca radical en toda la profundidad se tienen en cuenta gran cantidad de raíces, incluyendo las más gruesas, que no se relacionan directamente ni con la formación de esporas, ni con el porcentaje de Colonización micorrízica.

En este experimento se encontró relación entre la Masa seca radical y las otras dos variables en el periodo junio-octubre (Tabla 11). Esta diferencia debe ser una consecuencia de los grandes contrastes existentes entre los indicadores de crecimiento, el porcentaje de Colonización y la producción de esporas en ambos periodos de crecimiento.

Estos resultados difieren con los informados por Allen y col. (2001) quienes evaluaron la asociación entre la Colonización micorrízica y el rendimiento o sus componentes en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y maíz (*Zea mays*). También Sylvia y col. (1993b) realizaron trabajos similares en soya (*Glycine max* L. Merr); en general todos encontraron que la Colonización micorrízica no correlacionó con el Rendimiento y la Biomasa, aunque ciertamente no trabajaron en canteros inoculados con cepas eficientes y tuvieron presente la micorrización nativa.

Variabilidad espacial del Número de esporas dentro y entre los canteros para cada periodo de crecimiento

En las figuras 8 y 9 se presenta una estimación de la variabilidad del número de esporas.g⁻¹ en función de la longitud del cantero. La estimación de los diferentes contenidos de esporas en función de la longitud de cada cantero, para ambos periodos de crecimiento, responde a la variabilidad de este indicador dentro del cantero. La

comparación entre las medias de cada cantero es una medida de la variabilidad entre ellos.

En ambas figuras se puede observar una elevada variabilidad del Número de esporas dentro de los canteros en ambos periodos. Se mostró un patrón muy similar entre los dos canteros sembrados en cada periodo. Se observó que los valores individuales se encontraron en un rango aproximado al $\pm 50\%$ del valor promedio para cada cantero, conducta que se produjo en cada periodo de crecimiento.

Se corrobora que las medias de los contenidos de esporas.g⁻¹, en los dos canteros y en cada época alcanzaron valores similares, esto demuestra que la tecnología desarrollada presenta repetitividad. En el periodo de enero a mayo se alcanzaron de 42 esporas.g⁻¹ en el cantero C5 y 41 esporas.g⁻¹ en el cantero C6, para 1% de variación con relación al valor promedio de ambos. En el periodo de junio a octubre el cantero B5 mostró un valor medio de 108 esporas.g⁻¹ y B6 reveló 123 esporas.g⁻¹ para un 6% de variación con relación al valor promedio de ambos, lo cual indicó una alta reproducibilidad de los resultados en los dos canteros evaluados en cada periodo.

En ambos periodos (Figuras 8 y 9), se presentó una elevada variabilidad en los contenidos de esporas a lo largo del cantero, lo que ratifica la gran variabilidad de esporas a la que se había hecho referencia anteriormente.

Los mayores valores de esporas asociadas con el periodo junio-octubre discutidos en el tópico anterior y la variabilidad encontrada en este reafirman los resultados anteriormente planteados.

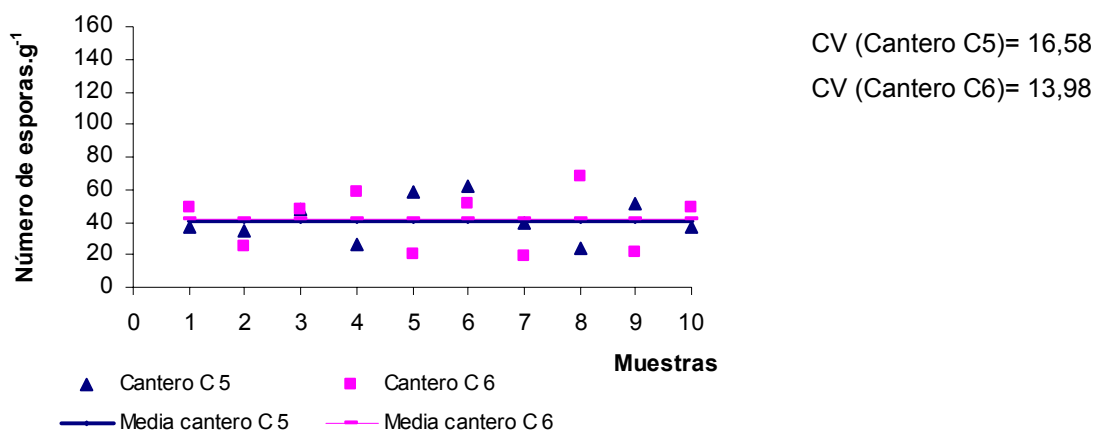


Figura 8: Variabilidad del Número de esporas dentro y entre canteros en el periodo de enero a mayo

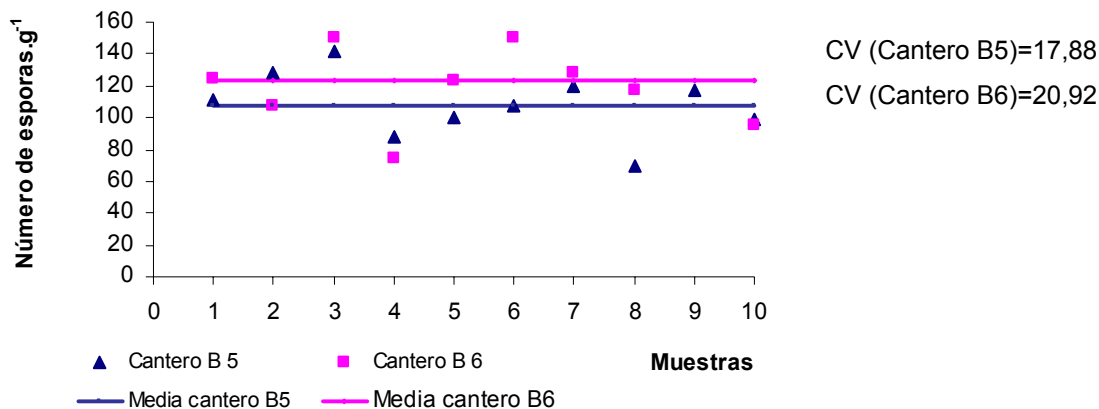


Figura 9: Variabilidad del número de esporas dentro y entre canteros en el periodo de junio a octubre

Cuando las muestras se agruparon en función del método de muestreo implementado de subdividir el cantero en 3 partes iguales (Figura 10A, B, C, D), la variabilidad entre las partes del cada cantero, estimada mediante la comparación con el valor promedio de cada cantero, disminuyó apreciablemente, lo que indica que este método de muestreo fue satisfactorio como enfoque para evaluar los contenidos de esporas en los canteros.

El hecho de que la reagrupación de los contenidos de esporas obtenidos en las 3 partes de cada cantero disminuyó fuertemente la estimación de la variabilidad dentro de los mismos, fue una consecuencia de que la variabilidad en la longitud del cantero no presentó un sesgo definido en cuanto a la ubicación de la muestra compuesta en el cantero ya que en cinco m los valores de Número de esporas aumentan y disminuyen y se alcanza un valor promedio que no difiere significativamente del encontrado en los otros cuadrantes y en el cantero en general. Esto sugiere que es una característica de la variable dada por su complejidad biológica.

La variabilidad del contenido de esporas de HMA dentro del cantero resultó ser mayor que entre ellos, esto ocurre producto a los patrones de la esporulación, los cuales pueden variar debido a muchos factores (Mosse y Bowen 1968; Dhillion y Anderson 1993; Dhillion y col., 1994; Jacobson, 1997).

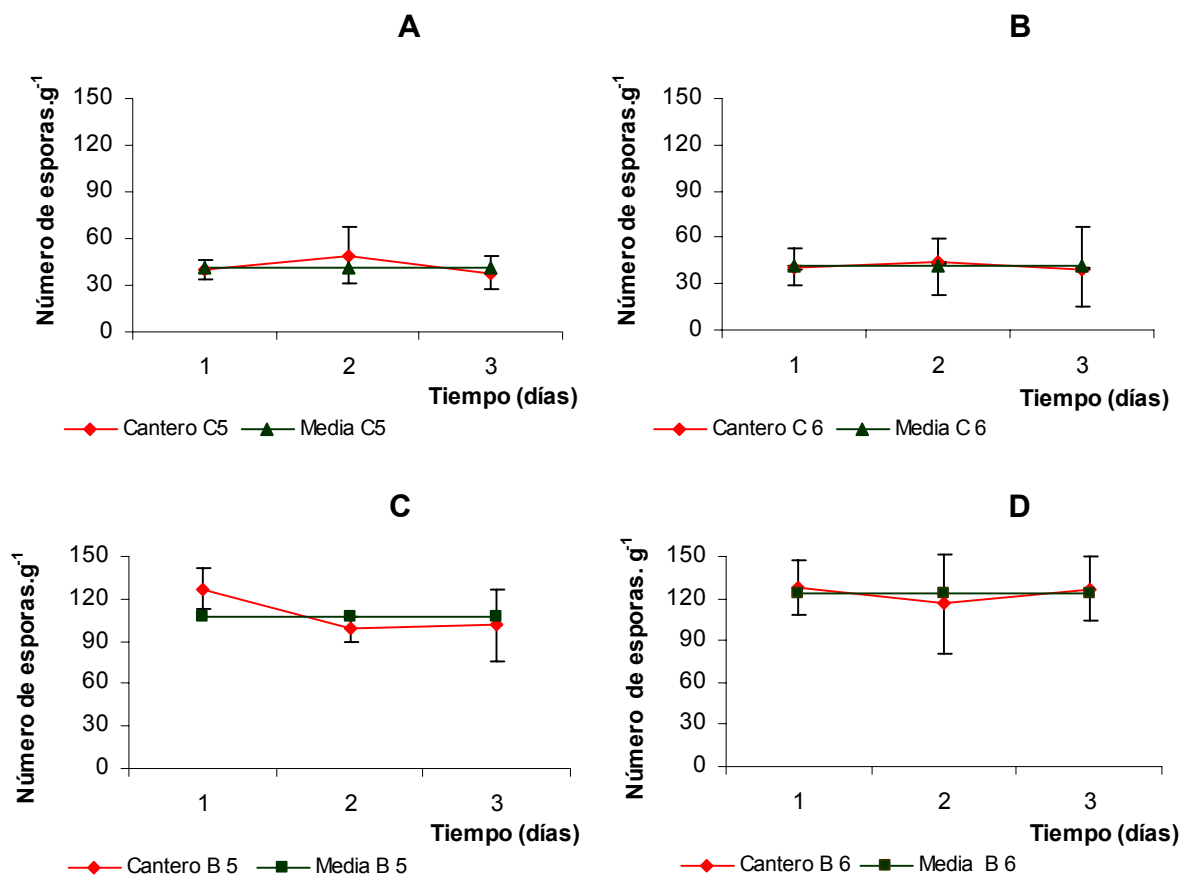


Figura 10: Variabilidad del número de esporas en función de dividir cada cantero en tres partes iguales. Canteros de enero a mayo (A y B) y canteros de junio a octubre (B y C). Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0,05$).

La existencia y funcionalidad ecológica de los HMA, varía con relación a la variabilidad estacional, de esta manera la vegetación existente y la variación estacional, son factores determinantes en la presencia de hongos (Tapia, 2003).

Algunos estudios han determinado que la distribución, actividad y supervivencia de los HMA puede ser influenciada por varios factores, así como por procesos biológicos, físicos y químicos del suelo como son la fertilidad y la humedad (Anderson y col. 1984), la profundidad (Virginia y col. 1986), el movimiento físico y la saturación de agua (Miller, 2000) y el pH (Green y col. 1976; Mendoza y col. 2002; Escudero y Mendoza, 2005). También influyen la temperatura, la intensidad de luz, la susceptibilidad fenológica de las plantas y las variaciones fenológicas de los HMA (Sylvia y col., 1993).

Los resultados anteriores relacionados con la similitud en los contenidos de esporas en los canteros sembrados en la misma época, así como la forma de adquirir la muestra en todo el cantero para reflejar la dinámica de esporas, son indicativos de una adecuada reproducibilidad del proceso de producción.

Tratando de encontrarle una causa a la variabilidad encontrada en el número de esporas dentro de los canteros se relacionó la variabilidad existente en la producción de esporas con la variabilidad presente en los contenidos químicos del sustrato.

Las tablas 12 y 13 muestran la variabilidad longitudinal existente en la producción de esporas, así como la variabilidad longitudinal presente en los contenidos químicos del sustrato. De forma general, se encontró que los valores promedios de esporas/g en ambos canteros fueron similares, conducta anteriormente encontrada en canteros que se sembraron en épocas similares.

La variabilidad longitudinal del Número de esporas fue apreciable, con resultados muy similares en ambos canteros. Los mayores valores se encontraron en el cantero B3.

En relación con los indicadores químicos el porcentaje de materia orgánica fue el indicador químico que mayor variabilidad longitudinal presentó dentro del cantero, posiblemente asociado a la extracción superficial del material arcilloso del lugar de origen. El contenido de Mg intercambiable también presentó una importante variabilidad. Desde el punto de vista de diferencias en los contenidos de los indicadores químicos entre canteros, la mayor diferencia se estableció entre los contenidos de fósforo.

Las diferencias encontradas en cuanto al porcentaje de materia orgánica, el contenido de Mg y el fósforo disponible entre los canteros (Tabla 12), fueron indicativos de que existe variabilidad en el material arcilloso, aún cuando corresponde al mismo sitio y momento de extracción.

Tabla 12: Variabilidad espacial de las esporas.g⁻¹ y de algunos indicadores químicos del sustrato en dos canteros de producción a los 120 días

Canteros	Distancia a la cual se tomaron las muestras del borde del cantero	Esporas.g ⁻¹ de sustrato	Na	K	Ca	Mg	P (ppm)	MO (%)	pH H ₂ O
			(cmol. kg ⁻¹)						
B3	1,5 m	71	0,17	0,32	40,0	2,5	35	0,61	7,3
	3,0 m	129	0,19	0,21	37,5	2,2	32	0,94	7,2
	4,5 m	54	0,11	0,31	37,5	1,5	40	0,44	7,3
	6,0 m	55	0,08	0,32	37,5	3,5	31	0,61	7,3
	7,5 m	43	0,13	0,39	32,5	8,5	39	0,61	7,3
	9,0 m	63	0,13	0,33	37,5	2,5	30	4,41	7,3
	10,5 m	49	0,08	0,35	37,5	2,5	35	4,15	7,2
	12,0 m	56	0,11	0,31	37,5	5,0	29	0,40	7,2
	13,5 m	114	0,11	0,26	39,0	2,5	45	0,61	7,2
	14,5 m	54	0,11	0,29	35,2	2,0	36	3,25	7,3
		Media	69	0,12	0,31	37,2	3,3	35,2	1,6
	CV	40	27,4	15,0	5,2	60,1	13,6	97,2	0,7
B4	1,5 m	77	0,11	0,22	38,5	2,6	67	3,09	7,3
	3,0 m	76	0,11	0,23	35,0	1,0	73	2,05	7,3
	4,5 m	40	0,13	0,25	38,5	3,0	53	2,09	7,2
	6,0 m	72	0,13	0,25	35,0	7,0	62	1,6	7,2
	7,5 m	48	0,13	0,31	33,7	6,3	62	2,26	7,2
	9,0 m	59	0,11	0,36	37,0	5,5	57	0,78	7,2
	10,5 m	78	0,11	0,25	36,2	3,8	90	3,09	7,2
	12,0 m	72	0,11	0,29	41,0	2,1	54	1,94	7,3
	13,5 m	47	0,13	0,33	35,0	6,5	60	11,0	7,3
	14,5 m	62	0,15	0,31	35,0	6,0	57	2,26	7,2
		Media	57	0,12	0,28	36,2	4,4	63,5	3,0
	CV	37	10,9	15,8	5,9	46,4	16,6	90,7	0,7

Los análisis de Correlación realizados entre la cantidad de esporas y algunos indicadores químicos revelaron resultados poco significativos (Tabla 13) y con muy bajos coeficientes de correlación. La correlación obtenida con el Mg intercambiable se encontró en condiciones de mediana homogeneidad de este nutriente en el cantero (Tabla 12); ya que no fue el indicador que mayor coeficiente de variación mostró. Poniendo en duda cualquier interpretación sobre la influencia de la variabilidad de los indicadores químicos sobre la variabilidad longitudinal encontrada en la producción de esporas. Se mostró que en este caso, no parece ser la variabilidad en los indicadores de fertilidad química la causa de la variabilidad en el número de esporas dentro del cantero.

Tabla 13: Coeficiente de correlación lineal entre las esporas.g⁻¹ e indicadores de fertilidad química

	Na	K	Ca	Mg	P	M.O	pH
Esporas. g ⁻¹ de sustrato	-0,531	-0,121	0,329	-0,463(*)	0,420	-0,049	0,444

* La correlación es significativa al nivel 0,05.

Una vez establecida la variabilidad longitudinal dentro de los canteros como una conducta generalizada ya que se encontró en los 6 canteros muestreados (B5, B6, C5, C6, B3 y B4) en diferentes momentos y siguiendo un comportamiento similar en cualquiera de ellos, y al no encontrarse relaciones de dependencia entre ésta y la variabilidad de los indicadores químicos del sustrato, se considera que la variabilidad longitudinal de las esporas debe ser una consecuencia de la variabilidad espacial de la esporulación como proceso biológico producto de la interacción con el medio a nivel de micrositio o una representación de ambos.

Lo anterior obliga a minimizar esta variabilidad en la fase o etapas posteriores del proceso de producción como la del secado. Ésta puede disminuirse homogenizando sistemáticamente el producto en elaboración en esta área, para que se alcancen contenidos homogéneos de esporas en el producto final envasado.

4. 2 Experimento 2. Influencia del periodo de secado y del molinado sobre el número de esporas del inoculante

La etapa final del proceso de producción del EcoMic[®] consta del proceso de secado y posteriormente del molinado y envasado.

En este proceso se debe homogenizar sistemáticamente el sustrato, siendo esta una actividad importante teniendo en cuenta la variabilidad anteriormente presentada (Figuras 8 y 9 y Tabla 12).

En la tabla 14 se presentan los porcentajes de Humedad encontrados al concluir el proceso de secado del material proveniente de los canteros del experimento 1 (C5, C6, B5 y B6).

Tabla 14: Porcentajes de Humedad promedio en canteros al concluir el periodo de secado (15 días)

Cuartones	Periodo de crecimiento en cantero	Porcentaje de humedad (%) en área de secado
1 y 2 Cantero C5	Enero- Mayo	10,5
3 y 4 Cantero C6	Enero-Mayo	10,6
1 y 2 Cantero B5	Junio-October	11,4
3 y 4 Cantero B6	Junio-October	12,25

Los porcentajes de Humedad se encuentran por debajo de 13 %, que es la humedad mínima que se debe permitir para garantizar un proceso adecuado de molinado según la metodología descrita por Paneque y col. (2004).

Se encontró una ligera influencia de la época de crecimiento, en correspondencia con las precipitaciones existentes en la etapa final del proceso en la fase de cantero, así como con la humedad relativa en el periodo de secado, lo cual explica los menores porcentajes de Humedad alcanzados en los canteros C5 y C6 en comparación con B5 y B6.

En la tabla 15 se muestra la influencia de los diferentes periodos de secado (5 y 15 días) y del molinado sobre el Número de esporas en sustratos correspondientes a los diferentes canteros.

La influencia de los periodos de secado sobre los contenidos de esporas mostró un efecto negativo ligero, el que no fue significativo en las muestras de los canteros C5 y C6 cuya disminución fue como promedio del orden del 10 %, mientras que en los canteros B5 y B6 la reducción fue significativa y del orden del 20 %.

En la etapa de secado ocurren varios procesos que pueden producir un incremento relativo del Número de esporas, como la disminución de la humedad del material y la terminación o maduración del proceso de esporulación. Sin embargo, en este caso ocurrió una disminución correspondiente al 20%.

Tabla 15: Influencia del periodo de secado y del molinado sobre el Número de esporas en cada cantero.

Canteros	Número de esporas.g ⁻¹ en el periodo de secado		Número de esporas.g ⁻¹ en la etapa de Molinado
	5 (días)	15(días)	
C5	32	32 (0 %)	28 (12%)
C6	45	39 (13%)	35 (11%)
B5	66	52 (21%)	24 (54%)
B6	78	63 (20%)	29 (54%)
Canteros	t (5 días-15 días)	t (15-molinado)	t (5 días – molinado)
C5	n.s	n.s	n.s
C6	n.s	n.s	n.s
B5	*	*	*
B6	n.s	*	*

La prueba t para muestras pareadas se realizó con un intervalo de confianza de 95 %.

Nota: Los valores que se encuentran entre paréntesis son las pérdidas del número de esporas en el periodo de secado y después de molinado.

Se considera que esta respuesta pudo estar relacionada con el hecho de que la cubierta del área de secado permitió la incidencia de rayos solares sobre el material puesto a secar y teniendo en cuenta que las radiaciones ultravioletas tienen un efecto negativo sobre la viabilidad y sobrevivencia de las esporas (Fernández, 1999a), pues en este caso en el proceso de secado se dieron condiciones propicias para la disminución los contenidos de esporas.

La influencia del molinado presentó valores aceptables de disminución de las esporas del orden del 18% al compararla con los contenidos de esporas a los 15 días en los canteros C5 y C6, lo cual es explicable por las pérdidas que ocurren debido al golpeo de los martillos sobre las esporas; la información obtenida está dentro de los parámetros de pérdidas del 30% que existen actualmente. Sin embargo, fueron altos en los canteros B5 y B6 donde el 63 % de las esporas se perdió. La magnitud de esta disminución estuvo muy por encima del 30%, que se ha encontrado en el proceso de

molinado en otros momentos (datos no publicados) y se puede explicar debido a que el periodo de secado en los canteros B5 y B6 fue de varios meses, pues el molino no estaba funcionando y la incidencia directa de los rayos solares sobre el producto por un periodo prolongado, influyó en los bajos valores obtenidos.

A pesar de los altos porcentajes de pérdida que se alcanzaron, se garantizaron contenidos superiores a 20 esporas.g⁻¹ (entre 23 y 35 esporas), en cualquiera de los casos estudiados, debido a la alta calidad del producto que se obtuvo en la fase de cantero, lo que avala la eficiencia del proceso de producción de EcoMic[®], sobre todo lo referente a efectividad de la cepa *G.hoi-like* en un sustrato adecuado para garantizar una alta esporulación. El sustrato utilizado actualmente fue uno de los más adecuados para reproducir esta cepa, según los resultados obtenidos por Mederos, (2009).

4.2.1 Evaluación del número de sacos a muestrear por canteros

Este ensayo se realizó con el propósito de establecer cual es el menor número de sacos a muestrear para obtener el error máximo permisible en la determinación del Número de esporas en producto terminado y envasado para evitar que algún saco tenga un contenido de esporas por debajo del estándar de calidad ya definido de 20 esporas.g⁻¹.

El material molinado que se analizó pertenecía a los canteros A3 y A4 con fecha de siembra de agosto del 2008. El valor promedio de esporas.g⁻¹ de inoculante en los 40 sacos muestreados fue de 31 esporas.g⁻¹, superior al mínimo de 20 esporas.g⁻¹ establecido para evaluar la calidad de un inoculante.

En la tabla 16 se muestra el número de sacos de producto molinado que fueron necesarios muestrear para obtener diferentes precisiones.

Se obtuvo que para un error de ± 2 esporas.g⁻¹ se deben muestrear 50 sacos, para un error de ± 3 esporas.g⁻¹ se deben muestrear 22 sacos, para un error de ± 4 esporas.g⁻¹ se deben muestrear 12 sacos y con un error de ± 5 esporas.g⁻¹ se deben muestrear 8 sacos. En todos los casos los sacos muestreados corresponden a un total de 150, que es la cantidad que aproximadamente tiene un cantero de 15 m de largo equivalente a 3.0 t de producto molinado.

Tabla 16: Número de sacos a muestrear por canteros en función de diferentes precisiones (esporas.g⁻¹ de inoculante)

Error mínimo permisible en la estimación del Número de esporas. g ⁻¹ de inoculante	n (tamaño de la muestra)	Sacos muestreados por canteros (%)
±2	50	33
±3	22	15
±4	12	8
±5	8	5

CV (Número de esporas. g⁻¹ de los 40 sacos muestreados)= 22,5

Después de analizar los resultados de este ensayo se propone recomendar el muestreo de 12 sacos por cantero para estimar el contenido promedio de esporas por saco, con un error máximo permisible de ±4 esporas.g⁻¹ de inoculante, teniendo en cuenta que el número de esporas presenta un valor promedio de 31 esporas.g⁻¹. En la práctica 12 sacos (240 kg) por cantero de 15 m de largo, corresponde aproximadamente al 8,0 % de los sacos molinados por canteros, siendo por tanto esta evaluación una necesidad a estudiar en el control de calidad del proceso de producción de EcoMic®.

4.3 Experimento 3. Implementación del proceso de control y análisis de cada uno de los canteros de la planta de producción de EcoMic®

En la tabla 17 se muestran los valores de Número de esporas y porcentajes de Colonización micorrízica en varios de los canteros establecidos en la planta de producción.

Si bien, en los canteros se manejaron dos especies de *Brachiaria* parece que la influencia de las mismas no fue determinante sobre el Número de esporas. De forma general, en todos los canteros existió un incremento en el Número de esporas con la edad del cultivo, alcanzándose los mayores valores a los 120 días. Sin embargo, al analizar el comportamiento de esta variable en los diferentes momentos de muestreo se encontró, que a los 90 días en la época lluviosa y de altas temperaturas, se

superaban los valores mínimos requeridos para un inoculante micorrízico con calidad. De esto se infiere que, teniendo en cuenta los valores de Número de esporas encontrados a los 90 días en la planta de EcoMic[®], se puede acortar el ciclo de obtención de un inóculo de alta calidad en 30 días, en esta época del año, bajo estas condiciones. En la época poco lluviosa y de bajas temperaturas se hace necesario dejar que el ciclo de obtención de inóculo sea a los 120 días, ya que en este momento fue cuando el número esporas superó el mínimo establecido para que el inóculo final presente la calidad requerida.

Tabla 17: Comportamiento del Número de esporas y porcentaje de Colonización micorrízica en canteros de la planta de EcoMic[®], 2008-2009.

Épocas	Canteros	Fecha de siembra	Número de esporas.g ⁻¹ de sustrato			Porcentajes de Colonización micorrízica (%) a los 120 días
			60 días	90 días	120 días	
Época poco lluviosa y de bajas temperaturas	C5 (<i>B.d</i>)	Enero 2008	10	25	28	63
	C6 (<i>B.d</i>)	Enero 2008	10	25	35	43
	B1 (<i>B.h.c.m</i>)	Noviembre 2008	9	17	35	58
	B2 (<i>B.h.c.m</i>)	Noviembre 2008	11	17	37	56
	x		10	21	34 ± 4	55
Época intermedia	B3 (<i>B.h.c.m</i>)	Marzo 2009	25	48	96	54
	B4 (<i>B.h.c.m</i>)	Marzo 2009	22	32	43	56
	x		24	40	69 ± 6	55
Época lluviosa y de altas temperaturas	B5 (<i>B.d</i>)	Junio 2008	23	45	57	53
	B6 (<i>B.d</i>)	Junio 2008	31	45	55	53
	A3 (<i>B.h.c.m</i>)	Agosto 2008	45	53	62	58
	A4 (<i>B.h.c.m</i>)	Agosto 2008	51	80	79	56
	x		37	56	63 ± 11	55

Legenda: *B.d.*: *Brachiaria decumbens* y *B.h.c.m.*: *Brachiaria* híbrido cultivar mulato

Los canteros sembrados en la época seca presentaron contenidos de esporas menores que en la época intermedia y lluviosa; estas dos últimas no mostraron diferencias significativas entre ellas, pero si con la primera. En todos los casos los contenidos de

esporas fueron adecuados; aún considerando un 30% de pérdidas en la fase de secado y molinado, se garantizan contenidos muy superiores a las 20 esporas.g⁻¹ para este tipo de molinado.

El número de esporas.g⁻¹ de inoculante, a los 120 días, en la época seca, alcanzó valores desde 28 hasta 37, en la intermedia desde 42 hasta 95 y en la época lluviosa se encontraron valores desde 55 hasta 79.

La información obtenida sobre la evaluación de los contenidos de esporas.g⁻¹ permite plantear que el contenido mínimo a alcanzar con la tecnología EcoMic[®] y con la cepa *G.hoi-like* pudiera ser de hasta 30 esporas.g⁻¹ como indicador del proceso en cantero terminado para ciclos de 120 días y utilizando arcilla con las características indicadas por Rivera y col., (2009).

Los datos presentados en este trabajo (Tabla 17) sobre el número de esporas en cantero terminado han sido similares a los obtenidos en las plantas de EcoMic[®] correspondientes a México y Bolivia, también utilizando *G. hoi – like*.

Los porcentajes de Colonización micorrízica también presentaron una dinámica de incremento con la fecha de muestreo, con nítidos incrementos entre 60 y 90 días. Después de los 90 días los porcentajes en algunos casos se incrementaron, sobre todo cuando a los 90 días se encontraban aún cercanos a 40% (datos no mostrados), o disminuyeron cuando ya a los 90 días presentaron valores cercanos al 60%, esto pudo estar asociado a la disminución del riego que se provocó a partir de los 90 días y cuyo efecto negativo sobre el porcentaje de Colonización fue mas pronunciado en el periodo de enero a mayo. No obstante, no se mostraron diferencias estadísticas en los porcentajes de Colonización micorrízica en las diferentes épocas de muestreo.

Teniendo en cuenta las variaciones de los contenidos químicos del sustrato en los diferentes canteros evaluados y la influencia de la época de siembra, se realizó una correlación entre los contenidos químicos del sustrato, la Temperatura del aire promedio en el periodo de crecimiento del cultivo y el Número de esporas (Tabla 18). Este análisis se realizó con el objetivo de lograr establecer si las diferencias en los contenidos de esporas asociado con la época de siembra, estuvieron influenciada por la variación de los indicadores químicos de la arcilla.

En relación con los contenidos de suelo solo se encontró (Tabla 18) una correlación significativa entre el Número de esporas y el porcentaje de materia orgánica, no obstante el coeficiente de correlación es bajo lo que es indicativo de una baja probabilidad de que las variaciones en la materia orgánica expliquen los diferentes valores de esporas en las tres épocas.

Tabla 18: Correlación entre el Número de esporas, algunos indicadores químicos del sustrato y la Temperatura de aire promedio en canteros de la planta de EcoMic®, 2008-2009.

Número de esporas.g ⁻¹ de sustrato	Na	K	Ca	Mg	P	M.O	pH	Temperatura del aire promedio
	(cmol. kg ⁻¹)				(ppm)	(%)	H ₂ O	(°C)
	0,201	-0,182	-0,222	0,075	-0,059	-0,441(*)	-0,169	0,814(**)

* La correlación es significativa al nivel 0,05

** La correlación es significativa al nivel 0,01

En la tabla 18 se muestra que existió una correlación altamente significativa entre el Número de esporas y las Temperaturas registradas en cada época, presentándose un elevado coeficiente de correlación e indicando que efectivamente la época, a través de la temperatura es un factor determinante en la producción de esporas en el proceso de producción de EcoMic®.

Camargo y col. (2002) y Camargo y Dhillion, (2003), en épocas similares señalan que el número total de esporas de HMA del suelo tiende a ser mayor durante el periodo lluvioso y menor durante la estación de sequía.

Estudios posteriores Camargo y Esperón, (2005) relacionan el número de esporas de HMA del suelo con los datos de temperatura ambiental y precipitación media mensual registrados y se observó que durante la estación de lluvias se presenta el mayor número de esporas de HMA y durante la estación con menor precipitación se registró el menor número de esporas de HMA, estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo.

4.4 Metodología de muestreo propuesta en las diferentes fases del proceso de producción de EcoMic®

- *Modo de realizar el muestreo para determinar el Número de esporas en la fase de cantero:*

Dividir el cantero en tres partes de 5 m cada una y tomar una muestra compuesta por 5 submuestras en cada parte del cantero, en toda la profundidad. Realizaría muestreo a los 90 días de sembrado el cantero. Identificar las muestras y enviarlas al laboratorio de control de calidad de HMA.

- *Modo de realizar el muestreo para determinar el porcentaje de Colonización micorrízica en la fase de cantero:*

Extraer cinco plantas representativas en cada sección del cantero efectuando un moteado de 5 cm alrededor del tallo para realizar una adecuada extracción de las raíces. Realizará muestreo a los 60, 90 y 120 días de sembrado el cantero. Identificar las muestras y enviarlas al laboratorio de control de calidad de HMA.

- *Modo de realizar el muestreo para determinar la calidad del producto terminado:*

Muestrear 12 sacos por cantero para un error máximo permisible de 4 esporas.g⁻¹ de inoculante en canteros de 15m. Se tomará una muestra compuesta por 10 submuestras en cada saco muestreado

V- CONCLUSIONES

1. La profundidad del muestreo influyó significativamente sobre la producción de esporas, pero no sobre el porcentaje de Colonización micorrízica.
2. Resulta adecuado para estimar el Número de esporas en la etapa de cantero, dividir el cantero en tres partes iguales y tomar en cada una de ellas muestras compuestas por 5 submuestras en la profundidad de 0-20 cm.
3. Se obtuvo una adecuada correspondencia en los contenidos promedios de esporas.g⁻¹ de sustrato entre los canteros sembrados y manejados durante el mismo periodo.
4. Se encontró un efecto significativo de la época de establecimiento de los canteros sobre la producción de esporas, obteniéndose un mayor número de esporas en la época lluviosa y con altas temperaturas del orden de 65 esporas.g⁻¹, superiores a los 34 esporas.g⁻¹ obtenidos en la época de bajas temperaturas, pero en cualquier caso siempre por encima del mínimo establecido de 20 esporas. g⁻¹ de sustrato.
5. Se encontró que para garantizar una precisión de 4 esporas. g⁻¹ de inoculante en el producto molinado, se deben muestrear el 8% de los sacos molinados por canteros de 15 m largo.

VI- RECOMENDACIONES

- Para realizar el control de calidad de los canteros de la Planta de producción de EcoMic[®] dividir el cantero en tres partes iguales y tomar en cada una de ellas muestras compuestas por 5 submuestras en la profundidad de 0-20 cm.
- Profundizar en el estudio de la influencia de la fecha de siembra y el periodo de crecimiento del cantero sobre los contenidos de esporas.
- Repetir los trabajos encaminados a evaluar la influencia del periodo de secado en los contenidos de esporas, dejando claro que se ejecuten al menos en las dos épocas de trabajo estudiadas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbot, L.K. and Robson, A.D. 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agric. Ecosystems Environ*, vol. 35, p. 121-150.
2. Abbot, L.K.; Robson, A.D. and Gazey, C. 1992. Selection of inoculants vesicular-arbuscular micorrhizal fungi. *In: Norris.V.R.,D.J. Read and A.K.Varma (eds). Methods in Microbiology. Academic Press. London. p.1-19.*
3. Adholeya A, Tiwari P, Singh R. 2005. Large scale inoculum production of Arbuscular Mycorrhizal fungi. *In: In vitro culture of mycorrhizas. Eds.: Declerck S, Strullu DG. Springer, Alemania.*
4. Aguilera, G.; Olalde, P.; Rubí, A. y Contreras, A. 2007. Micorrizas Arbusculares. *Ciencia Ergo Sum, Vol.4, (3).Toluca. México, p.300-306.*
5. Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra, 17.p 179-191.*
6. Alarcón, A.; Almaraz, J. J.; Ferrera-Cerrato, R.; González-Chávez, M del C, Á.; Lara Hernández, Ma. E.; Manjarrez Martínez, Ma. J.; Quintero Lizaola, R. y Santamaría Romero, S. 2004. Manual: Tecnología hongos micorrízicos en la producción de especies forestales en vivero. R. Ferrera-Cerrato, A.Alarcón, y M.E. Lara H. (Eds.). Colegio de Postgraduados, Montecillo: Semarnat-Propane, 98p.
7. Alexander, T.; Meier, R.; Toth, R. and Weber H.C. 1988. Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytologist, Vol. 110 (3): 363-370.*
8. Alfonso, C. A. y Monedero, M. Uso, manejo y conservación de los suelos. ACTAF. 2004. 68 p.
9. Allen, B.L. and Allen, M.F. 1990.The mediation of competition by mycorrhizae in successional and patchy environments, in: J.B. Grace, D. Tilman, (eds). *Perspectives on Plant Competition. Academic Press, London, p.484.*
10. Allen, B. L.; Jolley, V. D.; Robbins, C. W. and Freeborn, L. L. 2001. Follow wheat cropping of unamended and manure-amended soils related to mycorrhizal colonization, yield and plant nutrition of dry bean and sweet corn. *J. Plant Nutr, 24:921-943.*

11. Amijee, F.; Tinker, P. B. and Stribley, D. P. 1989. Effects of phosphorus on the morphology of VA mycorrhizal root system of leek (*Allium porrum* L.). *Plant and Soil*, 119:334-336.
12. Anderson, R.C.; Libert, A.E. and Dickman, L.A. 1984. Interaction of vascular plants and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi across a soil moisture-nutrient gradient. *Oecologia*, 64: 111-117.
13. Apple, M.; Thee, C.; Vickie L and Smith, L. 2005. Arbuscular mycorrhizal colonization of *Larrea tridentata* and *Ambrosia dumosa* roots varies precipitation and season in the Mojave Desert. *Symbiosis*. Balaban Philadelphia, Vol 39. p.1-5.
14. Argel, P.J.; Miles, J.W.; Guiot, D.J y Lascano, C.E. 2005. Cultivar Mulato (*Brachiaria* híbrido cultivar mulato CIAT 36061): Gramínea de alta producción y calidad forrajera para los trópicos. Cali, Colombia. Centro de Agricultura Tropical (CIAT), Boletín. 28p.
15. Arrouays, D., S. Martin, A. Lepretre y H. Bourennane. 2000. Short-range spatial variability of metal content in soil on a one hectare agricultural plot. *Communication Soil Science and Plant Analysis* 31: 387-400.
16. Augé, R. M. 2004. Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relation. *Can. J. Soil Sci*, 84:373-381.
17. Augé, R.M., Stodola, A.J.W.; Tims, J.E., Saxton, A.M. 2001. Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant and soil*, 230:87-97
18. Azcón - Aguilar, C.; Barcelo, A.; Vidal, M. /y col./ 1992. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. *Agronomie*, 12: 837 - 840.
19. Azcón - Aguilar, C.; García - García, F. y Barea. J. M. 1991. Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de Micorrizas vesículo arbusculares. En: Fijación y movilización biológica de nutrientes. II. Nuevas Tendencias. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, p.129-149.
20. Azcón-Aguilar, C.; Jaizme-Vega, M.C. and Calvet, C. 2002. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogen. p. 187-197. In Gianinazzi, S., H. Schüepp, J.M. Barea, and K. Haselwandter (eds.)

Mycorrhizal technology in agriculture: From genes to bioproducts. Birkhäuser Verlag AG, Basel, Switzerland.

21. Azcón- Bieto, J. y Talon, M. 2001. Fundamentos de la fisiología vegetal. Cap 8: Nutrición Mineral y producción vegetal. Agustín Garate y Ildefonso Bonilla. Ed. Universidad de Barcelona, p. 113-130.
22. Azcón, R.; Ambrosano, E. and Charest, C., 2003. Nutrient acquisition in mycorrhizal lettuce plants under different phosphorus and nitrogen concentration. *Plant Sci*, 165:1137-1145.
23. Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Goulet, A., Piché, Y. 1998. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*, 139: 375-388.
24. Bago, B.; Azcón - Aguilar, C.; Shachar - Hill, Y. /y col./ 2000a. El micelio externo de la micorriza arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno. En: *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Eds.: Alarcón, A. y Ferrera - Cerrato, R. IRENAT. Colegio de posgraduados. Montecillo. Mundi Prensa, México, p. 78 - 92.
25. Bago, B.; Pfeffer, P.E. y Shachar-Hill, Y. 2000b. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol*, 124:949-957.
26. Bago, B.; Zipfel, W.; Williams, R.; Jun, J. /y col./. 2002. Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol*, 128:108-124.
27. Bagyaraj, D.J. 1992. Vesicular arbuscular micorrizal: Application in Agriculture. *Methods in Microbiol*, 24:360-373.
28. Barea, J. M. 2003. Las micorrizas arbusculares componente clave en la productividad y estabilidad de agroecosistemas. Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, Granada, España, p.50.
29. Barea, J. M. Azcón-Aguilar, C.; Ocampo, J.A.; Azcón, R. 1991. Morfología, anatomía y citología de las micorrizas va. En: *Fijación y Movilización de Nutrientes*. Madrid, Tomo II. p 150 - 173.

30. Bi, Y.; Li, X.; Wang, H. y Christie, P. 2004. Establishment of monoxenic culture between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus sinuosum* and Ri T-DNA-transformed carrot roots. *Plant and Soil* 261: 239–244.
31. Bolan, N.S. 1991. A critical review on the role of micorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil*, 134: 189-207.
32. Bonfante - Fassolo, P. y Perotto, S. 1992. Plants and endomycorrhizal fungi: The cellular and molecular basis of their interaction. In: *Molecular signals in plant-microbe communications*. Verma DP (eds) CRC press Boca Raton, p. 445 - 470.
33. Bonfante-Fasolo, P. 1984. Anatomy and morphology of VA micorrhizae. In: *VA Mycorrhiza*. Powell, C. E. & D. J. Bagyaraj (eds.). CRC Press, Boca Ratón, p. 5-33.
34. Buée, M.; Rossignol, M.; Jauneau, A. /y col./ 2000. The presymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol. Plant - Microbe Interact*, 13: 693 - 698.
35. Burrows, R. L. y Pfleger, F. L. 2002. Host responses to AMF from plots differing in plant diversity. *Plant Soil*, 240:169–179.
36. Camargo-Ricalde, S.L. y Dhillion, S.S. 2003. Endemic *Mimosa* species can serve as mycorrhizal "resource islands" within semiarid communities of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Micorriza*, 13: 129-136.
37. Camargo-Ricalde, S.L., Dhillion S.S. and Grether R. 2002. Community structure of endemic *Mimosa* species and environmental heterogeneity in a semi-arid Mexican valley. *J. Veg. Sci.* 13: 697-704.
38. Camargo-Ricalde, S.L. y Esperón-Rodríguez. 2005. Efecto de la heterogeneidad espacial y estacional del suelo sobre la abundancia de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares en el valle semiárido de Tehuacán-Cuicatlán, México. *Rev. Biol. Trop.* Vol. 53 (3-4): 339-352.
39. Carvalho, L. M.; Cacador, I.; Martinsloucao, M.A. 2001. Temporal and Spatial Variation of Arbuscular Mycorrhizas in Salt Marsh Plant of the Tagus Estuary (Portugal). *Mycorrhiza*, 11:303309.

40. Carvalho L.M.; Jones, C. and Liebmann, B. 2004. The South Atlantic convergence zone: Intensity, form, persistence, and relationships with intraseasonal to interannual activity and extreme rainfall. *J. Climate*, 17: 88-108.
41. Castillo, C.G. 2005. Biodiversidad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares en ecosistemas agroforestales del Centro Sur de Chile. Tesis Doctoral, Universidad de La Frontera. p. 124.
42. Castillo R.; Giovanna C.; Borie B.; Ricardo F.; Borquez G.; Eduardo R.; Horlacher R., Eliana R.; Sieverding E. 2006. Diversity of mycorrhizal plant species and arbuscular mycorrhizal in evergreen forest, deciduous forest and grassland ecosystems of southern Chile. *Journal of applied botany and food quality*. Vol.81 (1):40-47.
43. Cline, M. 1944. Principles of soil sampling. *Soil Sci.* 58:275-288.
44. Cortez, M. y Ribero, 1984. T. Características botánicas de algunas forrajeras introducidas S.C. Bolivia, p. 129 – 130.
45. Covacevich, F.; Fernández Palma, H.; Sainz Rozas, P. y Barbieri, H. 2006. Crecimiento y micorrización de trigo en siembra directa bajo distintas formas de colocación de fósforo. *Ciencia del Suelo Unidad Integrada. INTA-FCA Balcarce*.
46. Cruz-Ulloa, S. 1995. Micorrizas: Un caso de simbiosis entre plantas y hongos. CCH-Sur, UNAM. México, D. F.
47. Cuenca, G, De Andrade, Z. y Lovera, M. 2003. Preselección de plantas nativas y producción de inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de relevancia en la rehabilitación de áreas degradadas de la Gran Sabana. Estado de Bolívar, Caracas. *Ecotrópicos*, 16(1): 27 – 40.
48. Curtis E. and Swift, Ph.D. 2004. Mycorrhiza and soil phosphorus levels. Mycorrhiza and soil phosphorus levels. Colorado State University Cooperative Extension, p.2-4.
49. Dalpé, Y. Comunicación personal. 2007. Agriculture and Agri-Food, 960 Carling Ave. Ottawa, Ontario K1A 0C6. Canada.
50. Daniels, B. A y Trappe, J. M. 1980. Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus espigaeus*. *Mycologia*, vol 72, p. 457-471.

51. Darwich, N. 2003. Muestreo de suelos para una fertilización precisa. En: II Simposio de Fertilidad y Fertilización en Siembra Directa. XI Congreso Nacional de AAPRESID. Tomo 2. pp 281-289.
52. de la Noval, B. M. 2008. Efecto de la interacción hongos micorrízicos arbusculares - sistemina – tomate (*Solanum Lycopersicum* l variedad amalia) sobre proteínas de defensa y respuesta a patógenos. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de la Habana, Facultad de Biología. La Habana
53. de la Noval, B. M.; Pérez, E.; Martínez, B.; León, O.; Martínez-Gallardo, N. y Delano-Frier, J. 2007. Exogenous systemin has a contrasting effect on disease resistance in mycorrhizal tomato (*Solanum lycopersicum*) plants infected with necrotrophic or hemibiotrophic pathogens. *Mycorrhiza*, vol. 17, no. 5, p. 449-460.
54. de la Providencia, I. E, de Souza, F. A.; Fernández, F.; Séjalon, N. and Declerck, S. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytologist* . 165.261–271
55. Dhillon, S.S. y Anderson, R.C. 1993. Seasonal dynamics of dominant species of arbuscular mycorrhizae in burned and unburned sand prairies. *Can. J. Bot*, 71: 1625-1630.
56. Dhillon, S.S.; McGinley, M.A.; Friese, C.F. and Zak, J.C. 1994. Construction of sand shinnery oak communities of the Llano Estacado: animal disturbances, plant community structure and restoration. *Rest. Ecol*, 2: 51-60.
57. Dodd, J. C. y Thompson, B. D. 1994. The screening and selection of inoculant arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, p. 159
58. Douds D. D. and Nagahashi G. 2000. Signalling and Recognition Events Prior to Colonization of Roots by Arbuscular Mycorrhizae Fungi. In: Podila G. K. and Douds D. D. (ed.): *Current Advances in Mycorrhizae Research*. St. Paul, The American Phytopathological Society. p.11–19.
59. Dumas - Gaudot, E.; Gollote, A.; Cordier, C. /y col./.. 2000. Modulation of Host Defense System. Eds.: Kapulniks, Y. y D. D. Douds. En: *Arbuscular Mycorrhizas*:

- Physiology and Function. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, p. 173 - 200.
60. Eissenstant, D.M., Newman, E.I. 1990. Seedling establishment near large plants: effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on intensity of plant competition. *Funct. Ecol*, 4: 95-99.
 61. Entry J.A.; Rygiewicz, P.T.; Watrud, A. L.S.; Donnell, P.K. 2002. Influence of Adverse Soil Conditions on the Formation and Function of Arbuscular Mycorrhizas. *Adv Environ Res*, 7:123-138.
 62. Escudero, V.; Mendoza, R. 2005. Seasonal Variation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Temperate Grasslands Along a Wide Hydrologic Gradient. *Mycorrhiza*, 15:291-299.
 63. Espinosa - Victoria, D. 2000. Diálogo molecular: Hongo Micorrízico Arbuscular - Raíz. 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.
 64. Faber, B.A.; Zasoski, R.J.; Munns, D.N.; Schakel, K. 1991. A method for measuring hyphal uptake in mycorrhizal plants. *Can. J. Bot.*, 69:87-94.
 65. Fernández, F. 1999. Manejo de las asociaciones micorrízicas arbusculares sobre la producción de postura de cafeto (*C. arabica*.L. var. Catuai) en algunos tipos de suelos, [Tesis de grado], INCA, p. 128.
 66. Fernández, F. 2003a. La Simbiosis Micorrízica Arbuscular. En: *El manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: El Caribe*. Eds.: Rivera, R y Fernández, K. La Habana, p.13-40.
 67. Fernández, F. 2003b. Avances en la producción de inoculantes micorrízicos arbusculares. En: *El manejo eficiente de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible Estudio de caso: El Caribe*. Eds.: R Rivera y Fernández, K. La Habana, p. 99-114.
 68. Fernández, F. Dell Amico, J.M. Fernández, K. de la providencia, I. Rodríguez, Y. 2006. Funcionamiento de un inoculante líquido a base de un inoculante líquido

- de hongo micorrízico arbuscular de *Glomus* sp (INCAM -4) en arroz(*Oryza sativa* var.J-104) en suelo salino. *Cultivos tropicales.*, vol.27, no. 2, p.27-33.
69. Fernández, F.; Herrera, R.; Furrázola, E. 1990. Dinámica del funcionamiento de las MVA en un cafetal joven. Resúmenes V Congreso Latinoamericano de Botánica. La Habana, Cuba, p. 25.
70. Fernández, F.; Rivera, R.; Noval, B. /y col./1999. Metodología de recubrimiento de la semilla con inóculo micorrizógeno. [Patente Cubana No 22641].
71. [Ferraris](#), G. N. 2003. Muestreo y Análisis de Suelo: Punto de Partida hacia un Diagnóstico de Fertilidad. *Desarrollo Rural INTA Pergamino*. p-9.
72. Ferrera, C. R.; Alarcón A. y Lara M. E. Manual: Tecnología de hongos Micorrízicos en la Producción de especies Forestales en vivero. Consultada en: enero del 2006. Disponible en: www.conafor.gob.mx/programas_nacionales_forestales/pronare/sire/publicaciones/PARTE1%20MICORRIZAS.pdf
73. Fortin, J. A.; Bécard, G.; Declerck, S.; Dalpé, Y.; St-Arnaud, M.; Coughlan, A. P. y Piché, Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza in root organ culture. *Can.; J. Bot.* 80:1-20.
74. Friberg, S. 2001. Distribution and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in traditional agriculture on the Niger inland delta, Mali, West Africa. *CBM:s Skriftserie*, 3:53-80.
75. Fundora, L. R. 2006. La biofertilización micorrízica: Una alternativa ecológica para producir tomate en condiciones de limitados recursos hídricos. (Tesis de Maestría). Universidad Agraria de la Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez".
76. Fundora, L. R. 2009. Incrementos en los rendimientos en el cultivo del Boniato por la utilización combinada del Fitoestimulante FITOMAS E y el biofertilizante EcoMic en condiciones de producción. *Cultivos Tropicales*. vol.30.No.3, p. 14-17.
77. Furlan, V. y Fortin, J.A. 1977. Effects of light intensity of the formation of vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Allium cepa* by *Gigaspora calospora*. *New Phytol*, vol.79, p.335-340.

78. Gara, F. 1996. The biotechnology and ecology of rhizosphere microorganisms. In: Novel biotechnological approaches to plant production: from sterile root to mycorrhizosphere. Joint COST meeting 8.21, Pisa, Italy; p.11.
79. García, I.V. y Mendoza, R.E. 2008. Relationships among soil properties, plant, nutrition and arbuscular mycorrhizal fungiplant symbioses in a temperate grassland along hydrologic, saline and sodic gradients. *Microbiol. Ecol*, 63:359
80. García, I.; Mendoza, V. and Rodolfo, E. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant symbiosis in a saline-sodic soil. *Mycorrhiza*, 17:167–174
81. García-Garrido, J.M.; Ocampo, J.A. 2002. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Exp. Bot*, 53(373): 1377-1386.
82. Gardezi A.K.; Cetina A.R.; Ferrea-Cerrato.; Velásquez, M.C.; Perez, M.M y Largué, S. 2001. Hongos micorrízicos arbusculares como componente de control biológico de la pudrición causada por *Fusarium* sp. En *gladiola.Terra*, 19:259-264.
83. Gazey, C.; Abbott, L.K.; Robson, A.D. 2004. Indigenous and introduced arbuscular mycorrhizal fungi contribute to plant growth in two agricultural soils from south-western Australia. *MYCORRHIZA*, 14(6):355-362.
84. George E. 2000. Nutrient uptake, pp. 307-344. In: *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Eds: Y Kapulnick and DD Douds Jr. Kluwer Academic Press.
85. Gerdemann, J. W. y Nicholson, T. H. 1963. Spore of mycorrhizae endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br. Mycol. Soc.* 46, 235 - 244.
86. Giovanetti, M. 2000. Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. E: *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function*. (eds) Kapulnik, Y. y Douds, D.D. Jr. Kluwer Academic Publishers, London, p. 47-68.
87. Giovanetti, M. and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytologist* , 84: 489-500.
88. *Glomeromycota* TAXONOMY. [Consultado en: noviembre del 2009]. Disponible en: <http://www.lrz.muenchen.de/~schuessler/amphylo/>.

89. Gómez L. 2002. Los Biofertilizantes. Revista Despertar Lechero, COLANTA, Medellín, Vol. 21pp. 35 – 45
90. González, P. J.; Plana, R.; Igarza, E.; Ramírez, J. 2006. Efectos del antecedente cultural en la respuesta de *P. maximum*, cv. Likoni a la inoculación de hongos micorrizógenos arbusculares. XV Congreso Científico del INCA. Programa y Resúmenes, p. 117.
91. González, P.J.; Plana, R.; Rivera R.; Fernández, F. y Arbola, J. 2008. Efectos de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en pastos del género *Brachiaria*, cultivados en suelo Pardo Mullido. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 42, Número 1.p. 101.
92. Green, N.E.; Graham S.O. and Schenk, N.C. 1976. The influence of pH on the germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia*, 68: 929-934.
93. Gutiérrez, A., Paretas, J.J., Suarez, J. D., Cordoví, E., Pazos, R., y Alfonso, H. A. 1990. Género *Brachiaria*. Una nueva alternativa para la ganadería cubana. Ministerio de la Agricultura. Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes. Documento de campo. Proyecto PNUD/FAO-Cuba/86/005, p.64.
94. Habte, M. y Osorio, N.W. 2001. Arbuscular mycorrhizas: producing and applying arbuscular mycorrhizal inoculum. CTAHR, College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii, p. 2-47.
95. Hamel, C. and Strullu, D.-G. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi in field crop production: Potential and new direction, *Canadian Journal of Plant Science*, 86(4), p. 941-950.
96. Harley, J. L y S. E. Smith. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Ed: Academic Press. New York, p. 483.
97. Hayman, D.S. 1974. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhizae. Effects of light and temperature. *New Phytol*, 73, 71-80.
98. Hayman, D.S. and Stovold, G.E. 1979. Spore populations and infectivity of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in New South Wales. *Aust. J. Bot*, 27: 227-233.
99. Hernández, N., Hernández, D. 1980. *Brachiaria decumbens*. Artículo reseña. *Revista Pastos y Forrajes*, 3:2, p. 191.

100. Hernández, A.; Pérez, J.M.; Bosch, D. y Rivero, L. 1999. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. AGRINFOR, La Habana, p.64.
101. Herrera, R. 2007. Comunicación personal. Instituto de Ecología y Sistemática, CITMA, Carretera de Varona, Km 3 ½., Capdevila, Bolleros, AP: 8029, CP: 10800, Cuba.
102. Herrera, R. A.; Ferrer, R. L.; Furrázola, E. /y col./. 1995. Estrategia de Funcionamiento de las Micorrizas VA en un Bosque Tropical. Biodiversidad en Iberoamérica: Ecosistemas, Evolución y Procesos sociales (Eds. Maximina Monasterio). Programa Iberoamericano de Ciencia y tecnología para el desarrollo. Subprograma XII, Diversidad Biológica, Mérida.
103. Herrera, R. A.; Rodríguez, M. E.; Orozco, M. O.; /y col./. 1988. Las Micorrizas y el funcionamiento de los bosques tropicales. En: Ecología de los bosques siempre verdes de la Sierra del Rosario. Cuba. Proyecto MAB. #1. 1971-1987. Rostlac. UNESCO, Capítulo 29, p: 627 - 670.
104. Howeler, R. H., Sieverding, E. y Saif, S. R. 1987. Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pastures. *Plant and Soil*. 10: 77-81.
105. ISO 9000: 2005 Sistemas de gestión de la calidad — fundamentos y vocabulario.
106. Jackson, M. L. 1964. Toma de muestras de un suelo. En: Análisis químico de suelos. Barcelona. p-29-66.
107. Jacobson, K.M. 1997. Moisture and substrate stability determine VA-mycorrhizal fungal community distribution and structure in arid grasslands. *J. Arid Environ*, 35: 59-75.
108. Jeffries, P.; Gianinazzi, S.; Perotto, S.; Turnau, K.; Barea, J.M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fertil. Soils*, 37: 1-16.
109. Juran, J.M. 1990. Juran y el liderazgo para la Calidad. Un manual para directivos. Ediciones Díaz de Santos S.A. España.

110. Juran, J.M. y Gryna, F.M. 2000. Análisis y Planificación de la Calidad de La Revolución del Servicio. Ed: Legis.
111. Lerch, G. 1977. La experimentación en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. Editorial Científico Técnica. 452 p.
112. Linderman, R.G. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. pp. 45-70. *In*: Bethlenfalvay, G.J. y R.G. Linderman (eds.). *Micorrhizae in sustainable agriculture. Special Publication 54. American Society of Agronomy. Madison, WI.*
113. Liu, R.J. and Luo, X.S. 1914. A new method to quantify the inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*, 128, 89-12.
114. Logi, C.; Sbrana, C. y M, Giovannetti. 1998. Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Appl. Environ. Microbiol*, 64: 3473 - 3479.
115. Lovera, M. y Cuenca, G. 2007. Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares (hma) y potencial micorrízico del suelo de una sabana natural y una sabana perturbada de la gran sabana, venezuela. *INCI*, feb. vol.32, no.2, p.108-114. ISSN 0378-1844.
116. Lozano P, Zenaida, Bravo, Carlos, Ovalles, Francisco *et al.* 2004, Selección de un diseño de muestreo en parcelas experimentales a partir del estudio de la variabilidad espacial de los suelos. *Bioagro*, ene. vol.16, no.1, p.61-72. ISSN 1316-3361.
117. Mader, P.; Edenhofer, S.; Boller, T.; Wiemken, A.; Niggli, U. 2000. Arbuscular mycorrhizae in a long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. *Biol. Fertil. Soils*, 31:150-156.
118. Malloch, D.W.; Pirozynski, K.A. and Raven, P.H. 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of the United State*, 77:2113-2118.
119. Manjarrez, M.J.; Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. 2000. °Biotecnología de la producción de inóculo micorrízico arbuscular y su control de calidad. Eds: A.

- Alarcón y R. Ferrera-Cerrato. In: Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. México: Mundi-Prensa, p. 238-250.
120. Martín, G. M. 2009. Manejo de la inoculación micorrízica arbuscular, la *Canavalia ensiformis* y la fertilización nitrogenada en plantas de maíz (*Zea mays*) cultivadas sobre suelos Ferralíticos Rojos de La Habana. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA. La Habana. p.101.
121. Martínez Viera, R. 2006, Los biofertilizantes y bioestimuladores bacterianos como pilares básicos de la agroecología. Instituto de Investigaciones Fundamentales en la Agricultura Tropical, p.35.
122. Mecinas L.J.; Door R.C.; Chung M.A.; Moreno D.P. 1991. Micorrizas en tres especies forestales de la amazonía peruana. Rev For Perú. 18:29-43.
123. Mederos, J.D. 2009. Evaluación de Sustratos Naturales y la Efectividad de la Cepa de HMA *Glomus hoi* "like" para la Producción de un Inoculante Micorrizógeno Comercial. Tesis presentada en opción al Título Académico de Maestro en Ciencias en Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. p.74.
124. Mederos, J.D.; Rivera, R. y Vázquez, B. 2008. Influencia de las características de los suelos sobre la efectividad de la simbiosis Braquiaria-HMA *Glomus hoi*- like. Memorias del XVI Congreso Científico Internacional del INCA.
125. Mehrotra, V.S. y Baijal, U. 1995. Effects of single and mixed inocula of VAM fungi on the growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Philippine J. Sci, 124:183-201.
126. Mendoza, R.; Goldmann, V.; Rivas, J.; Escudero, V.; Pagani, E.; Collantes, M.; Marbán, L. 2002. Poblaciones de hongos micorrízicos arbusculares en relación con propiedades del suelo y planta hospedante en pastizales de Tierra del Fuego, Ecol Aust, 12:105-116.
127. Miller, S.P. 2000. Arbuscular mycorrhizal colonization of semi-aquatic grasses along a wide hydrologic gradient. New Phytol, 145: 145-155.
128. Moawad, M. 1979. Ecophysiology of vesicular-arbuscular mycorrhizae in the tropics. En: The soil-roots interface. Academic Press. London, p. 197-209.

129. Montilla, E. R.; Rivera, A.; Herrera, R. A. y Fernández, F. 2005. Caracterización espacial-temporal de la micorriza nativa de dos plantaciones de cafeto en Cuba. *Cultivos Tropicales*, vol. 26, no. 4, p. 5-12.
130. Montilla, M.; Monasterio, M. y Sarmiento, L. 2002. Dinámica sucesional de la fitomasa y los nutrientes en parcelas en sucesión-regeneración en un agroecosistema de páramo. *Ecotropicos*, 15 (1): 75-84.
131. Morton, J. B.; Bentivenga, S. P. y Wheeler, W. W. 1993. Germplasm in the international collection of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon*, 48: 491 - 528.
132. Morton, J.P. and Redecker, D. 2001. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycol*, 93:181-195.
133. Mosse, B. and Bowen, G.D. 1968. The distribution of *Endogone* spores in some Australian and New Zealand soils, and in an experimental field soil at Rothamsted. *Trans. Br. Mycol. Soc*, 51: 485-492.
134. Muthukumar, T.; Udaiyan, K., 2002. Growth and yield of cowpea as influenced by changes in arbuscular.
135. Oehl, F.; Sieverding, E.; Ineichen, K; Mader, P.; Boller, T.; Wiemken, A. 2005. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New phytol*, 16:273-283.
136. Ortas, I., and Akpınar, C. 2006. Response of kidney bean to arbuscular mycorrhizal inoculation and mycorrhizal dependency in P and Zn deficient soil. *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci.* 56:101-109.
137. Otero M. J. y Otero I. J. 2002. Serie Gerencia en Odontología Tomo II "Ética y Marketing". Lima, Perú, Julio. Publicación auspiciada por la Asociación Latinoamericana de Gerenciamiento Odontológico.

138. Paneque, V.M. 2002. La fertilización de los cultivos. Aspectos teórico-prácticos para su recomendación. (Folleto). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana. p.28.
139. Paneque, V.M.; Calaña, J.M. 2004, Metodología para la producción de EcoMic. (En arbitraje: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas), p. 13.
140. Paneque, V.M.; Calaña, J. M.; Rivera, R.; Castellanos, E.; Calvo, J. D.; Hernández, R. y Mederos, J. D. 2006. Estudio de la distribución de las raíces de *Brachiaria decumbens* en el perfil del cantero, cuando se utiliza como planta hospedera para la producción de EcoMic[®] y su relación con su contenido de esporas. (documento sin publicar).
141. Paretas. J. (1991). Ecosistema y regionalización de pasto en Cuba. Ministerio de la Agricultura, IIPF. perspectivas. Ciencias nos Tropicos Brasileiros. Serie Agronomía.
142. Pattinsib G.; Sutton B.; McGee P. 1990. Simulated Fire Reduces the Density of Arbuscular Mycorrhizal Fungi at the Soil Surface. *Mycol Res.* 103:491-496.
143. Peña-Venegas, C.; Cardona, G.; Arguelles, J. H. y Arcos, A. L. 2007. Micorrizas Arbusculares del Sur de la Amazonia Colombiana y su Relación con Algunos Factores Físicoquímicos y Biológicos del Suelo. *Acta Amazonica*, vol. 37(3): 327 – 336.
144. Phillips, J. M. y Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, vol. 55, p. 158-161.
145. Phipps, C. J. y T. N. Taylor. 1996. Mixed arbuscular mycorrhizae from the Triassic of Antarctica. *Mycología*, Vol. 88. p. 707 - 714.
146. Porter, W. M.; Robson, A. D.; Abbott, L.K. 1987a. Factors Controlling the Distribution of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Relation to Soil pH. *J Appl Ecol*, 24:663-672.
147. Porter, W. M.; Robson, A. D.; Abbott, L.K. 1987b. Field Survey of the Distribution of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Relation to Soil pH. *J Appl Ecol*, 24:659-662.

148. Rai, M. K. 2001. Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 37: 158 - 167.
149. Ramírez, B. L.; Ramírez, H. F. y Suárez, J. C. 2009. Captura de carbono y desarrollo radicular de sistemas de uso del suelo en la Amazonia Colombiana. *Livestock Research for Rural Development. Volume 21, Article #91*. Retrieved June 30, from <http://www.lrrd.org/lrrd21/6/rami21091.htm>
150. Read, J.; Koucheki, H.K.; Hodgson, J. 1976. VesicularArbuscular Mycorrhiza in Natural Vegetation Systems. *New Phytol*, 77:641-653.
151. Redecker, D. 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73-80.
152. Remy, W.; Taylor, T. N.; Hass, H. y Kerp, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 11841-11843.
153. Rivera, R. 2009. Comunicación personal. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, INCA, Carretera Tapaste, Km 3 ½., San José de las Lajas, La Habana, CP: 32700, Cuba.
154. Rivera, R.; Fernández, F.; Fernández, K.; Ruiz, L.; Sánchez, C. Y Riera, M. 2007. Advances in the management of Effective Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. In: *Mycorrhizae in Crop Production*. Ed: Hamel, Ch. y Plenchette, Ch. New York, p. 151-188
155. Rivera, R.; Fernández, F.; Hernández, A.; Martín, J. R. 2003. La Simbiosis Micorrízica Arbuscular. En: *El manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: El Caribe*. Eds. Rivera, R. y Fernández.
156. Rivera, R.; Ruiz, L.; Sanchez C.; Riera, M.; Fernández, K.; Hernández-Zardón, A.; Plana, R.; Martín G.; Herrera, R.; Gonzalez P. J. y Mirabal, L. 2009. Avances en el manejo efectivo de la inoculación micorrízica en agrosistemas tropicales. *Memorias de la 24 Conferencia de la Red Latinoamericana de Rizobiología*. La Habana.
157. Rodríguez, Y. 2005. Aspectos relacionados con las bases bioquímicas de la simbiosis micorrízica arbuscular. *Cultivos Tropicales*, 26: 11-19.

158. Rodríguez, Y.; Mena, A.; Marentes, F. L. y Fernández, K. 2008. Respuesta de enzimas antioxidantes y crecimiento de vitroplantas de papa micorrizadas In Vitro. *Cultivos Tropicales*, vol. 29, no. 1, p. 29-35.
159. Rodríguez, Y. Tuinen D. y Fernández, K. 2009. Reclasificación taxonómica de dos cepas de hongos micorrizicos arbusculares. *Cultivos Tropicales*, vol. 30, no. 1, p. 31-35
160. Rodríguez, Y.; Quiñones, Y. y Hernández, M. M. 2006. Efecto de la inoculación con tres cepas de hongos micorrizicos arbusculares sobre la aclimatización de vitroplantas de papa (*solanum tuberosum*). *Cultivos Tropicales*, vol. 27, no. 1, p. 19-24.
161. Rubio, R.; Borie, F.; Schalchli, C.; Castillo, C.; Azcón, R. 2002. Plant growth sponses in natural acidic soil as affected by arbuscular mycorrhizal inoculation and phosphorus sources. *J. of Plant. Nutr*, 25: 1389-1405.
162. Ruíz, L. 2001. Efectividad de las asociaciones micorrizicas en especies vegetales de raíces y tubérculos en suelos Pardos y Ferralíticos rojos de la Región central de Cuba. Tesis de Doctorado.. Intituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), p. 95.
163. Ruiz .L, Simó. J Rivera. R y Carvajal. D. 2006. Nuevo método de inoculación con micorrizas en raíces y tubérculos tropicales. XV Congreso Científico Internacional INCA,
164. Sánchez, C. 2001. Uso y manejo de los hongos micorrizógenos y abonos verdes en la producción de posturas de cafeto en algunos suelos del macizo Guamuhaya". Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA, p. 105.
165. Sanchez-Diaz, M.; Honrubia, M. 1994. Water relations and alleviation of drought stress in mycorrhizal plants. *In Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems* (S.Gianninazi and H. Schuepp (eds), Pp167-178. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. ISBN 3-7643-5000-8.
166. Schüßler, A.; Schwarzott, D. and Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota phylogeny and evolution. *Mycological Researc* , 105:1413-1421.

167. Seguel A.; Horlacher R, Eliana R.; Lopez C.; Fernando R.; Espinosa E.; Borie A. 2008. Niveles de glomalina y su relación con características químicas y biológicas del suelo (andisol) en un relicto de bosque nativo del Sur de Chile. *Bosque (Impresa)*, Vol.29 (1):11-22.
168. Sempere y Santamarina. 2001. La aplicación de las micorrizas. Extracto de Artículo de la revista "Agrícola Vergel" , No. 232. p. 198-201.
169. Sieverding, E. 1991. Vesicular Arbuscular Mycorrhiza in Tropical Agrosystem. Deutsche Gesellschaft fur techniische Zusammenarbeit (GTZ) GMBH, federal Republic of Germany, p. 371.
170. Siqueira, J. O. y Franco, A. A. 1988. Biotecnologia do solo. Fundamentos e Perspectiva. MEC-ESAL-FAEPE-ABEAS. Brasilia, D.F , p. 235.
171. Smith, S.E. and Read, D.J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London, p. 605.
172. Smith, S.E. and Read, D. J. 2008. Colonization of roots and anatomy of arbuscular mycorrhizas. Arbuscular Mycorrhizas. *In: Mycorrhizal symbiosis*. Ed. Elsevier. Press Great Britain, p. 42-90.
173. Souchie, E. L.; Azcón, R.; Barea, J. M. ; Saggin-Júnior, O. J. and Ribeiro da Silva, E. M. 2006. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesq. Agrop. Brás*, 41(9): 1405-1411.
174. Strullu, D.G. 1991. Les mycorrhizes des abres et plantes cultivees. *Technique et Documentation*. Paris: Lavoisier.
175. Strullu, G. Diop, T. Plenchette, C. 1997. Réalisation de collections in vitro de Clomus intraradices (Schenck et Smith) et Glomus versiforme (Karsten et Berth) et proposition d'un cycle de developpement. Constitution of in vitro collections: a proposed life cycle of Glomus. *Plant biology and physiology*. 320: 41-47.
176. Swenson, L., W. Dahnke and D. Patterson. 1984. Sampling for soil testing. North Dakota State University, Dept. of Soil Sci., Res. Report N° 8.

177. Sylvia, D.M. 2004. Overview of mycorrhizal symbioses. In: J.O. Siqueira et al. Soil Fertility, Biology and Plant Nutrition Interrelationships. Mexico: Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo, p. 505-513.
178. Sylvia, D.M.; Fuhrmann, J.J.; Hartel, P.G.; Zuberer, D.A. 1998. (eds) Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall, Upper Sadle River, N.J. Chapter III.
179. Sylvia, D. M.; Wilson, D. O.; Graham, J. H.; Maddox, J. J.; Millner, P. Morton, J. B.; Skipper, H. D.; Wright, S. F. and Jarstfet, A. G. 1993. Evaluation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in diverse plants and soils. Soil Biol. Biochem, 25:705-713.
180. Tanaka, Y. and Yano, K. 2005. Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae depends on the form of N supplied. Plant Cell and Environment, 28:1247-1254.
181. Tapia Goné, J. 2003. Identificación de hongos micorrízicos arbusculares aislados de suelos salinos y su eficiencia en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias. Área Biotecnología. Tecomán. Colima.
182. Taylor, T N.; Remy, W.; Hass, H. and Kerp, H. 1995. Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. Mycologia, 87:560-573.
183. Terry, A. 2005. Microorganismos benéficos y productos Bioactivos como alternativas para la producción ecológica de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill. Var. "Amalia"). Tesis presentada en opción la grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. La Habana. INCA.
184. Titus, J.H.; Titus, P.J.; Nowak, R.S. and Smith, S.D. 2002. Arbuscular mycorrhizae of Mojave Desert plant. Western North American Naturalist , 62:327-334.
185. Trouvelot, A.; Kough, J.; Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du Taux de Mycorhization VA d'un Systeme Radiculaire. Recherche de Methodes d'Estimation ayant une Signification Fonctionnelle. Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae, Dijón, 1-5 July, 1985, (V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi, eds.). INRA, Paris, p. 217-222.

186. Usura, O. C.; Castañeda Sánchez, D. y Molano, F. A. 2008. Multiplicación de hongos micorriza arbuscular (HMA) y efecto de la micorrización en plantas micropropagadas de banano (Musa AAA cv. Gran Enano) (Musaceae). Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín, 61(1):4279-4290.
187. Van der Heijden, M.G.; Boller, T.; Wiemken, A.; Sanders, J.A. 1998. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. Ecology, 79 (6): 2082- 2091.
188. Vega, M.C. 2003. Growth of micropropagated bananas colonized by root-organ culture produced arbuscular mycorrhizal fungi entrapped. In Jasfer, A.G. y D.M. Sylvia. Ca-alginate beads. Plant and Soil, 254:329-335.
189. Vega, M; Vega Espinosa, M.; Ramírez de la Ribera J.; Leonard Acosta, I.; Igarza, A. 2006. Rendimiento, caracterización química y digestibilidad del pasto *Brachiaria decumbens* en las actuales condiciones climáticas del Valle del Caucho. Revista Electrónica De Veterinaria REDVET, Vol. VII No. 5. Disponible en <http://www.Veterinaria.org/revistas/redvet>.
190. Verma, N; Chaturvedi S; Sharma, A. K. 2008. Mass multiplication of AMF using soilless substrates. Mycorrhiza News 20(1).p-15.
191. Vierheiling, H.; Alt - Hug, M.; Wiemken, A. y Boller, T. 2001. Hyphal *in vitro* growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* is affected by chitinase but by β 1, 3 - Glucanase. Mycorrhiza, 11 (6): 279 - 282.
192. Vierheiling, H; Lerat, S.; Piché, Y. 2003. Systemic inhibition of arbuscular mycorrhiza development by root exudates of cucumber plants colonized by *Glomus mosseae*. Mycorrhiza, 13: 167-170.
193. Virginia, R.A.; Jenkins, M.B. and Jarrel, W.M. 1986. Depth of root symbiont occurrence in soil. Biol. Fert. Soil, 2: 127-130.
194. Vosatka, M., E. Batkhuugyin and J. Albrechtova. 1999. Response of three arbuscular mycorrhizal fungi to simulated acid rain and aluminium stress. Biol. Plant. 42:289–296.
195. Wang, G.M.; Stribley, D.P.; Tinker, P.B.; Walter, C. 1993. Effects of pH on Arbuscular Mycorrhizal. I. Field Observations on the LongTerm Liming Experiments at Rothamstead and Woburn. New Phytol, 124(3):465-472.

196. Wang, Y., Xiangui, L. and Rui, Y. 2004. Heavy metal uptake by arbuscular mycorrhizas of *Elsholtzia splendens* and the potential for phytoremediation of contaminated soil. *Plant and Soil*, 269(2):225-232.
197. Yano-Melo, A.M.; Trufem, S.F.B. and Maia, L.C. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi in salinized and surrounded areas at the São Francisco Submedium Valley, Brazil. *Hoehnea*, 30(2): 79-87.
198. Zamuner, E., L. Picone y H. Echeverría. 2003. Profundidad de muestreo de suelo: Relación del rendimiento con el fósforo disponible.