

# EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON MICORRIZAS ARBÚSCULARES (MA) Y SUSTRATOS DE SIEMBRA SOBRE EL DESARROLLO Y CONTENIDOS DE N Y P EN PLANTAS DE *Cratylia argentea*

Susana Schweizer<sup>1</sup>, Eduardo Salas<sup>2</sup>, Rocío Bejarano<sup>1</sup>, Marco V. Castro<sup>1</sup>

## RESUMEN

Se midió el efecto de micorrizas nativas aisladas de la zona de Atenas, Alajuela, Costa Rica y de un hongo introducido de la colección de hongos micorrícicos de la Universidad Nacional (*Glomus manihotis*), de calidad comprobada, sobre el rendimiento y la absorción de P y N de plantas de *Cratylia argentea* cv. veraniega, inoculadas con una cepa de la bacteria del género *Rhizobium* (CIAT 3564) y sembradas sobre cuatro sustratos diferentes. El experimento se realizó en invernadero, en el Alto de Ochozogo, Cartago, Costa Rica. Se utilizó un diseño completamente aleatorio con cuatro repeticiones por tratamiento, en un arreglo factorial. Se consideró como Factor 1: Inóculo, con tres niveles: a) sin inocular, b) con inóculo de micorrizas nativas y c) con inóculo de *Glomus manihotis* y Factor 2: sustrato, con cuatro niveles: a) suelo de potrero sin mejorar de la zona de Atenas; b) suelo de potrero con P inorgánico; c) sustrato orgánico utilizado en el vivero de la Escuela Centroamericana de Ganadería; y d) mezcla 3:1 de suelo de potrero sin fertilizar y sustrato orgánico. Las plantas micorrizadas presentaron incrementos significativos con respecto a las no inoculadas en todas las variables consideradas ( $p \leq 0,05$ ): en Biomasa aérea (hasta un 22%), absorción de P por la planta (hasta un 22%), absorción de N (hasta un 27%). La colonización de raíces fue de 46,8% con inóculo de *Glomus manihotis* y de 59,1% cuando se inoculó con micorrizas nativas. Estos tratamientos difieren significativamente entre sí ( $p \leq 0,0001$ ) y también con el testigo, que dio un porcentaje de colonización de 24,8%. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se incorporó la población nativa y cuando se utilizaron los sustratos con abono orgánico, especialmente en el caso de la mezcla de suelo-abono orgánico 3:1. Los resultados obtenidos permiten enfatizar el uso de aislamientos locales de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) como una buena alternativa para mejorar el vigor y el valor nutritivo de esta leguminosa tropical, promisoría para la alimentación del ganado.

## INTRODUCCIÓN

El uso de leguminosas forrajeras arbustivas asociadas con gramíneas se incrementa cada día en las zonas de pastoreo del país. Estas plantas tienen de dos a tres veces más porcentaje de proteína que las gramíneas, aportan altos volúmenes de nitrógeno a los agroecosistemas y son capaces de transmitir una cantidad significativa del nitrógeno fija-

do a los pastos asociados (Guzmán Plazola *et al.* 1992). Son capaces de formar simbiosis con la bacteria *Rhizobium* y con HMA y esta relación tripartita las habilita para competir satisfactoriamente en suelos de baja fertilidad y con gramíneas nativas (Barea *et al.* 1989, Cook *et al.* 1993). El P es un factor limitante de crecimiento en muchas leguminosas tropicales y se requieren fuertes aplicaciones de este fertilizante para su

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). Costa Rica.

<sup>2</sup> Escuela de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional. Heredia. Costa Rica.

- El porcentaje de colonización de raíces se determinó a los 45 días de la siembra y las otras variables se midieron a los 90 días de la siembra.

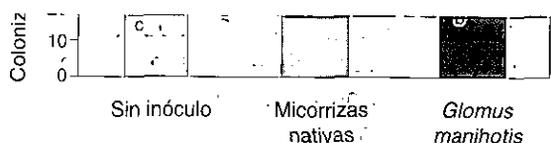


Figura 1. Porcentaje de colonización de raíces.

establecimiento y crecimiento. Una alternativa para aumentar la eficiencia del fertilizante es la inoculación de las leguminosas con micorrizas arbusculares (Paulino *et al.* 1990).

El Proyecto de Reforestación en Fincas Ganaderas MAG / MINAE / ODA Costa Rica, sugiere, que la *Cratylia argentea* es una de las leguminosas forrajeras más adecuadas para la región del Pacífico Central de Costa Rica. Además Argel (1995), recomienda realizar la siembra inicial de las plantas en vivero. González *et al.* (1998), consideran que los métodos de inoculación con micorrizas en plantas producidas en almácigos y en vivero, pueden resultar altamente redituables.

En la agricultura sostenible se trata de lograr sistemas de manejo optimizando los recursos disponibles y conservándolos; en este contexto, son fundamentales las asociaciones simbióticas de microorganismos con las plantas superiores. Teniendo en cuenta las consideraciones señaladas con anterioridad, es que se planteó esta investigación utilizando un sustrato de vivero de la Escuela Centroamericana de Ganadería y un suelo representativo de potreros de pastoreo de la zona de Atenas, Costa Rica, con el objetivo de medir el efecto de las micorrizas nativas y de un hongo introducido de calidad comprobada, en el crecimiento de *Cratylia argentea* en condiciones de vivero e introduciendo los HMA directamente en el suelo en que se desarrolla-

condiciones de suelo esterilizado; sin embargo es necesario conocer su respuesta en suelo no estéril.

Por ese motivo se planteó este experimento con un arreglo factorial de doce tratamientos, donde el primer factor corresponde al sustrato en que se desarrollan las plantas, con cuatro niveles: a) Suelo de potrero no estéril sin adición de P (suelo sin P); b) Suelo de potrero no estéril más siete mg de P como triple-superfosfato por bolsa (suelo con P); c) Sustrato orgánico de vivero; d) Mezcla 3:1 de suelo y sustrato orgánico. El segundo factor corresponde a los HMA con tres niveles: Sin inóculo; micorrizas nativas (30 g de inóculo por bolsa); y *Glomus manihotis* (15 g de inóculo por bolsa).

El diseño experimental fue irrestricto al azar, con cuatro repeticiones. La unidad experimental fue una bolsa de polietileno de 800 ml de capacidad con dos plantas de *Cratylia* cv. veraniega. En todos los tratamientos las semillas se inocularon con *Rhizobium* (cepa CIAT 3564) previo a la siembra. Se usaron cinco gramos de inoculante por 100 g de semilla.

El suelo citado, representativo de potreros de pastoreo de la zona de Atenas, tiene un horizonte superficial de textura franca /franca arcillosa, es fuertemente ácido, bien provisto de materia orgánica y con conteni-

disminuyó la infección de MA cuando se aplicó en dosis de cinco a 30 t/ha. Atribuyó sus resultados al alto contenido de amonio del abono fresco. Graham y Timmer (1985) mencionan la inhibición sobre los HMA por altos niveles de materia orgánica y un consecuente incremento del P disponible en el suelo. El sustrato de vivero utilizado en este ensayo tiene las dos condiciones anteriormente citadas. Su contenido de materia orgánica es muy alto y el nivel de P asimilable también.

Las plantas de *Cratylia argentea* respondieron positivamente a la adición de HMA (Figura 3). Las plantas inoculadas dieron mayor biomasa aérea ( $p \leq 0,0029$ ) que el testigo. También se debe señalar una pequeña diferencia, aunque no fue significativa a favor de las micorrizas nativas. Esto corresponde con el mayor porcentaje de colonización obtenido.

servan las características químicas de estos sustratos en el Cuadro 1, verificamos que el sustrato de vivero tiene mayor disponibilidad de nutrimentos y un nivel muy alto de P asimilable, condiciones excelentes para un buen desarrollo de las plantas. Al mezclar este sustrato orgánico con suelo representativo de potreros de pastoreo, aún cuando se disminuyen los niveles de elementos nutritivos, no hubo diferencia en la biomasa aérea. Cuando se utilizó suelo sólo sin P y con la adición de P, el crecimiento de las plantas fue menor. En la Figura 4 se aprecia la interacción entre los dos factores ( $P \leq 0,006$ ) para esta variable. Cabe destacar que el testigo no inoculado creció mejor cuando se mezcló el sustrato orgánico con el suelo, esto puede deberse a la presencia de micorrizas en el suelo. Jaen y Ferrara-Cerrato (1989) consideran el uso de hongos micorrícicos efectivos como una alternativa viable para la inoculación de viveros y

**Cuadro 1.** Características químicas de los sustratos experimentales.

Identificación	cm <sup>l</sup> / l					mg / l					% M.O.	% Fij. P
	pH	Al	Ca	Mg	K	P	Zn	Mn	Cu	Fe		
Suelo de potrero	5,4	0,25	5,9	1,9	0,21	8	0,9	10	14	65	6,1	71,5
Sustrato orgánico	6,4	0,10	15,8	5,4	1,36	79	4,7	02	04	70	36,9	42,5
Mezcla suelo sustrato	5,6	0,20	8,3	2,9	0,54	29	3,8	19	9	103	18,6	---

- Porcentaje de colonización de raíces (Determinación del % de infectividad de raíces por MA por tinción según Brundrett *et al.* (1996).
- Contenido de nutrientes foliares (Schweizer *et al.* 1980).
- El porcentaje de colonización de raíces se determinó a los 45 días de la siembra y las otras variables se midieron a los 90 días de la siembra.

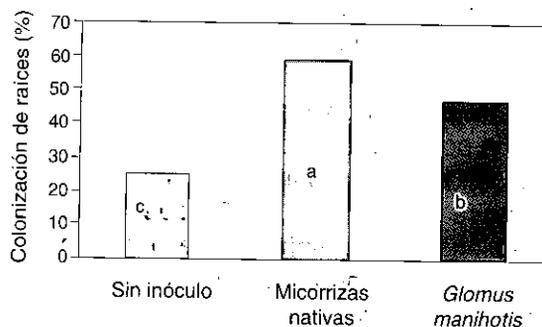
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la variable colonización de raíces, el ANDEVA reveló diferencias significativas entre inóculos y entre sustratos utilizados. No hubo interacción entre los factores.

La Figura 1 evidencia que los HMA nativos de *Cratylia*, fueron más infectivos que la cepa de *Glomus manihotis* independientemente del sustrato utilizado. El tratamiento testigo mostró muy bajo potencial de inóculo. Hamel (1996) recomienda para maximizar el beneficio potencial de las MA, realizar el aislamiento y selección de estos hongos a partir de comunidades nativas, considerando el manejo propio de la zona.

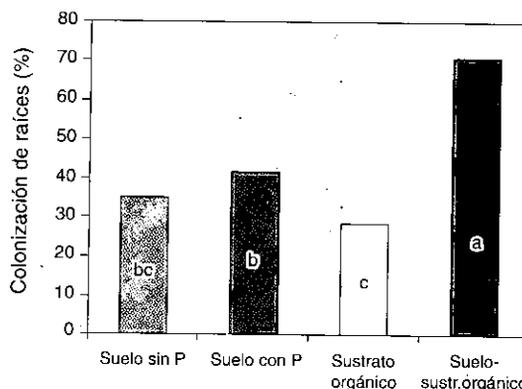
La Figura 2, muestra que el mayor porcentaje de colonización de raíces se obtuvo en la mezcla suelo-sustrato orgánico 3:1. El sustrato orgánico tiene un bajo potencial de inóculo y además tuvo un efecto negativo en la colonización de raíces por los HMA de los inóculos agregados. Cuando se usó sólo suelo para el desarrollo de las plantas, los porcentajes de colonización fueron intermedios.

Sieverding (1991) comenta al respecto que las raíces de yuca fueron más coloniza-



**Figura 1:** Porcentajes de colonización de raíces de *Cratylia argentea* por HMA nativos y por *Glomus manihotis*.

das cuando se agregó compost al suelo (cinco t/ha). Otras investigaciones prueban que altas cantidades de abono orgánico provocan la disminución de la eficiencia micorrícica. Guttay (1983) sostiene que la calidad del compost es importante para optimizar la formación de MA. Brechelt (1989) lo comprobó agregando cantidades crecientes de estiércol fresco y compost de estiércol y de residuos vegetales. Ella encontró que el abono fresco



**Figura 2:** Porcentajes de colonización de raíces de *Cratylia argentea* por hongos MA en cuatro sustratos de siembra.

disminuyó la infección de MA cuando se aplicó en dosis de cinco a 30 t/ha. Atribuyó sus resultados al alto contenido de amonio del abono fresco. Graham y Timmer (1985) mencionan la inhibición sobre los HMA por altos niveles de materia orgánica y un consecuente incremento del P disponible en el suelo. El sustrato de vivero utilizado en este ensayo tiene las dos condiciones anteriormente citadas. Su contenido de materia orgánica es muy alto y el nivel de P asimilable también.

Las plantas de *Cratylia argentea* respondieron positivamente a la adición de HMA (Figura 3). Las plantas inoculadas dieron mayor biomasa aérea ( $p \leq 0,0029$ ) que el testigo. También se debe señalar una pequeña diferencia, aunque no fue significativa a favor de las micorrizas nativas. Esto corresponde con el mayor porcentaje de colonización obtenido. Clark *et al.* (1999) en un experimento de invernadero utilizando diferentes aislamientos de HMA y como planta hospedera la gramínea *Panicum virgatum*, encontraron que sólo ocurrió un buen incremento de materia seca de la planta cuando los porcentajes de colonización de raíces estaban por encima del 20% y lo relacionaron con la efectividad del aislamiento.

La mayor biomasa aérea ( $p \leq 0,0001$ ) se obtuvo cuando se usó el sustrato orgánico y la mezcla suelo-sustrato orgánico. Si se ob-

servan las características químicas de estos sustratos en el Cuadro 1, verificamos que el sustrato de vivero tiene mayor disponibilidad de nutrimentos y un nivel muy alto de P asimilable, condiciones excelentes para un buen desarrollo de las plantas. Al mezclar este sustrato orgánico con suelo representativo de potreros de pastoreo, aún cuando se disminuyen los niveles de elementos nutritivos, no hubo diferencia en la biomasa aérea. Cuando se utilizó suelo sólo sin P y con la adición de P, el crecimiento de las plantas fue menor. En la Figura 4 se aprecia la interacción entre los dos factores ( $P \leq 0,006$ ) para esta variable. Cabe destacar que el testigo no inoculado creció mejor cuando se mezcló el sustrato orgánico con el suelo, esto puede deberse a la presencia de micorrizas en el suelo. Jaen y Ferrara-Cerrato (1989) consideran el uso de hongos micorrícicos efectivos como una alternativa viable en la tecnología de viveros ya que incrementan la tasa de crecimiento y mejoran la nutrición mineral de las plantas. Además, en un vivero es necesario fertilizar abundantemente y de esta forma se incrementan los costos de producción.

La inoculación de plantas en vivero puede reemplazar la fertilización en algunos casos o el efecto puede ser mejorado por fertilización moderada en otros. En este experimento se comprueba que puede lograrse un ahorro sustancial del abono o sustrato orgánico inoculando con micorrizas.



Figura 3: Efecto de dos cepas de HMA sobre biomasa aérea en *Cratylia argentea*.

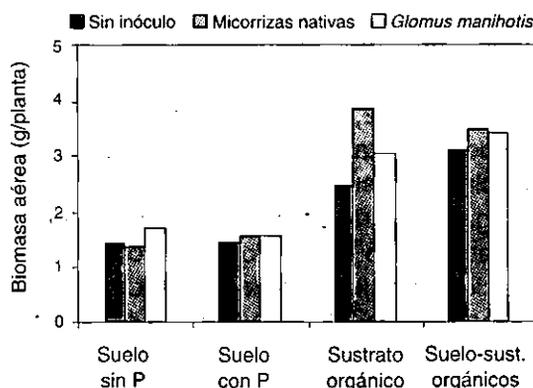


Figura 4: Interacción inóculos de hongos MA y sustratos en la biomasa aérea de *Cratylia argentea*.

La inoculación con micorrizas nativas tuvo una influencia positiva en la absorción de N por las plantas. Este tratamiento se diferencia significativamente de los otros dos tratamientos de inóculo. Los sustratos con abono orgánico facilitaron la absorción de N por las plantas. Hay una pequeña diferencia a favor de la mezcla suelo: sustrato (4,5 mg/planta), ésto puede deberse a la presencia de mayor cantidad de nódulos de *Rhizobium* en este sustrato ( $P \leq 0,0001$ ). Se pudo apreciar además interacción entre los dos factores. Las plantas no inoculadas y aquellas inoculadas con *Glomus manihotis* presentaron una mayor absorción de N cuando se desarrollaron sobre la mezcla suelo-sustrato orgánico. Cabe recordar que en este sustrato se encontró mayor infectividad micorrícica. Las micorrizas nativas se desarrollaron bien en el sustrato orgánico y fue esta interacción la que mostró mayor cantidad de N absorbido por las plantas (Figura 5). En la mezcla suelo-sustrato los tres tratamientos de inóculos se comportaron de manera semejante en cuanto a esta variable. Cuando se usó sólo suelo, las plantas absorbieron menor cantidad de nitrógeno.

Linderman (1992) hace referencia a la asociación tripartita de leguminosas- *Rhizobium* micorrizas y sostiene que los hongos micorrícicos definitivamente aumentan la fijación de  $N_2$  por las bacterias que producen nódulos, aún cuando falta aclarar los mecanismos involucrados. Barea *et al.* (1987) en un

experimento con  $^{15}N$  mostraron la rápida absorción de nitrógeno por hifas extrarradicales de micorrizas, tanto en la forma de N nítrico como N amoniacal. Concluyen que el mayor crecimiento de las leguminosas micorrizadas puede deberse al aumento en la fijación de  $N_2$  y a la mayor absorción de nitrógeno del suelo, especialmente en la forma amoniacal.

Respecto a la absorción de P, se presentaron diferencias significativas entre sustratos ( $P \leq 0,0001$ ) y entre tratamientos de inóculos ( $P \leq 0,0059$ ). El sustrato orgánico tiene un nivel muy alto de P asimilable; este valor es tres veces mayor que el de la muestra suelo-sustrato y por ende, es en el que se obtuvo una mayor extracción de este elemento por las plantas, aunque esta diferencia no se reflejó en la biomasa aérea.

La micorriza nativa incrementó la absorción de P por las plantas hasta un 31,8% si se compara con el testigo. La absorción también fue mayor que cuando se inoculó con *Glomus*. Los resultados se correlacionan muy bien con la absorción neta de N y con la biomasa aérea obtenida en este experimento.

Paulino *et al.* (1990) inocularon con micorrizas dos leguminosas forrajeras (*Pueraria phaseoloides* y *Centrosema macrocarpum*) y concluyeron que la aplicación del inóculo incrementó significativamente la absorción de N y P por las plantas. Howeler *et al.* (1987) enfatizan que una asociación micorrícica eficiente es de gran importancia para incrementar la absorción de P. En un experimento que realizaron con leguminosas y gramíneas forrajeras, las leguminosas respondieron mejor a la inoculación.

El factor sustrato tuvo influencia en el comportamiento de los inóculos (Figura 6). Las micorrizas nativas no incrementaron la absorción de P por las plantas cuando se usó el suelo sin y con adición de P. Sin embargo, al aumentar los niveles de P en los sustratos, las plantas inoculadas con micorrizas nativas absorbieron la mayor cantidad de este elemento. Al respecto, Howeler *et al.* (1987) sostienen que las asociaciones de micorrizas

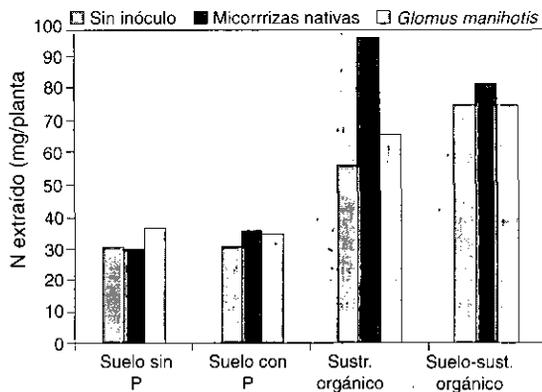
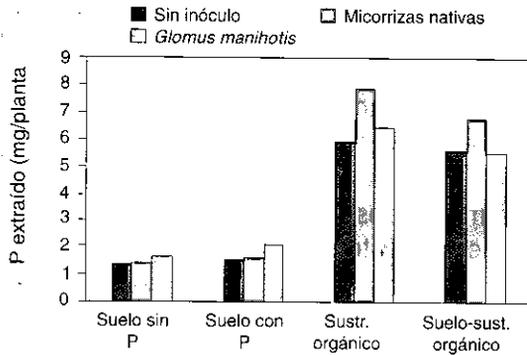


Figura 5: Interacción entre inóculos de HMA y cuatro diferentes sustratos de siembra en la absorción de N por plantas de *Cratylia*.



**Figura 6:** Interacción entre inóculos de hongos MA y cuatro diferentes sustratos de siembra, en la absorción de P por plantas de *Cratylia*.

pueden no ser efectivas cuando el suelo tiene muy bajos niveles de P, porque se podría presentar una competencia del P lábil entre las micorrizas y las raíces de las plantas.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La adición de sustrato orgánico al suelo de pastoreo (1:3) tuvo una influencia positiva en la colonización de las raíces por hongos MA y en la presencia de nódulos.

El uso de sustrato orgánico sólo, no fue favorable para el desarrollo de la simbiosis. Fue el sustrato que presentó el menor porcentaje de colonización de raíces por HMA.

La inoculación con HMA aumentó significativamente la biomasa aérea de *Cratylia*.

Las plantas de *Cratylia* inoculadas con micorrizas nativas absorbieron más N y más P.

El sustrato con un nivel de P asimilable intermedio (mezcla suelo-sustrato) fue el más apropiado para el desarrollo de las plantas.

De los resultados obtenidos debe destacarse la importancia del uso conjunto de abono orgánico y micorrizas efectivas en el desarrollo de *Cratylia argentea*.

## 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

- Argel, P. J. 1995. Evaluación agronómica de *Cratylia argentea* en México y Centroamérica. Memorias del Taller de trabajo sobre *Cratylia* realizado el 19 y 20 de julio de 1995, Brasilia, DF, Brasil. p:75-82.
- Barea, J. M.; Azcón-Aguilar, C.; Azcón, R. 1987. Vesicular arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N<sub>2</sub> fixation and N uptake from soil as assessed with a N<sup>15</sup> technique under field conditions. *New Phytology* 106: 717-725.
- Barea, J.M.; El-Atrach, F.; Azcón, R. 1989. Mycorrhiza and phosphate interactions as affecting plant development, N<sub>2</sub>-fixation, N-transfer and N-uptake from soil in legume-grass mixtures by using a <sup>15</sup>N dilution technique. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 581-589.
- Brechelt, A. 1989. Effect of different organic manures on the efficiency of VA mycorrhiza. *Agriculture, Ecosystem and Environment* 29: 55-58.
- 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..
- 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.
- Cook, S.J.; Gilbert, M.A.; Shelton, H.M. 1993. Tropical pasture establishment. 3. Impact of plant competition on seedling and survival. *Tropical grassland* 27: 291-301.
- Graham, J. H.; Timmer, L. W. 1985. Rock phosphate as a source of phosphorus for vesicular-arbuscular mycorrhizal development and

- growth of citrus in a soiles medium. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109 (1): 118-121.
- González, C.; Ferrara, R.; Pérez, J. 1998. Biotecnología de la micorriza arbuscular en fruticultura. Universidad Autónoma de Tlaxcala y Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, 1998. 131 p.
- Guttay, A. J. R. 1983. The interaction of fertilizers and vesicular - arbuscular mycorrhizae in composed plant residues. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108: 222-224.
- Guzmán, R.; Ferrara, R.; Bethenfalvay, G. J. 1992. Papel de la endomicorriza VA en la transferencia de exudados radicales entre frijol y maíz sembrados en asociación bajo condiciones de campo. Terra 10 (2): 236-245.
- Hamel, Ch. 1996. Prospects and problems pertaining to the management of arbuscular mycorrhizae in agriculture. Agriculture, Ecosystems and Environment 60: 197 - 210.
- Howeler, R. H.; Sieverding, E.; Saif, S. 1987. Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pastures. Plant and Soil 100: 249-283.
- Jaen, C. D.; Ferrara, R. 1989. Efecto de la inoculación de cuatro cepas de hongos endomicorrícicos y tres niveles de fertilización NPK en zapote blanco (*Casimiroa edulis*) cultivada en vivero. XVI Congreso Nacional de Fitopatología. 24-26 de Julio. Montecillo, estado de México.
- 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, 1992, pp. 45-70.
- Paulino, V. T.; Costa, N. L.; Schammas, E. A. 1990. Effects of mycorrhizal inoculation on growth, nitrogen and phosphorus contents of two tropical forage legumes. Rev. de Agricultura, Piracicaba vol. 65, fasc. 2: 151-164.
- Schweizer, 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.
- Schweizer, S.; Salas, E.; Bejarano, R.; Castro, M. V.; Sandoval, B. 2000. Efecto de la micorrizosfera en el desarrollo de dos plantas forrajeras. Informe Archivos Técnicos MAG. Código N° PS03 NM 501-5-99. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica. 18p.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular - arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Technical Cooperation - Federal Republic of Germany. Eschborn. 371 p.