

ESTUDIO COMPARADO DE LA EFICACIA DE *G. mosseae* Y LOS ENDOFITOS VA AUTOCTONOS DE DOS SUELOS DE GRANADA*

Por

I. GARCIA-ROMERA y J. A. OCAMPO

SUMMARY

COMPARATIVE STUDY BETWEEN *G. mosseae* AND INDIGENOUS VA ENDOPHYTES FROM TWO SOILS OF GRANADA

The infectivity and efficiency of *G. mosseae*, indigenous VA endophytes and a combination of both endophytes has been studied in two soils of Granada province under sterilized and unsterilized conditions.

The number of VA spores was higher in soil no. 2 than in soil no. 1, but the inoculum potential was similar in both soils. There was a competition between indigenous endophytes and *G. mosseae* in soil no. 1, but no interaction between both in soil no. 2 was observed.

Although indigenous endophyte were as effective as *G. mosseae* on pea growth the need of VA inoculation of soils is discussed.

INTRODUCCION

Las micorrizas vesículo-arbusculares (VA) se encuentran entre las simbiosis mutualistas más extendidas, englobando, quizás, el 90% de todas las especies vegetales conocidas. Estas proporcionan un beneficio claro a las plantas, especialmente a través de un incremento en la captación de fósforo del suelo, dando lugar a un mayor crecimiento de las mismas. (Hayman, 1983). En ensayos de campo se ha observado un efecto beneficioso de las micorrizas VA sobre el crecimiento de las plantas cuando se hacen inoculaciones con cepas del hongo seleccionado previamente en el laboratorio (Jehne, 1980). Sin embargo, a la hora de determinar la necesidad de inocular un suelo hay que tener en cuenta, entre otros factores, el tamaño y efectividad de las poblaciones nativas de hongos VA. El tamaño de las poblaciones de hongos VA se ha venido determinando según el número de esporas presentes en el suelo, para lo cual se han utilizado muchos métodos entre los cuales el más común es el tamizado húmedo (Gerdemann y Nicolson, 1963). Sin embargo, el número de esporas del suelo no está necesariamente relacionado con la intensidad de la infección micorrízica de las plantas

* El presente trabajo se ha realizado con la ayuda económica de la C.A.I.C. y T. (Proyecto número 661/400).

(Hayman y Stovold, 1979). Hay que tener en cuenta que las técnicas de separación conocidas no permiten obtener el número total de esporas. Pero además, las esporas no son la única fuente de inóculo sino que también lo son trozos de micelio o de raíces infectados (Warner y Mosse, 1980), dándose la situación de que plantas que crecen en suelos con una población baja de esporas alcanzan altos niveles de infección. Por ello se ha empezado a utilizar el método del número más probable (Powell, 1980) que permite determinar el número de propágulos infectivos que hay en el suelo.

Evidentemente hay que presuponer la existencia de propágulos naturales de endofitos VA en el suelo, los cuales se pueden encontrar en un número muy bajo (en algunos casos pueden no existir), o bien, aun siendo muy abundantes ser muy poco efectivos, por lo que es conveniente eliminarlos o, cuando esto no sea posible, inocular ese suelo con hongos VA seleccionados por su competitividad en cuanto a rapidez de infección, además de por su eficacia. Cuando la población de hongos VA autóctona sea infectiva y efectiva pero que se encuentran escaso número, lógico es aislar y reproducir estos endofitos en condiciones controladas y utilizarlos como inóculos. Finalmente, si la población de hongos VA nativos son infectivos y efectivos, y se encuentran en gran número, lo conveniente es preservarlos evitando el uso de elementos que pueden afectarlos tales como la aplicación excesiva de fertilizantes químicos o productos fitosanitarios (Roldan-Fajardo, 1985).

MATERIAL Y METODOS

Los suelos se recolectaron en la provincia de Granada en las zonas del cruce de Huelago (suelo núm. 1) y de la Vega (suelo núm. 2). El suelo núm. 1 se utiliza para cultivo de cereales y es de tipo xerochcept calcixerollico, pardo rojizo oscuro, con un pH = 8,4. El suelo núm. 2 forma parte de un terreno utilizado para cultivo de chopos. Es de tipo xerofluvent aquico, pardo grisáceo oscuro, con un pH = 8,1 (Para más detalles ver García-Romera, 1986).

Se realizaron muestreos en los dos suelos para determinar el número de esporas. Para ello se recogieron tres muestras de cada tipo de suelo procedente de cinco parcelas. Cada muestra consistía en cinco submuestras tomadas de los primeros 10 cm de suelo. Después de mezclar bien las submuestras se tomaron 50 g de este suelo y se sometieron a un tamizado húmedo (Gerdemann y Nicolson, 1963), separando los esporocarpos y esporas de los hongos VA (Tamices de 700, 250 y 100 nm). Las fracciones de suelo retenidas en los tamices de 250 y 100 nm se resuspendieron en agua y se depositaron en una placa de recuento (Doncaster, 1962) y los esporocarpos y esporas aparentemente viables se contaron e identificaron por su similitud con las especies conocidas (Gerdemann y Trappe, 1974).

Para la valoración del potencial infectivo de los suelos se utilizó la técnica de diluciones propuesta por Alexander (1965), modificada por Powell (1980) para determinar el número total de propágulos infectivos VA (esporas, hifas o propágulos de raíces infectadas) en los dos suelos. El suelo en cuestión, recogido en el campo, tal como se describe anteriormente se diluye con una mezcla de suelo:arena. (En la proporción 5:2: V/V), utilizando como suelo diluyente el núm. 8 descrito por Barea *et al* (1980), después de esterilizado a vapor fluyente. Se realizaron una serie de diluciones hasta el nivel 10^{-4} , y con los suelos preparados se llenaron macetas de 100 ml de capacidad (5 repeticiones). Todos los suelos se humedecieron hasta alcanzar la capacidad de campo. Se utilizó alfalfa (*Medicago sativa* var. Aragon) como planta indicadora. Inicialmente se plantaron 4 semillas por maceta dejando finalmente 1 cuando germinaron. Las macetas se mantuvieron en invernadero a temperatura 19-25 °C regándolas por capilaridad. Por tanto el suelo problema es el medio de crecimiento así como la fuente de infección VA para las plantas. Después de 6 semanas las plantas de todos los niveles de dilución se lavaron, clarificaron, tiñieron (Phillips y Hayman, 1970) y se examinaron para determinar la presencia o ausencia de infección VA.

El número más probable de propágulos VA se consideró (Tabla 100-1: Alexander, 1965) como el valor correspondiente al número de plantas que se micorrizaron en cada nivel de dilución sucesiva. Los resultados se expresan como número de propágulos por gramo de suelo.

Para la determinación de la necesidad de inocular los suelos se tomaron dos porciones de cada tipo de suelo, una provista de propágulos de micorriza (suelo natural) y la otra exenta de estos, previa esterilización y reposición de los microorganismos autóctonos.

En ambos suelos se estudio el efecto de un isotipo de *G. mosseae* procedente de la Estación Experimental de Rothamsted (Inglaterra). El inóculo consistió en 5 g de suelo con esporas, micelio y trozos de raíces infectadas procedentes de la rizosfera de plantas con micorrización controlada. Así por cada tipo de suelo se tienen cuatro tratamientos: Suelo esterilizado (control sin micorriza), suelo esterilizado inoculado con *G. mosseae* (micorriza introducida), suelo no esterilizado (micorriza nativa), suelo esterilizado inoculado con *G. mosseae* (micorriza nativa más micorriza introducida).

Se utilizó guisante (*Pisum sativum* var. Lincoln) como planta indicadora. Las plantas crecieron en invernadero, en las condiciones descritas anteriormente, en macetas de 500 ml de capacidad en una, mezcla suelo:arena (en la proporción 5:2 V/V). Inicialmente se plantaron 2 semillas por maceta dejando finalmente 1 cuando germinaron. Después de 6 semanas se tomaron muestras de las raíces, se tiñieron. (Phillips y Hayman, 1970) y se evaluó el porcentaje de longitud de raíces infectadas mediante el método de intersección de trozos de raíces en una placa cuadrículada, descrita por Giovannetti y Mosse, (1980).

Con los datos de peso seco de las plantas se calculó el efecto sobre

el crecimiento de la parte aérea, raíz y relación parte aérea/raíz en cada tratamiento y tipo de suelo.

RESULTADOS

En la Tabla I se observa que el potencial micorrízico así como el tipo de esporas de los suelos núm. 1 y núm. 2 son similares, predominando las esporas semejantes al género *G. fasciculatum* (Gerdemann y Trappe, 1974). Sin embargo, el número de esporas fue significativamente superior en el suelo núm. 2.

TABLA I

Poder infectivo, número y tipo de esporas de hongos VA (en 50 g de suelo) en los suelos núm. 1 y núm. 2.

Suelos	Núm. de propágulos por g de suelo*	Esporas**	
		Tipo	Núm.
Núm. 1	65 ± 13,6	<i>G. fasciculatum</i>	30 ± 8,8
		<i>G. mosseae</i>	20 ± 5,8
		No identificadas	5 ± 1,4
Núm. 2	60 ± 11,2	<i>G. fasciculatus</i>	175 ± 5,1
		<i>G. mosseae</i>	5 ± 1,2
		No identificadas	15 ± 4,4

* Cada valor es la media de 5 repeticiones, y corresponde a 50 g de suelo.

** Cada valor es la media de tres repeticiones. Se da la desviación standard.

Por otro lado las plantas de guisante que crecieron en los suelos inoculados o no estériles fueron significativamente superiores en su parte aérea a los controles (Tablas II y III). Como se observa en la Tabla II las plantas de guisante cultivadas en el suelo núm. 1 no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos EI y NE tanto en efecto sobre el crecimiento (parte aérea y raíz), ni sobre el nivel de micorrización alcanzada. El efecto sobre la relación parte aérea/raíz fue ligeramente superior en el suelo no esterilizado (NE). Sin embargo, en el suelo no esterilizado inoculado con *G. mosseae* (NEI), el crecimiento de las plantas de guisante, la relación parte aérea/raíz y el porcentaje de infección alcanzada, fueron significativamente inferiores a los dos tratamientos anteriores (EI y NE).

En el suelo núm. 2 (Tabla III) no hay diferencia significativa entre los tratamientos EI, NEI y NE en su efecto sobre el crecimiento, la relación parte aérea/raíz y el porcentaje de longitud de raíces infectadas.

TABLA II

Porcentaje de longitud de raíces infectadas, peso seco (parte aérea y raíz), y relación parte aérea/raíz de guisante crecido en el suelo núm. 1 en diferentes tratamientos.

Tratamientos	Peso seco (mg)		Relación parte aérea/raíz	% longitud de raíz infectada
	Parte aérea	Raíz		
E	236 ± 21,7	400 ± 86,8	0,59 ± 0,05	0
EI	356 ± 21,2	386 ± 21,5	0,92 ± 0,1	66 ± 15,2
NE	358 ± 11,4	308 ± 87,9	1,16 ± 0,13	40 ± 17,6
NEI	280 ± 15,3	364 ± 14,4	0,76 ± 0,11	19 ± 1,9

Cada valor es la media de 5 repeticiones. E = suelo estéril, EI = suelo estéril inoculado con *G. mosseae*, NE = suelo no estéril, NEI = suelo no estéril inoculado con *G. mosseae*. Se da la desviación standard.

TABLA III

Porcentaje de longitud de raíces infectadas, peso seco (Parte aérea y raíz), y relación parte aérea/raíz de guisante crecido en el suelo núm. 2 en diferentes tratamientos.

Tratamientos	Peso seco (mg)		Relación parte aérea/raíz	% longitud de raíz infectada
	Parte aérea	Raíz		
E	268 ± 14,3	392 ± 10,4	0,68 ± 0,04	0
EI	330 ± 29,8	398 ± 81,3	0,82 ± 0,25	74,8 ± 19,1
NE	306 ± 23,2	332 ± 20,4	0,92 ± 0,18	46,7 ± 13,2
NEI	358 ± 39,6	254 ± 63,2	1,40 ± 0,34	54 ± 14,2

Cada valor es la media de 5 repeticiones. E = suelo estéril, EI = suelo estéril inoculado con *G. mosseae*, NE = suelo no estéril, NEI = suelo no estéril inoculado con *G. mosseae*. Se da la desviación standard.

DISCUSION

La población de endofitos VA presentó características diferentes en los dos suelos estudiados, pues, a pesar de que en el suelo núm. 2 se encontró mayor número de esporas, su poder infectivo no varió con respecto al suelo núm. 1. Este hecho hace pensar en la existencia de un mayor número de propágulos infectivos, que no son esporas, en el suelo

núm. 1, ya que el recuento de esporas no permite evaluar la contribución de raíces infectadas (Hayman y Stovold, 1979), hifas (Warner y Mosse, 1980) y vesículas (Biermann y Linderman, 1983) en la infectividad producida por micorrizas VA. O bien, que los endofitos existentes en el suelo núm. 1 sean más infectivos que los del suelo núm. 2. Por otro lado, también cabe pensar que el poder infectivo del suelo núm. 2 sea mayor que el detectado por la técnica del número más probable ya que esta técnica no siempre permite detectar la presencia de todos los propágulos existentes en el suelo (Morton, 1985). En efecto, la infección producida por *G. oculatum* o *G. epigaeum*, por ejemplo, apenas se tiñen, poco después de penetrar en la raíz (Schenck y Smith, 1982).

En ambos suelos predomina el mismo género de esporas, sin embargo, el número es diferente. Este hecho quizás se deba a que el suelo núm. 1 se ha utilizado para cultivo intensivo de cereales, mientras que el suelo núm. 2, al ser utilizado para cultivos de chopos, no se ha manipulado en mucho tiempo. Se sabe que en suelos a los que no se ha sometido a ningún tipo de alteración la población de endofitos VA es mayor (Cardona y Ocampo, 1985). Sin embargo, en suelos cultivados la población indígena presenta mayor grado de adaptación y posiblemente mayor grado de eficacia (Hayman, 1983).

No se puede hacer generalizaciones acerca de la influencia de la población VA indígena sobre los endofitos introducidos, pues hay autores que observan una competencia entre endofitos nativos e introducidos (Hayman, 1983), mientras que otros encuentran un sinergismo entre ambos (Barea et al., 1980) y finalmente otros no observan ningún tipo de interacción (Cardona y Ocampo, 1985). En nuestros ensayos se aprecia que la interacción entre endofitos autóctonos e introducidos (*G. mosseae*, isotipo de la E.E. de Rothamsted) varía según el tipo de suelo, pues hay una competición entre ambos tipos de endofitos en el suelo núm. 1, mientras que, en el suelo núm. 2 no hay interacción negativa, si bien, tampoco hay sinergismo, a pesar de que en ambos suelos predomina el género *G. fasciculatum* (Gerdemann y Trappe, 1974), y que en el suelo núm. 2 la población fúngica es mayor que en el suelo núm. 1. Este tipo de prueba parece aportar los datos precisos para determinar la necesidad o no, de inocular los suelos (Roldan-Fajardo, 1985). Según nuestros resultados no es necesario inocular ninguno de los dos suelos ya que la población autóctona VA es lo suficientemente infectiva y efectiva sobre el crecimiento de las plantas, al menos, comparada con *G. mosseae*, especialmente la del suelo núm. 1 en donde su efectividad (considerando la relación parte aérea/raíz como indicador) es mayor que la de *G. mosseae* a pesar de que el nivel de infección es inferior, aunque no significativamente, que la alcanzada por *G. mosseae*. Esto indica que, no necesariamente el endofito más infectivo es el más efectivo (Clarke y Mosse, 1981). De hecho, se ha encontrado que plantas con un mismo porcentaje de longitud de raíz infectada difieren en el porcentaje de actividad metabólica de los endofitos VA (Ocampo y Barea, 1985).

Sin embargo, a la hora de determinar la necesidad de inocular un suelo, no solo hay que tener en cuenta el efecto de los endofitos VA sobre el crecimiento de las plantas, sino también una serie de factores, manipulados por el hombre o no, que pueden influir sobre las plantas de forma que un endofito que parecía el adecuado deje de serlo. De hecho los endofitos indígenas fueron más sensibles que *G. mosseae* a la acción del herbicida MCPA (García-Romera y Ocampo, 1987).

RESUMEN

Se hace un estudio comparativo entre *G. mosseae* y los endofitos autóctonos de dos suelos de la provincia de Granada, determinando la capacidad de infección y la eficacia de la misma producida por *G. mosseae*, por los endofitos VA indígenas o por la combinación de ambos, en suelos esterilizados y no esterilizados.

La población de esporas fue superior en el suelo núm. 2, pero el potencial micorrízico fue similar en ambos suelos. Sin embargo, se observó una competición entre los endofitos autóctonos del suelo núm. 1 y *G. mosseae* mientras que en el suelo núm. 2 no hubo ningún tipo de interacción.

A pesar de que los endofitos autóctonos fueron tan efectivos como *G. mosseae* sobre el crecimiento de guisante, se discute la necesidad de inocular ambos suelos.

Estación Experimental del Zaidín, C. S.I.C.
18008-Granada, España

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, M. (1985). Most probable number method for microbial populations. En: Methods of Soil Analysis, Part. 2. Chemical and Microbiological Properties (Ed. Black et al.) pp. 1467-1472. *Am. Soc. Agro. U.S.A.*
- BAREA, J. M., ESCUDERO, J. L. y AZCON-AGUILAR, C. (1980). Effects of introduced and indigenous VA mycorrhizas fungi on nodulation, growth and nutrition of *Medicago sativa* in phosphate fixing soils as affected by P fertilizers. *Plant Soil*, 54, 283-296.
- BIERMAN, B. y LINDERMAN, R. G. (1983). Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New phytol.* 95, 97-105.
- CARDONA, L. F. y OCAMPO, J. A. (1985). Estudio de la posible utilización de micorrizas VA como fertilizantes biológicos en dos suelos. *Anal. Edaf. Agrobiol.* 94, 453-462.
- CLARKE, C. y MOSSE, B. (1981). Plant growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza, XII. Field inoculation responses of barley at two Soil-P-levels. *New Phytol.* 27, 695-703.
- DONCASTER, C. C. (1962). A counting dish for nematodes. *Nematologica*, 7, 334-337.
- GARCIA-ROMERA, I. (1986). Interacción entre dos herbicidas y micorrizas vesículo-arbusculares y su repercusión en el crecimiento de guisante (*Pisum sativum*). Memoria Licen. Univ. Granada.
- GARCIA-ROMERA, I. y OCAMPO, J. A. (1987). Effect of MCPA herbicide on VA mycorrhizal infection and growth of *pisum sativum*. *Biol. Fert. Soils*. (En prensa).
- GERDEMANN, J. W. y NICOLSON, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 234-235.
- GERDEMANN, J. W. y TRAPPE, J. M. (1974). The Endogonaceae in the Pacific North-West. *Mycologia Memoir* 5.

- GIOVANNETTI, M. y MOSSE, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots, *New Phytol.* 84, 489-500.
- HAYMAN, D. S. (1983). The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis, *Can. J. Bot.* 61, 944-963.
- HAYMAN, D. S. y STOVOLD, G. E. (1979). Spore populations and infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in *New South Wales*, *Aust. J. Bot.* 27, 227-233.
- JEHNE, W. (1980). Endomycorrhizas and the productivity of tropical pastures. The potential for improvement and its practical realization, *Trop. Grassl.* 14, 202-209.
- MORTON, J. B. (1985). Underestimation of most probable numbers of vesicular-arbuscular endophytes because of non-staining mycorrhizal, *Soil Biol. Biochem.* 17, 383-384.
- OCAMPO, J. A. y BAREA, J. M. (1985). Effect of carbamates herbicides mycorrhizal infection and plant growth, *Plant Soil.* 85, 375-383.
- PHILLIPS, J. M. y HAYMAN, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection *Trans. Br. mycol. Soc.* 55, 158-161.
- POWELL, C. L. (1980). Mycorrhizal infectivity of eroded soils, *Soil Biol. Biochem.* 12, 247-250.
- ROLDAN-FAJARDO, B. E. (1985). Micorrizas VA en cultivos arboreos: Almendro, naranjo y olivo. Tesis Univ. Granada.
- SCHENCK, N. y SMITH, G. S. (1982). Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (*Endogonaceae*) from Florida, *Mycologia.* 74, 77-92.
- WARNER, A. y MOSSE, B. (1980). Independent spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil, *Trans. Br. mycol. Soc.* 74, 407-410.

Recibido: 22-VI-87

Aceptado: 1-IX-87