

EFFECTO DE LA MICORRIZOSFERA EN EL DESARROLLO DE DOS PLANTAS FORRAJERAS

Susana Schweizer¹, Eduardo Salas², Rocío Bejarano¹, Marco Vinicio Castro¹, Beatriz Sandoval¹

RESUMEN

Se agregó un inóculo consistente de suelo rizosférico de *Cratylia argentea*, a un suelo estéril de la misma procedencia. Se investigó su efecto sobre el desarrollo y absorción de nutrimentos de dos plantas forrajeras en un experimento con macetas, en invernadero. Para tal fin se usaron la gramínea *Brachiaria decumbens* y la leguminosa *Cratylia argentea* (cv. Veraniega) con y sin inóculo de *Rhizobium*. Los tratamientos en *Brachiaria* fueron: suelo estéril (Testigo); con microflora nativa (Mic); con Mic + nitrógeno (Mic+N) y con Mic + N + fósforo (Mic+N+P). Para *Cratylia* (Leg) se consideraron: Suelo estéril + *Rhizobium* (LegRh); con inóculo de microflora nativa (Mic + LegRh); con adición de fósforo (Mic + LegRh + P); con fertilizante químico (Mic + N + P). Las plantas de *B. decumbens* con inóculo presentaron un incremento de más de 300% en la biomasa de raíces y más de 400% en biomasa aérea con respecto a las plantas no inoculadas. Los mayores incrementos en biomasa aérea se presentaron cuando, además del inóculo se agregó N y P; sin embargo el incremento fue poco, comparado con aquéllas que sólo recibieron inóculo. En el caso de *C. argentea*, cuando se usó suelo con inóculo, se obtuvo un incremento de 100% en biomasa de raíces y más de 250% en biomasa aérea, al compararlo con el testigo con suelo estéril. Hubo, para ambas especies, una mayor absorción de P y N en las plantas inoculadas con microflora nativa y fertilizadas. El mayor porcentaje de colonización de raíces por hongos micorrizógenos, se obtuvo con la leguminosa *Cratylia argentea* inoculada con *Rhizobium*. Para la gramínea *Brachiaria decumbens* el mayor porcentaje de colonización se dio cuando, además de agregar rizosfera se fertilizó con N.

INTRODUCCIÓN

Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualistas entre ciertos hongos del suelo y las raíces de las plantas superiores. Los hongos obtienen fotosintatos de la planta huésped y ésta se beneficia de la presencia del hongo de muchas maneras (Blanco y Salas 1997). La más conocida de estas asociaciones es la llamada micorriza vesículo-arbuscular (MVA) o micorriza arbuscular (MA).

La simbiosis de MA es reconocida por sus múltiples efectos positivos sobre el desarrollo

de las plantas y por su importante contribución para mantener la calidad del suelo. Está documentado que produce un incremento de la rizosfera (Camel *et al.* 1991) y de esta manera se facilita la absorción de nutrimentos, fundamentalmente los menos móviles como P, Zn, Cu (Barea 1991, Bolán 1991). Hay evidencias que las plantas con MA se recuperan más rápido de un corto período de estrés hídrico, son más resistentes a la toxicidad de elementos y acidez del suelo (Sieverding 1991) y son menos propensas a la incidencia de enfermedades de las raíces (Dehne 1982).

¹ Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), Costa Rica.

² Escuela de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional, Costa Rica.

Otros beneficios señalados son el incremento en la tasa fotosintética, el aumento de la fijación de N_2 por las bacterias simbióticas, y la mayor diversidad de microorganismos en el suelo. Barea *et al.* (1992) y Bethlenfalvay (1992) hacen referencia a la asociación tripartita de Leguminosa–*Rhizobium*–Hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y coinciden en el papel regulador que tiene la toma de P por las micorrizas, en la fotosíntesis y en la actividad nodular.

Hamel (1996) señala que aún cuando los beneficios de la asociación de MA se conocen, los resultados están restringidos prácticamente a ensayos con macetas en condiciones controladas; en ensayos de campo los resultados son controversiales, por eso se recomienda para maximizar el beneficio potencial, realizar el aislamiento y selección de estos hongos a partir de comunidades nativas de HMA, considerando el manejo propio de la zona.

Los sistemas de producción de bajos insumos en la agricultura sostenible, tienden a establecer agro-ecosistemas más naturales y en los cuales las MA son fundamentales; es por ello que se necesitan más trabajos de investigación para llegar a obtener un manejo eficiente de estas asociaciones.

De acuerdo con lo señalado anteriormente, se planteó esta investigación con el objetivo de determinar los beneficios obtenidos por *Brachiaria decumbens* y *Cratylia argentea* (cv. Veraniega) de la simbiosis con HMA nativos, bajo condiciones de invernadero.



Figura 1: Hifas y esporas de micorrizas nativas

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvo una muestra compuesta de raíces y suelo superficial establecido con *Cratylia argentea* (cv. Veraniega) en la zona de Atenas, Costa Rica. Las raíces se cortaron en trozos de aproximadamente un cm de largo y se mezclaron con el suelo. De esta manera se obtuvo el inóculo de microflora nativa. A las macetas se les agregó aproximadamente 800 ml de suelo pasteurizado obtenido del horizonte A de la misma zona y una porción de 250 ml de microflora nativa. A los tratamientos con P se les adicionó 46 mg de P/ kg, como Triple superfosfato y en aquellos que llevaban N se les adicionó urea a razón de 73,6 mg de N / kg para la gramínea y 90 mg de N/ kg para la leguminosa no inoculada con *Rhizobium* (Cepa CIAT 3564).

Las poblaciones nativas de HMA se incrementaron en macetas, empleando como hospedantes *Brachiaria decumbens* y *Cratylia argentea* (CIAT 18516). Los tratamientos fueron los siguientes:

En *Brachiaria decumbens*:

- Testigo: Suelo estéril
- Microflora nativa (Mic)
- Mic + Nitrógeno (N)
- Mic + N + Fósforo (P)

En *Cratylia argentea* (Leg):

- Testigo: Suelo estéril + *Rhizobium* (LegRh)
- Mic + LegRh
- Mic + LegRh + P
- Mic + N + P

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue una maceta de un litro de capacidad.

Con el fin de separar el efecto de la microflora y micorrizas nativas, se realizó un ensayo adicional con el mismo suelo y las mismas plantas y semillas, en el que se consideraron tres tratamientos y cuatro repeticiones:

- Suelo estéril (Testigo)
- Suelo + Extracto filtrado de Suelo (sin micorrizas)
- Suelo + Mic

Se determinaron las características físicas y químicas del suelo de la zona antes y después de pasteurizado a 80 °C (Cuadros 1 y 2); el proceso de pasteurización se realizó durante tres días, por períodos de ocho horas cada día.

El suelo tiene un horizonte superficial de textura franca, ligeramente ácido y con bajo contenido de P, así como alto porcentaje de fijación de este elemento (mayor de 70%).

Variables evaluadas:

Biomasa aérea secada a 60 °C.
 Biomasa radicular secada a 60 °C.
 Contenido foliar de nutrimentos (Schweizer *et al.* 1980).
 Colonización de raíces por tinción según Brundrett *et al.* (1996).

Con el propósito de determinar cuál fue el mejor tratamiento para la asociación, se rea-

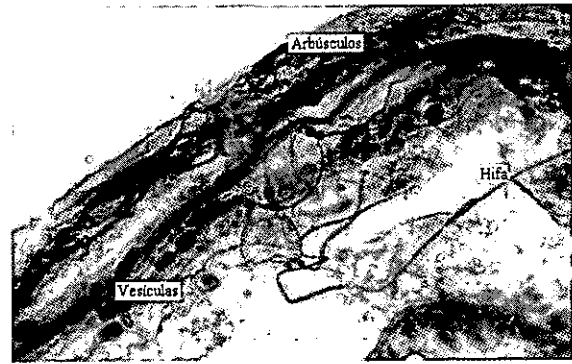


Figura 2: Raíz de *Cratylia argentea* colonizada por HMA nativos.

lizaron las comparaciones dadas a continuación, mediante una prueba de separación de medias.

En gramínea:

- 1.- Efecto de la microflora nativa
Testigo *vrs.* Mic
- 2.- Efecto de la adición de Nitrógeno:
Mic *vrs.* Mic + N
- 3.- Efecto de la adición de P y N:
Mic *vrs.* Mic + N + P

Cuadro 1. Características físicas del horizonte superficial del suelo experimental en la Escuela Centroamericana de Ganadería, Atenas, Costa Rica.

Identificación	% Arena	% Limo	% Arcilla	Textura	% M. orgánica
Suelo sin pasteurizar	46,0	34,0	20,0	Franco	4,81
Suelo pasteurizado	44,0	34,0	22,0	Franco	4,10

Cuadro 2. Características químicas del horizonte superficial del suelo experimental en la Escuela Centroamericana de Ganadería, Atenas, Costa Rica.

Identificación	pH	cm / l					mg / l				
		Al	Ca	Mg	K	P	Zn	Mn	Cu	Fe	
Suelo sin pasteurizar	4,7	0,40	3,4	1,3	0,15	4	1,1	06	7	68	
Suelo pasteurizado	5,2	0,35	2,8	1,2	0,18	4	0,5	40	4	48	

En leguminosa:

1.- Efecto de la microflora nativa
LegRh vs. LegRh + Mic.

2.- Efecto del inóculo con *Rhizobium*:
LegRh + Mic. + P vs. Mic. + N + P

RESULTADOS

La pasteurización del suelo no afectó las características físicas y químicas del suelo (Cuadros 1 y 2); sin embargo, si tuvo influencia en el crecimiento de las plantas de *Brachiaria decumbens* como se puede apreciar en las Figuras 3 y 4.

La adición de microflora nativa fue suficiente para estimular de forma significativa ($P \leq 0,05\%$) el crecimiento de las plantas de *B. decumbens*, con un incremento de 4,85 veces la biomasa aérea obtenida por el tratamiento testigo.

La mayor biomasa de raíces se obtuvo en el tratamiento sin fertilizante y micorrizado. Sin embargo, si se compara la relación raíz:

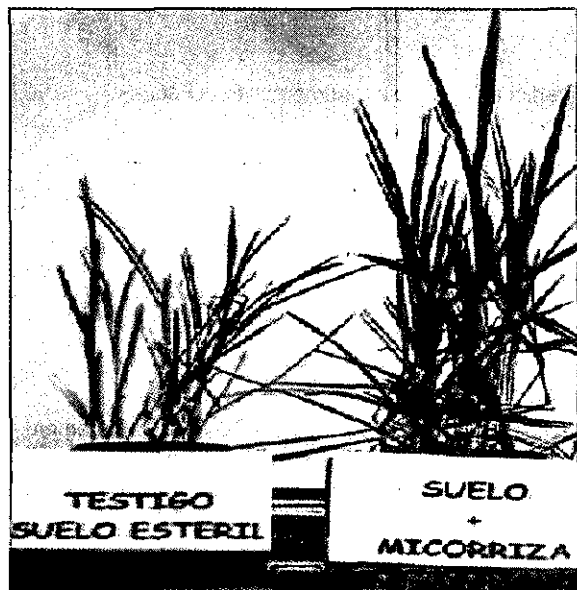


Figura 3: Biomasa aérea de *B. decumbens* con y sin inóculo de microflora nativa

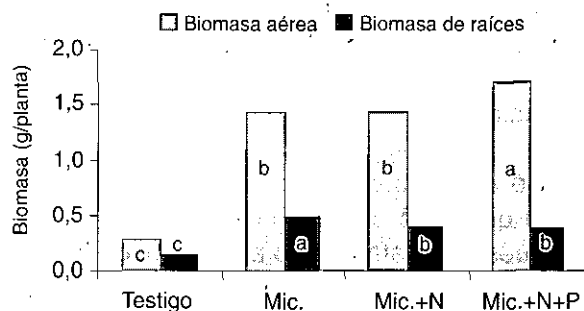


Figura 4: Efecto de la microflora nativa (Mic) de rizosfera de *Cratylia argentea* (cv. Veraniega) sobre la biomasa aérea y biomasa de raíces de *B. decumbens*

parte aérea, la mayor relación se presenta en el testigo no micorrizado. Clark *et al.* (1999) encontraron resultados similares en un experimento con *Panicum virgatum* en un suelo ácido. Se aprecia además que un fertilizante base es importante para que la simbiosis sea más efectiva.

La adición de N, junto con la microflora, no afectó la biomasa aérea de las plantas respecto al tratamiento de sólo microflora; sin embargo, la adición de P y N, siempre en presencia de microflora nativa, mejoró significativamente ($P \leq 0,05\%$) la biomasa aérea con respecto a los otros tratamientos. Se ha observado que las plantas deficientes en P muestran retardos en el crecimiento y su función de fotosíntesis disminuye (Bougher *et al.* 1990, Qiu e Israel 1992). El suelo que se utilizó en el experimento es deficitario en este elemento.

Estos resultados no permitieron diferenciar entre el efecto causado por la micorriza nativa y el causado por otros microorganismos; para despejar esta duda, se realizó un segundo experimento comparando suelo pasteurizado e inoculado con microflora libre de HMA y microflora con HMA. Este último tratamiento incrementó la biomasa aérea respecto al primero ($P \leq 0,05$), comprobándose que el efecto positivo se debió principalmente a la micorriza. Salas y Soto (datos no publicados) encontraron resultados similares en un experimento de invernadero usando como planta hospedera el frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

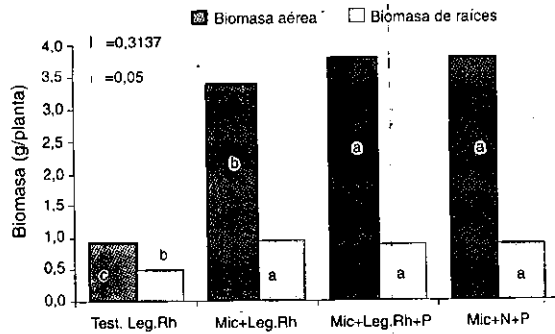


Figura 7: Efecto de la microflora nativa (Mic.) de rizosfera de *Cratylia argentea* (CIAT 18516) sobre la biomasa aérea y biomasa de raíces de *Cratylia argentea*.

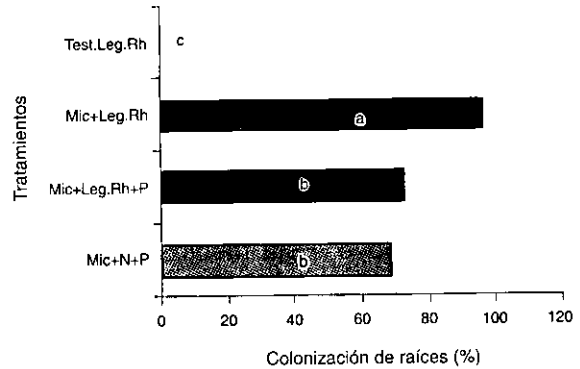


Figura 8: Efecto de la fertilización e inóculo de *Rhizobium* sobre el porcentaje de infección de raíces de *Cratylia argentea* con hongos micorrizógenos autóctonos.

leguminosa simbiote, ya que el P juega un papel regulador de la fotosíntesis y en la actividad de los nódulos.

Según Barea y Azcón-Aguilar (1983) el P y otros elementos menores que pueden limitar la fijación simbiótica de N_2 por *Rhizobium*, pueden ser suministrados por las micorrizas. Los mismos autores comentan que la doble simbiosis no sólo reduce el gasto de fertilizantes sintéticos sino que parece que se reduce el costo del sistema leguminosa-*Rhizobium* en términos de gastos de fotosintatos.

El testigo fue el que dio menor biomasa de raíces por menor desarrollo de la planta, pero sin embargo es el tratamiento que presenta la mayor proporción raíz: biomasa aérea.

La diferencia en biomasa de raíces es significativa con respecto a los otros tres tratamientos, que no se diferencian entre sí. Varios investigadores sostienen que las plantas micorrizadas y noduladas, usualmente tienen una menor razón raíz: biomasa aérea que las inoculadas con uno solo de los simbioses (Asimi *et al.* 1980, Redente y Reeves 1981, citados por Barea y Azcón-Aguilar 1983).

Los porcentajes de colonización de raíces obtenidos se presentan en la Figura 8 y fueron en general superiores a la gramínea. El mayor porcentaje se obtuvo cuando se agregó microflora nativa y la leguminosa fue inoculada con *Rhizobium*.

La adición de fertilizante, así como la ausencia de *Rhizobium* disminuyeron la colonización. Esta medida no está relacionada con el rendimiento en materia seca de la planta, resultados que concuerdan con los obtenidos por Saif (1987).

Smith *et al.* (1992) llegan a las mismas conclusiones y agregan que la infección en el sistema radical está influenciada por condiciones ambientales, tales como la edad de las plantas, el nivel de fosfatos en el suelo y la capacidad de la población de hongos para formar micorrizas.

Salinas *et al.* (1985) encontraron una mayor colonización por micorrizas en leguminosa inoculada con *Rhizobium* (cerca de 100 % en *Pueraria phaseoloides*) que en gramínea (alrededor de 65% en *Andropogon gayanus*).

Barea y Azcón-Aguilar (1983) dicen que las leguminosas son más micotróficas que las gramíneas y que probablemente puedan beneficiarse más de esta asociación.

El Cuadro 4 muestra que al agregar microflora nativa, se incrementó la absorción de N y P respecto al testigo. En los dos tratamientos que llevan P y microflora, se encontró mayor absorción de este elemento respecto a los que no se fertilizaron. La absorción de N fue mayor ($P \leq 0,05$) en las plantas en que se aplicó una fuente de N inorgánico, lo que

Cuadro 4. Contenido foliar de N y P en plantas de *Cratylia argentea* con inóculo de microflora nativa y tratamientos de fertilización

Tratamientos	Elementos extraídos (mg/ planta)	
	N	P
Testigo Leg Rh	35,87 c	0,67 c
Mic + Leg Rh	95,0 b	3,65 b
Mic+Leg Rh+P	95,0 b	5,03 a
Mic+N+P	111,25 a	4,78 a

* Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($P \geq 0,05$) entre tratamientos.

sugiere que la inoculación con *Rhizobium* no fue tan eficiente, aunque estas diferencias no se manifestaron en la biomasa aérea.

Saif (1987) encontró que la inoculación con micorrizas incrementó significativamente el contenido de todos los elementos minerales en leguminosas y gramíneas forrajeras.

Azcón-Aguilar y Barea (1981) obtuvieron el doble de rendimiento en *Medicago sativa* con la inoculación dual comparado con el control no inoculado. Dodd *et al.* (1990) observaron el mayor incremento en el rendimiento en yuca (*Manihot esculenta*) y kudzú (*Pueraria phaseoloides*). Estos resultados están asociados con mayores contenidos foliares de P y Mg. Salinas *et al.* (1985) encontraron una mayor y más continua absorción de P en las plantas micorrizadas y de dos a cuatro veces mayor utilización del P agregado tanto en la gramínea como en la leguminosa consideradas. Además se ha comprobado comparando fuentes externas de P, que el incremento en rendimiento debido a micorrizas es mayor con P de baja solubilidad, pudiendo concluir que las plantas micorrizadas solubilizan este elemento (Bolan 1991).

Barea y otros (1987) usando técnicas de ^{15}N mostraron que tanto el N amoniacal como el N nítrico pueden ser rápidamente absorbidos por medio de las hifas extrarradicales de micorrizas, así el mayor crecimiento de las leguminosas micorrizadas puede deberse al aumento de fijación de N_2 como a la mayor

absorción de N del suelo, especialmente la forma amoniacal.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La inoculación con micorrizosfera proveniente de un suelo establecido con *Cratylia argentea* de la zona de Atenas, aumentó el rendimiento de *Brachiaria decumbens* y *Cratylia argentea* y además la absorción de P y N por las plantas.

En *Brachiaria decumbens* la fertilización base de P y N produjo los máximos rendimientos en biomasa aérea.

Los máximos rendimientos se encontraron en *Cratylia argentea* micorrizada, inoculada con *Rhizobium* y fertilizada con P, así como cuando se aplicó N y P inorgánicos en suelo con rizosfera.

Los altos porcentajes de colonización radical obtenidos en *Brachiaria decumbens* y *Cratylia argentea*, indican el alto potencial de inóculo de micorriza nativa obtenido de la rizosfera de *Cratylia argentea* crecida en la zona de Atenas, bajo condiciones de campo.

Como la producción de forrajes, especialmente cuando se incluyen las leguminosas, está muchas veces limitada por el bajo nivel de P asimilable en los suelos, la inoculación con hongos micorrizógenos es una buena alternativa para aumentar la productividad. Por eso se recomienda seguir con las investigaciones y tratar de lograr aislamientos zonales realmente efectivos.

AGRADECIMIENTOS

Al CIAT y a la ECAG por la colaboración prestada, al personal del Laboratorio de Suelos del INTA por el análisis de las muestras, y al Ing. Carlos Hidalgo, INTA, por sus acertadas sugerencias.

LITERATURA CITADA

- Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M. 1981. Field inoculation of Medicago with V-A mycorrhiza and *Rhizobium* in phosphate-fixing agricultural soil. *Soil Biol. Biochem.* 13: 19-22.
- Barea, J. M. 1991. Vesicular - arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. *Adv. Soil Sci.* 15: 1 - 40.
- _____, J. M.; Azcón-Aguilar, C. 1983. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. *In Advances in Agronomy* 36: 1-54.
- _____; _____; Azcón, R. 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N₂ fixation and N uptake from soil as assessed with a ¹⁵N technique under field conditions. *New Phytology* 106: 717-725.
- _____; Azcón, R.; Azcón-Aguilar, C. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing systems. *Methods Microbiol* 24: 391-416.
- Bethenfalvay, G. J. 1992. Mycorrhizae and crop productivity. *In: G. J. Bethenfalvay y R. G. Linderman (eds). Mycorrhizae in sustainable agriculture. ASA special publication N° 54. Madison, WI, USA. p. 1-27.*
- Blanco, F. A.; Salas, E. A. 1997. Micorrizas en la agricultura: Contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 21 (1): 55-67.
- Bolan, N.S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant & Soil* 134: 189 - 207.
- Bougher, N.L.; Grove, T.S.; Malajczuk, N. 1990. Growth and phosphorus acquisition of karri (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. *New Phytologist* 114: 77-85.
- Brundrett, M.; Bougher, N.; Dell, B.; Grove, T.; Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) Monograph 32, 374 p.
- Camel, S.B.; Reyes, M.G.; Ferrera, R.; Ranson, R.L.; Brown, M.S.; Bethlen, G.J. 1991. The growth of mycorrhizal mycelia through bulk soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58: 389 - 393.
- Clark, R. B.; Zeto, S. K.; Zobel, R. W. 1999. Arbuscular mycorrhizal fungal isolate effectiveness on growth and root colonization of *Panicum virgatum* in acidic soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1757-1763.
- Cooper, K.M. 1984. Physiology of VA mycorrhizal associations. *In: Powell C.L., Bagyaraj D.J. (eds.) VA Mycorrhiza. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. p. 155-186.*
- Dehne, J. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phitopathology* 72: 1115 - 1118.
- Dodd, J. C.; Arias, I.; Koomen, I.; Hayman, D. S. 1990. The management of populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in acid-infertile soils of savanna ecosystem. I. The effect of pre-cropping and inoculation with VAM-fungi on plant growth and nutrition in the field. *Plant and Soil* 122: 229-240.
- Hamel, Ch. 1996. Prospects and problems pertaining to the management of arbuscular mycorrhizae in agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 60: 197 - 210.
- Jakobsen, I. 1986. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in field grown crops. III. Mycorrhizal infection and rates of inflow in pea plants. *New Phytologist* 86: 131-144.
- Koide, R.T. 1991. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytologist* 117: 365-386.
- Linderman, R.G. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. *In: G. J. Bethenfalvay y R. G. Linderman (eds). Mycorrhizae in sustainable agriculture. ASA special publication N° 54. Madison, WI, USA. p. 45-70.*
- Nielsen, K.L.; Bouma, T.J.; Lynch, J.; Eissenstat, D. M. 1998. Effects of phosphorus availability and vesicular-arbuscular mycorrhizas on the carbon budget of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *New Phytologist* 139: 647-656.

- Qiu, J.; Israel D.W. 1992. Diurnal starch accumulation and utilization in phosphorus-deficient soybean plants. *Plant physiology* 98: 316-323.
- Saif, S.R. 1987. Growth responses of tropical forage plant species to vesicular-arbuscular mycorrhizae. I: Growth, mineral uptake and mycorrhizal dependency. *Plant and Soil* 97: 25-35.
- Salinas, J. G.; Sanz, J. I.; Sieverding, E. 1985. Importance of VA mycorrhizae for phosphorus supply to pasture plants in tropical Oxisols. *Plant and Soil* 84: 347-360.
- Schweiser, S.; Coward, H.; Vázquez, A. 1980. Metodología para análisis de suelos, aguas y plantas. Boletín Técnico N° 68. Ministerio de Agricultura y Ganadería. 32 p.
- Sieverding, E. 1983. Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio. CIAT. Colombia. 96 p.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular- arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Technical Cooperation - Federal Republic of Germani. Eschborn. 371 p.
- Smith, S. E.; Robson, A. D.; Abbott, L. K. 1992. The involvement of mycorrhizas in assessment of genetically dependent efficiency of nutrient uptake and use. *Plant and Soil* 146: 169-179.