

ESTUDIO DE LA POSIBLE UTILIZACION DE MICORRIZAS VA COMO FERTILIZANTES BIOLÓGICOS EN DOS SUELOS*

Por

L. F. CARDONA** y J. A. OCAMPO

Departamento de Microbiología, Estación Experimental del Zaidin, Granada.

SUMMARY

STUDY OF THE POSSIBLE USE OF VA MYCORRHIZAS AS BIOLOGICAL FERTILIZERS IN TWO SOILS

The possible use of VA mycorrhizas as biological fertilizers in two soils was studied. Among the different VA endophyte-plant combinations used, *Glomus sp.* Lavender was selected both by its VA infection level and plant growth effect. Afterwards, the effectivity and resistance of *Glomus sp.* against P fertilizers and the interaction with the indigenous endophytes of these soils were tested. The effect of *Glomus sp.* on Lavender growth was higher than of the P fertilizers, especially in soil n.º 1, but the addition of P fertilizers at higher doses decreased the VA infection level, and in soil n.º 2 its effect on plant growth. On the other hand, competition between *Glomus sp.* and indigenous VA endophytes were observed, in soil n.º 1 but no interaction in soil n.º 2 were appreciated. The need of inoculation of VA endophytes in both soils is discussed.

INTRODUCCION

Las micorrizas vesículo-arbusculares (VA) son simbiosis mutualísticas entre las raíces de la mayoría de las plantas y hongos pertenecientes a la familia *Endogonaceae*. Estas favorecen el crecimiento de las plantas ya que juegan un papel fundamental en la captación de fosfato y otros elementos por la misma (Barea y Azcón-Aguilar, 1983; Harley y Smith, 1983).

Otro aspecto importante a considerar sobre la actuación de las micorrizas VA en su influencia en la colonización de nuevos habitats (Trappe y Awameh, 1981). En efecto, se ha observado que intervienen en la estabilización de dunas mediante la formación de agregados de arena por el micelio fúngico y, por otro lado, también intervienen en la mejora de la estructura del suelo mediante la acción cementante de polisacáridos bacterianos (Koske *et al.*, 1975; Clought y Sutton, 1977; Barea y Azcón-Aguilar, 1983). En ensayos de campo se ha observado el efecto beneficioso de las micorrizas VA sobre el crecimiento de las plantas cuan-

* El presente trabajo se ha realizado con la ayuda económica recibida de la C.A.I.C. y T. (proyecto n.º 1759).

** Departamento de Microbiología, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

do se hacen inoculaciones con cepas del hongo seleccionado previamente en el laboratorio (Hall y Armstrong, 1979; Jehne, 1980) lo que permite la posibilidad de utilizar estos hongos VA en la revegetación de zonas erosionadas con la consiguiente mejora en la productividad agrícola. Sin embargo, las dificultades de llevarlo a la práctica con cierta posibilidad de éxito son considerables ya que las plantas pueden desarrollar infecciones mezcladas mediante el predominio del endofito VA introducido o del endofito indígena el cual es generalmente poco efectivo (Harley y Smith, 1983). Es necesario por tanto que el hongo a inocular tenga una gran capacidad competitiva pero además que posea una gran eficacia en la adsorción de nutrientes. Se sabe que cualquier especie de endofito VA puede virtualmente infectar a cualquier planta pero su efectividad varía según su preferencia por unos suelos o plantas determinadas, su capacidad directa para estimular el crecimiento de las plantas, su nivel de infección y su tolerancia a la aplicación de productos químicos incluidos los fertilizantes (Hayman, 1983).

Teniendo en cuenta estos factores se pretende ver la posibilidad de utilizar hongos micorrizicos VA como fertilizantes biológicos en dos suelos de la provincia de Granada.

MATERIAL Y METODOS

Los suelos se recolectaron en la provincia de Granada en las zonas de la Vega (suelo n.º 1), suelo sometido a un cultivo intensivo, y en la zona del Cerro de San Miguel (suelo n.º 2) en cuyo lugar no se ha practicado ningún cultivo durante mucho tiempo. El suelo n.º 1 posee un pH = 8,1, 630 ppm de N total, 9 ppm de P (según el método de Olsen) y 218 ppm de K total; el suelo n.º 2 posee un pH = 8,2, 770 ppm de N, 6 ppm de P y 82 ppm de K.

Recuento de esporas y evaluación de micorrizas VA en suelo

Se realizó un muestreo en el suelo n.º 2 para determinar el número de esporas y el porcentaje de longitud de raíces infectadas. Para ello se recogieron tres muestras de suelo en 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) para separar las raíces (Tamiz de 700 μ), esporocarpos y esporas del hongo VA (Tamices de 250 y 100 μ). Las raíces se tiñeron (Phillips y Hayman, 1970) y se evaluó el porcentaje de longitud de raíces infectadas (Giovannetti y Mosse, 1980). La fracción de suelo retenida en los tamices de 250 y 100 μ 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 especies conocidas (Mosse y Bowen, 1968; Gerdemann y Trappe, 1974).

Experimento n.º 1

Para determinar la combinación planta-endofito VA más efectiva se utilizaron las plantas: Maíz (*Zea mays*), Alfalfa (*Medicago sativa*), Lavandula (*Lavanda spica*) y Prosopis (*Prosopis chilensis*) las cuales se inocularon con los endofitos: *Glomus mosseae*, *Gl. fasciculatus* y *Gl. sp.* (aislado en nuestro laboratorio). Las plantas se cultivaron en macetas con una mezcla de suelo-arena (1:1, v/v) previamente esterilizados a vapor fluente. Los inóculos consistieron en 5 g de suelo rizosférico por maceta, el cual contenía esporas, micelio y trozos de raíces infectadas. A los tratamientos testigo se les restauró la población microbiana natural de esos suelos excepto los propágulos de *Endogonaceae*. Las plantas crecieron en el invernadero a temperatura de 19-25° C durante 12 semanas, tras lo cual se tomaron muestras de las raíces, se tiñieron y se determinó el porcentaje de raíces infectadas de la misma forma que la descrita anteriormente.

Experimento n.º 2

Con la combinación *Glomus sp.*—Lavandula se estudio la aplicación de fertilizante soluble de P. Para ello se utilizó $\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{K}$ que fue adicionado a las dosis de 0, 150, 250 y 370 mg K^{-1} lo que equivale a aplicaciones de 0, 20, 35 y 50 Kg ha^{-1} calculadas en base a superficies. Después de dejar equilibrar las muestras (ver Barea *et al.*, 1983) se determinó su contenido en P soluble (según Olsen *et al.*, 1954) que en los distintos tratamientos fue 5,5, 23,44 y 66 mg Kg^{-1} en el suelo n.º 1 y 3,2, 21, 42 y 60 mg Kg^{-1} en el suelo n.º 2. Al cabo de 12 semanas se determinó el peso seco de las plantas, contenido en P y el porcentaje de longitud de raíces infectadas por los procedimientos descritos anteriormente.

Experimento n.º 3

Con la combinación *Glomus sp.*—Lavandula se procedió a determinar la necesidad de inocular ambos suelos con endofitos VA. Para ello se realizaron los siguientes tratamientos: Suelo estéril (E), suelo estéril inoculado (EI), suelo no estéril (NE) y suelo no estéril inoculado (NEI). A las 12 semanas de crecimiento de las plantas se determinaron los mismos parámetros que en el experimento n.º 1.

RESULTADOS

En el suelo n.º 2 se contabilizó una población de 78 ± 23 esporas por cada 100 g de suelo, de las que predominaban aquellas similares a las del género *Glomus fasciculatus* (Gerdemann y Trappe, 1974). Así mismo se observó un $72 \pm 12\%$ de longitud de raíz infectada por los endofitos VA

TABLA I

Porcentaje de longitud de raíces infectadas con los diferentes endofitos VA y peso seco de las plantas crecidas en el suelo n.º 1

Endofito inoculado	Maíz		Lavandula		Alfalfa		Prosopis	
	Peso seco (mg)	% longitud raíz infectada	Peso seco (mg)	% longitud raíz infectada	Peso seco (mg)	% longitud raíz infectada	Peso seco (mg)	% longitud raíz infectada
Sin inocular	1898±50	0	90±30	0	65±25	0	198±39	0
G. mosseae	2443±46	50±10	217±20	51±5	240±39	45±7	263±51	48±9
G. fasciculatus	2459±49	49±6	196±7	47±13	741±112	53±6	266±59	49±2
Glomus sp.	2493±37	50±4	288±40	45±4	599±141	48±3	243±25	48±19

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

Porcentaje de longitud de raíces infectadas con los diferentes endofitos VA y peso seco de las plantas crecidas en el suelo n.º 2.

Endofito inoculado	Maíz		Lavandula		Alfalfa		Prosopia	
	Peso seco (mg)	% longitud raíz infectada	Peso seco (mg)	% longitud raíz infectada	Peso seco (mg)	% longitud raíz infectada	Peso seco (mg)	% longitud raíz infectada
Sin inocular	1200±70	0	28± 5	0	48± 0,8	0	194±20	0
G. mosseae	1691±44	49±30	149±30	44±15	236± 57	53±3	295±36	49± 2
G. fasciculatus	1618±40	57± 4	155±30	41± 9	316± 42	50±2	315±59	64±13
Glomus sp.	1618±48	50± 8	217±16	40±10	311±111	56±9	378±48	48± 5

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

TABLA III

Porcentaje de raíces infectadas con Glomus sp., peso seco y contenido en P de lavandula crecida en los suelos n.º 1 y 2 con diferentes concentraciones de fosfatos soluble

Suelos	Concentraciones de P en suelo (mg Kg ⁻¹)	- Micorrizas			+ Micorrizas		
		Peso seco parte aérea (mg)	Contenido en P (% materia seca)	Peso seco parte aérea (mg)	Contenido en P (% materia seca)	% longitud raíz infectada	
n.º 1	5,5	31 ± 7	0,04	123 ± 10	0,25	68 ± 5	
	23	41 ± 8	0,06	130 ± 20	0,47	67 ± 3	
	44	47 ± 8	0,06	113 ± 12	0,49	52 ± 2	
	66	63 ± 10	0,08	100 ± 14	0,51	47 ± 7	
n.º 2	3,2	22 ± 4	0,04	171 ± 10	0,20	69 ± 11	
	21	123 ± 7	0,24	182 ± 12	0,40	67 ± 8	
	42	130 ± 19	0,28	134 ± 16	0,49	58 ± 6	
	60	150 ± 9	0,30	102 ± 4	0,55	45 ± 4	

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

autóctonos. Datos similares aunque con menor número de esporas se encontraron en el suelo n.º 1 (ver Rodán-Fajardo *et al.*, 1982).

En las Tablas I y II se observa que no hay diferencia significativa en el porcentaje de infección de las plantas ensayadas. Sin embargo, la acción de los distintos endofitos sobre el peso seco de las plantas fue similar excepto en alfalfa en la que *Glomus fasciculatus* y *Glomus sp.* tuvieron mayor efecto y en Lavandula en la que destacó la acción de *Glomus sp.* Mientras que en el suelo n.º 2 las plantas de Lavandula fueron significativamente superiores cuando se inocularon con *Glomus sp.*

Como se puede observar en la Tabla III el peso seco de las plantas micorrizadas fue significativamente superior a las no micorrizadas en ambos suelos, pero a medida que se incrementa la aplicación de fósforo la diferencia entre plantas micorrizadas y no micorrizadas se atenúan siendo significativa en el suelo n.º 2 a las dosis más elevadas. La aplicación de dosis crecientes de P decreció la micorrización en ambos suelos y en el suelo n.º 2 disminuyó su efecto sobre el crecimiento de Lavandula.

Por otro lado, se observa (Tabla IV) que las plantas de Lavandula crecidas en suelos inoculados o no estériles fueron superiores a los controles no inoculados (Tratamiento E). En el suelo n.º 1 no hay diferencia significativa entre las plantas crecidas en suelo estéril inoculado con las crecidas en suelo no estéril. Sin embargo, las plantas crecidas en suelo no estéril inoculado con *Glomus sp.*, fueron significativamente inferiores a los dos tratamientos anteriores. No hay diferencia significativa en el porcentaje de longitud de raíces infectadas entre los tratamientos EI y NEI, siendo significativamente inferior el de las raíces de Lavandula

TABLA IV

Porcentaje de longitud de raíces infectadas y peso seco de lavandula crecida en los suelos n.º 1 y 2 en diferentes tratamientos

Tratamientos	Suelo n.º 1		Suelo n.º 2	
	Peso seco (mg)	% longitud de raíz infectada	Peso seco (mg)	% longitud de raíz infectada
E	105±30	0	27±5	0
EI	302±58	62±5	193±31	70±8
NE	223±37	45±6	44±12	31±4
NEI	155±22	58±8	144±44	57±5

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

crecidas en el tratamiento NE. En el suelo n.º 2 las plantas que crecieron en los suelos inoculados significativamente superiores a las crecidas en suelo no estéril tanto en peso seco como en el porcentaje de longitud de raíz infectada.

DISCUSION

No hay una relación estrecha entre el nivel de infección fúngica, que fue similar en los distintos tratamientos (Tabla I y II), y su efecto sobre el crecimiento de las plantas. No necesariamente el endofito más infectivo es el más efectivo (Clarke y Mosse, 1981), de hecho, se ha encontrado que plantas diferentes con un mismo porcentaje de infección VA difieren en el porcentaje de su actividad metabólica (Ocampo y Barea, 1985). Hay otros factores que también condicionan la efectividad de la simbiosis VA, uno de los más importantes es la interacción entre el tipo de hongo VA y el tipo suelo (Hayman, 1983). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales la efectividad de la simbiosis VA tampoco depende del tipo de suelo sino que parece estar más influenciada por la capacidad que tiene un endofito determinado "per se" de estimular el crecimiento de la planta".

Al igual que han observado otros autores, la micorrización estimula el crecimiento de las plantas cuando los niveles de fosfato soluble en el suelo son bajos o intermedios (Barea *et al.*, 1983). El hecho de que las plantas micorrizadas fueran superiores a las no micorrizadas crecidas en suelos con dosis crecientes de fosfato pone de manifiesto la gran dependencia de la Lavandula a la micorrización y la gran efectividad del endofito *Glomus sp.* frente a la aplicación de fertilizantes fosforados, especialmente en el suelo n.º 1.

Por otro lado, 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 los endofitos nativos e introducidos (Powell, 1979; Hayman, 1983), mientras que otros observan un sinergismo entre ambos (Barea *et al.*, 1980). En nuestros ensayos se observa que varía según el tipo de suelo, pues hay una competición entre ambos tipos de endofitos en el suelo n.º 1, mientras que en el suelo n.º 2 no hay interacción negativa si bien tampoco hay sinergismo entre ambos (Tabla III), a pesar de que en el suelo n.º 1 se ha encontrado una población fúngica menor (Rodán-Fajardo *et al.*, 1982) que en el suelo n.º 2, debido quizás a que en el suelo n.º 1 ha sido cultivado intensivamente mientras que en el suelo n.º 2 no. Se sabe que en suelos a los que no se les ha sometido ningún tipo de disturbio la población fúngica es mayor (Reeves *et al.*, 1979; Allen y Allen, 1980). Sin embargo, en suelos cultivados la población indígena presenta un mayor grado de adaptación y posiblemente mayor grado de eficacia (Hayman, 1983). Indudablemente el nivel de infección alcanzado por los endofitos nativos en el invernadero fue superior en el suelo n.º 1 que en el n.º 2, así como su efecto sobre el crecimiento, indicando la

necesidad de inocular endofitos VA en el suelo n.^o 2 mientras que en el suelo n.^o 1 es necesario encontrar otro tipo de endofito que se adapte mejor a dicho suelo.

Si bien, los datos obtenidos en este trabajo indican la efectividad de la simbiosis *Glomus sp.*—Lavandula en la posible revegetación del suelo n.^o 2 y el consiguiente ahorro de empleo de fertilizantes fosforados, es necesario comprobar el grado de eficacia de esta simbiosis en condiciones de campo.

RESUMEN

Se ha estudiado la posible utilización de micorrizas vesículo-arbusculares (VA) como fertilizantes biológicos en dos suelos. Para ello se ensayaron distintas combinaciones endofito VA-planta de las que se seleccionó la de *Glomus sp.*—Lavandula como la más adecuada por los niveles de infección VA alcanzada conjuntamente con su efecto sobre el crecimiento de la planta. Posteriormente, utilizando la combinación *Glomus sp.*—Lavandula se estudió la efectividad y resistencia de *Glomus sp.* frente a los abonos fosforados así como su comportamiento frente a los endofitos indígenas de estos suelos. *Glomus sp.* tuvo mayor efecto sobre el crecimiento de Lavandula que la adición de fertilizantes fosforados, especialmente en el suelo n.^o 1, si bien la aplicación de las dosis más elevadas de fertilizantes disminuyeron la infección VA, y en el suelo n.^o 2 también su efecto sobre el crecimiento de Lavandula. Por otro lado se observó una competición entre *Glomus sp.* y los endofitos indígenas en el suelo n.^o 1 mientras que en el suelo n.^o 2 no hubo interacción entre ambos. Se discute sobre la necesidad de inocular los dos suelos.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, E. B. y ALLEN, M. F. (1980). Natural reestablishment of vesicular-arbuscular mycorrhizas following stripmine reclamation in Wyoming. *J. Appl. Ecol.*, **17**, 139-147.
- BAREA, J. M. y AZCON-AGUILAR, C. (1983). Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. In: *Advances in Agronomy*, **36**, 1-54.
- BAREA, J. M., AZCON-AGUILAR, C. y AZCON, R. (1983). Efecto de la interacción de fertilizantes de P y micorrizas sobre la nodulación, micorrización, crecimiento y nutrición de la alfalfa (*Medicago sativa L.*). *Ciencia del Suelo*, **1**, 39-43.
- BAREA, J. M., ESCUDERO, J. L. y AZCON-AGUILAR, C. (1980). Effects of introduced and indigenous VA mycorrhizal fungi on nodulation, growth and nutrition of *Medicago sativa* in phosphate fixing soils as affected by P fertilizers. *Plant Soil*, **54**, 283-296.
- CLARKE, C. y MOSSE, B. (1981). Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza 12. Field inoculation response of barley at two soil-P-levels. *New Phytol.*, **87**, 695-603.
- CLOUGH, K. S. y SUTTON, J. C. (1978). Direct observation of fungal aggregates in sand dune soil. *Can. J. Microbiol.*, **24**, 333-335.
- DONCASTER, C. C. (1962). A counting dish for nematodes. *Nematol.*, **7**, 334-337.
- GERDEMANN, J. W. y NICOLSON, J. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. mycol. Soc.*, **46**, 235-244.
- GERDEMANN, J. W. y TRAPPE, J. M. (1974). The *Endogonaceae* in the Pacific Northwest. *Mycologia Memoir*, **5**.
- GIOVANNETTI, M. y MO:
arbuscular mycorrhiza

- HALL, I. R. y AMSTRONG, P. (1979). Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizas on growth of white clover, lotus and ryegrass in some eroded soils. *N. Z. J. Agric. Res.*, *22*, 479-484.
- HARLEY, J. L. y SMITH, S. E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. Acad. Press, London-New York.
- HAYMAN, D. S. (1983). The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Can. J. Bot.*, *61*, 944-963.
- JEHNE, W. (1980). Endomycorrhizas and the productivity of tropical pastures. The potential for improvement and its practical realization. *Trop. Grassl.*, *14*, 202-209.
- KOSKE, R. E., SUTTON, J. C. y SHEPPARD, B. R. (1975). Ecology of *Endogone* in lake Huron sand dunes. *Can. J. Bot.*, *53*, 87-89.
- MOSSE, B. y BOWEN, G. D. (1968). A key to the recognition of some *Endogone* spore types. *Trans. Br. mycol. Soc.*, *51*, 469-483.
- OCAMPO, J. A. y BAREA, J. M. (1985). Effect of carbamate herbicides on VA mycorrhizal infection and plant growth. *Plant Soil*, *85*, 375-383.
- OLSEN, S. R., COLE, C. V., WATANABE, F. S. y DEAN, L. A. (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *Circ. U. S. Dep. Agric.*, 939.
- 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. LL. (1979). Spread of mycorrhizal fungi through soil. *N. Z. J. Agric. Res.*, *22*, 335-339.
- REEVES, F. B., WAGNER, D., MOORMAN, T. y KIEL, J. (1979). The role of endomycorrhizas in revegetation practices in the semi-arid west. I. Comparison of incidence of mycorrhizae in severely disturbed VS natural environment. *Am. J. Bot.*, *66*, 6-13.
- ROLDAN-FAJARDO, B. E., BAREA, J. M., OCAMPO, J. A. y AZCON-AGUILAR, C. (1982). The effect of season on VA mycorrhiza of the almond tree and of phosphate fertilization and species of endophyte on its mycorrhizal dependency. *Plant Soil*, *68*, 361-367.
- TRAPPE, J. M. y AWAMEH, M. S. (1981). *Mycorrhizae and productivity of systems for arid and semiarid lands*. Ed. by J. T. Manassah and E. J. Briskey. Acad. Press, New York. pp. 581-596.