

# FERTILIZACIÓN SINTÉTICA E INOCULACIÓN DE HONGOS MICORRIZA ARBUSCULAR (HMA) EN: *Pennisetum clandestinum*

Darío Antonio Castañeda Sánchez<sup>1</sup>, Carmen Elena Úsuga Osorio<sup>2</sup>

<sup>1</sup>PhD en ciencias agrarias, magister en geomorfología y suelos, docente del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Carrera 48 No. 7-151, Medellín, dacastaneda@elpoli.edu.co

<sup>2</sup>Magister Ciencias Biológicas, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Carrera 48 No. 7-151, Medellín, ceusugao@gmail.com

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto de la fertilización y la micorrización comercial en la asociación y los contenidos de nutrientes en pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). En un arreglo factorial se combinaron cuatro niveles de fertilización con dos de micorrización, los ocho tratamientos resultantes se evaluaron en un diseño completamente al azar. Se usó un testigo de micorriza nativa, evaluado independientemente. Como variables respuestas se determinaron: la asociación de HMA, y el contenido foliar de N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, B y S. La asociación de los HMA se favoreció por la no fertilización y esta fue significativamente más alta cuando se usó inóculo nativo o inóculo basal frente al comercial. El tipo de inóculo influyó en el contenido de P y Mg, presentando el inóculo nativo un efecto positivo en el contenido de estos dos elementos.

**Palabras clave:** Asociación, pasto kikuyo, inóculo, suelos, nutrición.

Recibido: 11 de Marzo de 2011. Aceptado: 19 de Diciembre de 2011

Received: March 11<sup>th</sup>, 2011. Accepted: December 19<sup>th</sup>, 2011

## SYNTHETIC FERTILIZATION AND INOCULATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGUS (AMF) IN: *Pennisetum clandestinum*

## ABSTRACT

*This study evaluated the effect of fertilization and commercial mycorrhizal association and nutrient content of Kikuyu grass (Pennisetum clandestinum). In a factorial arrangement of four levels combined with two mycorrhizal fertilizations, the resulting eight treatments were evaluated in a completely randomized design. We used a native mycorrhizal witness, evaluated independently. As response variables were determined: HMA Association, and the leaf content of N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, B and S. The association of the HMA is not favored by fertilization and this was significantly higher when using native inoculum or inoculum basal versus commercial. The type of inoculum influenced the content of P and Mg, native inoculum presenting a positive effect on the content of these two elements.*

**Keywords:** Assosiation, kikuyu grass, inoculum, soils, nutrition

## 1. INTRODUCCIÓN

La funcionalidad de los hongos Micorriza arbuscular (HMA), radica en que su asociación mutualista a nivel de las raíces de más del 80% de las plantas, incluyendo los pastos, provoca una extensión del sistema radical, lo que les permite explorar mayor volumen de suelo, favoreciendo la absorción de agua y nutrientes (nitrógeno y fósforo principalmente) y protegiéndolas contra algunas enfermedades [1]. Este incremento en la absorción de nutrientes de la raíz se presenta dado que las hifas del hongo conectan el interior de la corteza radical con el suelo adyacente, comportándose en forma análoga a los pelos radicales. Las hifas son, sin embargo, más largas y delgadas que estos, y por tanto pueden alcanzar un mayor volumen de micrositos edáficos, lo cual explica la gran capacidad de captación de nutrientes de una planta con micorriza. Además del mejoramiento en la absorción del Zn, Mo, K, S y  $\text{NH}_4$  cuya velocidad de difusión en el suelo es baja y su absorción depende de la densidad de raíces por volumen de suelo [2].

Las plantas con micorrizas son capaces de hacer un mejor uso de los fertilizantes incluyendo los orgánicos, bien sea debido a la producción de fosfatasas por parte de los hongos mismos [3, 4] o bien gracias a la asociación existente entre las hifas de los HMA y los microorganismos que participan en la mineralización de la materia orgánica [5]. En el caso de pasturas se considera que cuando estas crecen en suelos poco fértiles y ácidos no producen materia seca sin asociaciones con micorrizas [6]. Además, existen evidencias de que los HMA protegen a las plantas del ataque de patógenos [7] y del estrés por déficit hídrico [8]. También son conocidos los efectos de los HMA en la formación de la estructura del suelo, a través de su papel en la constitución de agregados estables al agua, en los que el micelio externo de los HMA tiene una notable participación [9], así como a través de la producción de una glicoproteína llamada Glomalina, la cual por sus características químicas favorece la agregación de las partículas de suelo [10].

El presente trabajo consistió en evaluar bajo condiciones de campo el efecto individual y combinado de cuatro niveles de fertilización y dos de micorriza comercial y un testigo de micorriza nativa de la zona de estudio, sobre la asociación y los niveles de nutrientes en el pasto Kikuyo. Esperando obtener alternativas que potencialicen la

absorción de nutrientes en esta planta y consecuentemente la disminución de los costos de producción por fertilizantes y disminución de los impactos negativos al ambiente por el exceso de estos mismos.

## 2. DESARROLLO

### Características agroecológicas del sitio experimental

El experimento se realizó en la finca la Orquídea, ubicada en la vereda el Vergel, la cual pertenece al municipio de Santa Rosa de Osos, ubicado al norte del departamento de Antioquia a unos 74 km del municipio de Medellín. El municipio de Santa Rosa de Osos se ubica en la zona de vida Bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB), con una temperatura que oscila entre los 13 y los 25 °C, una precipitación promedio anual de 2.238 mm; una humedad relativa del 79%, una altura sobre el nivel del mar de 2.550 m.s.n.m y suelos con textura franco arcillo limosa.

### Diseño del experimento en campo

La fase de campo se realizó en un lote con un área de 603 m<sup>2</sup>, sembrada en pasto Kikuyo (*Penisetum clandestinum*). El lote se dividió en 27 parcelas de 5 x 4,5 m sobre las que se aplicó de manera aleatoria cada uno de los tratamientos. En un arreglo factorial se combinaron cuatro niveles de fertilización así: sin fertilización (F0), fertilización completa con: 400 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup> de N, 224 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 450 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup> (F), la mitad de la fertilización anterior (F/2) y dos veces esta (2F) combinados con dos niveles de micorrización así: sin micorriza (M0) y 227 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> de micorriza comercial con 230 esporas g<sup>-1</sup> de suelo (M1). Se evaluó independiente un tratamiento adicional 227 kg ha año<sup>-1</sup> de micorriza nativa obtenida de la zona de estudio y ajustado a 230 esporas g<sup>-1</sup> de suelo (M2). Los nueve tratamientos resultantes se evaluaron en un diseño completamente al azar, aplicados en tres repeticiones al voleo.

### Evaluación de variables

A los cuarenta y cinco días de aplicados los tratamientos, se tomó una muestra compuesta de 1 kg de suelo más raíces obtenidas a partir de 15 submuestras seleccionadas aleatoriamente en cada parcela. Usando un tamiz de 5mm de diámetro, se separaron en cada muestra, las raíces de *P. clandestinum* del suelo y se tomaron 0.5 g, para la evaluación de la asociación micorrízica. Además,

de manera aleatoria se seleccionó en cada parcela un metro cuadrado, del cual se tomó todo el material foliar del pasto existente en el área demarcada.

### Porcentaje de Asociación de HMA

Se extrajeron las raíces terciarias, a partir de la muestra inicialmente seleccionada, bajo cada tratamiento. Se almacenaron en una solución (AFA) compuesta por 20 ml de ácido acético, 200 ml de alcohol etílico, 160 ml de formol y ajustado a 1000 ml con agua destilada. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua, se secaron, y decoloraron con hidróxido de potasio al 1% durante tres días. Se retiró el hidróxido de potasio y se neutralizó el pH sumergiendo las raíces en ácido clorhídrico, al 1 %, durante una hora y media a temperatura ambiente. Al final del proceso, las raíces se lavaron con agua corriente y se les adicionó azul de tripano al 0,05% para el teñido de sus estructuras. Esta tinción fue de acuerdo con el método de Phillips y Hayman (1970) [11] y modificada para raíces de *P. clandestinum*. La asociación se expresó en porcentaje de raíces colonizadas, por el método de láminas propuesto por [6].

### Análisis foliar

El tejido foliar de pasto Kikuyo colectado de cada una de las parcela se secó en una estufa a 60°C durante ocho días. En un gramo de tejido seco se determinó el contenido de nitrógeno total, siguiendo el método de Kjendalh y en 0.5 g el contenido de potasio, calcio, magnesio, cobre, zinc, hierro, azufre, boro y fósforo, siguiendo el método de digestión de tejido vegetal vía seca [12].

### Análisis estadístico

Se usó un modelo lineal generalizado (glm) para evaluar el comportamiento de la asociación de los hongos HMA, en función de los niveles de fertilización y tipo de inóculo, dentro de este se empleó la función de ligamiento poisson. Para las variables nutricionales, se siguió el método de análisis de varianza para evidenciar si los factores fueron o no significativos y la prueba de Tukey para establecer diferencias entre los niveles. Los análisis se corrieron en el paquete R [13].

### Asociación de los hongos HMA

La asociación promedio general de los hongos HMA al pasto *P. clandestinum* fue de 41.40 % y estuvo influenciada significativamente por la fertilización ( $p = 2.166 \times 10^{-05}$ ), fue mayor cuando no

se aplicó fertilizantes (49.72 %  $p=0.00917$ ). Los demás niveles de fertilización no tuvieron un efecto significativo (todos con un valor de  $p > 0.05\%$ ) en la asociación, así: F/2 (35.40 %), F (35.00 %) y 2F (39,20 %), muy parecidos entre ellos y muy cercanos al promedio general (Figura 1).

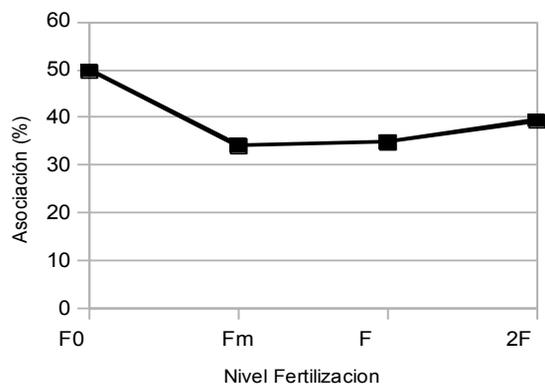


Fig. 1. Asociación (%) de los hongos HMA de acuerdo al nivel de fertilización, donde F0: sin fertilización, Fm: la mitad de la fertilización F: fertilización completa y 2F: dos veces la fertilización.

La asociación simbiótica también es afectada por el tipo de inóculo ( $p = 0.00048$ ), siendo mejor cuando se aplica un inóculo nativo (51.03 %,  $p = 0.000323$ , respecto al comercial), o cuando se favorece las condiciones para la asociación del inóculo basal existente en el suelo (43.95 %,  $p=0.0045$ , respecto al comercial), que cuando se aplica un inóculo comercial (36.25 %) (Figura 2).

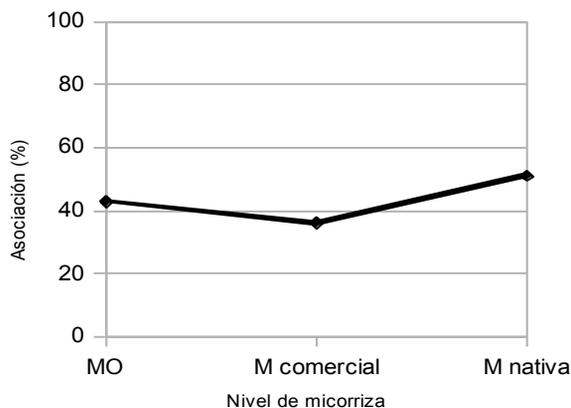


Fig. 2. Asociación (%) de los hongos HMA de acuerdo al tipo de micorriza, donde MO: sin aplicación de micorriza, Mcomercial: micorriza comercial, y Mnativa: micorriza nativa.

El uso simultáneo de los hongos HMA y la fertilización también afecta la micorrización de manera significativa ( $p= 0.004$ ), sin embargo, el efecto es positivo cuando el nivel de fertilización es de la mitad y no se aplican micorrizas o estas son nativas ( $p < 0.05$ ).

Cuando se aplica dos veces la fertilización o esta es completa y el inóculo de micorriza usado es comercial el efecto en la asociación es negativo (2F: micorriza comercial,  $p=0.001956$ ; F : micorriza comercial,  $p= 0.001228$ ) (Tabla 1), de manera similar, es significativa la interacción y además con efecto negativo, aunque de menor magnitud que en los dos casos anteriores, el uso de inóculos comerciales con la no fertilización (F0: M0,  $p= 0.024581$ ) o con la aplicación de la mitad de este ( $p= 0.026712$ ), (Figura 3).

En los demás casos no se detectaron evidencias de efectos significativos por las interacciones de las demás combinaciones resultantes entre los diferentes niveles de fertilización y el tipo de inóculo usado.

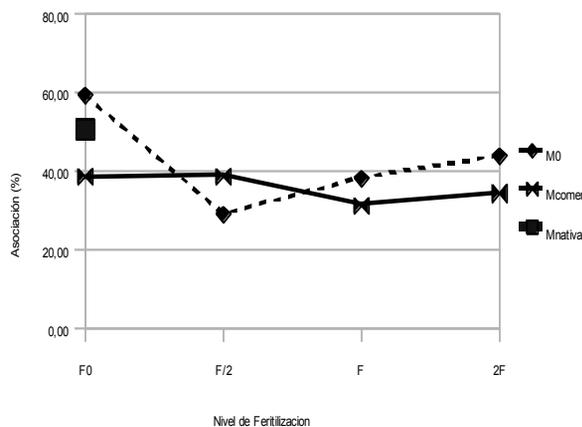


Figura 3. Interacción entre el tipo de micorriza y el nivel de fertilización en la asociación de los hongos HMA a *P clandestinum*, donde F0: sin fertilización, Fm: la mitad de la fertilización F: fertilización completa y 2F: dos veces la fertilización, M0: sin aplicación de micorriza, Mcomercial: micorriza comercial, y Mnativa: micorriza nativa.

La literatura reporta que aunque se ha detectado HMA en prácticamente todo tipo de suelos, su población y actividad se pueden afectar positiva o negativamente por condiciones ambientales, la presencia de nutrientes solubles y agroquímicos. Los resultados muestran como el factor fertilización

puede afectar el porcentaje de asociación en plantas de *Penissetum clandestinum*, estos corroboran lo reportado en otras investigaciones donde plantas de banano sometidas a un régimen intenso de fertilización en el sustrato presentan porcentaje de asociación afectados negativamente y bajos niveles de fertilizantes favorecen la asociación [14, 15, 16].

Así mismo, la relación positiva entre porcentajes de asociación y las micorrizas nativas en pasto *Penissetum clandestinum* se ha reportado también en plantas de banano [15], esto probablemente porque las especies de HMA se adaptan mejor a las condiciones del suelo que las especies foráneas y esto se refleja en mayores porcentajes de colonización.

Se considera que existen condiciones ecológicas que ejercen mayor influencia sobre la distribución y adaptación de HMA como las propiedades físico-químicas del suelo, y que existe un planteamiento biogeográfico donde cada especie tiene características propias adaptadas a un medio edáfico particular [17].

Esta relación entre los HMA y la fertilidad del suelo, se entiende dado los reportes que explican la aparición de esta asociación simbiótica en la evolución de las plantas, las cuales explican dicha asociación como una respuesta de las plantas a la superación de las deficiencias nutricionales de los suelos [2].

Así mismo la relación entre porcentajes de asociación y el tipo de inóculo, a la afinidad entre hongos HMA y algunas plantas y a la de los HMA a ciertos tipo de suelos [1]. Aunque la literatura reporta baja especificidad hongo-planta estos resultados sugieren cierto grado de afinidad, al menos, entre el origen del tipo de inóculo y la relación que pueda tener este con la planta hospedera y con el nicho en el cual esta se desenvuelve.

Tabla 1. Respuesta media del porcentaje de asociación y contenido foliar de nutrientes de acuerdo al nivel de fertilización y de micorrización.

Fertilización	Mic <sup>(1)</sup>	Asociación	%						mg kg <sup>-1</sup>			
			N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	B	S
F0 <sup>(2)</sup>	M0	59.43	1.47	0.12	1.07	0.07	0.12	0.28	8.09	23.61	14.29	80.22
	M1	38.70	1.46	0.11	1.36	0.08	0.11	0.26	5.76	16.70	13.55	118.69
	M2	51.03	0.60	0.23	0.93	0.11	0.44	0.29	7.47	10.44	20.46	78.40
F/2 <sup>(3)</sup>	M0	29.15	0.94	0.09	1.43	0.10	0.14	0.14	6.39	17.47	8.72	68.72
	M1	38.87	1.03	0.08	1.50	0.09	0.13	0.58	7.50	18.09	16.24	91.23
F <sup>(4)</sup>	M0	38.27	1.25	0.06	1.56	0.10	0.12	0.71	8.47	28.02	25.78	92.62
	M1	31.45	0.10	0.10	0.76	0.10	0.12	0.02	6.30	21.17	0.28	56.30
2F <sup>(5)</sup>	M0	44.00	1.87	0.07	1.64	0.10	0.13	0.12	3.34	14.28	8.27	82.30
	M1	34.40	0.87	0.06	1.08	0.67	0.11	0.46	5.84	21.27	16.02	49.89

<sup>(1)</sup>Micorrización, <sup>(2)</sup>Sin fertilización. <sup>(3)</sup>Fertilización completa con: 400 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup> de N, 224 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup> de P2O5 y 450 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup>. <sup>(4)</sup>Fertilización media con: 200 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup> de N, 112 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup> de P2O5 y 225 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup>. <sup>(5)</sup>Fertilización doble: 800 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup> de N, 448 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup> de P2O5 y 900 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup>.

Los resultados nos ratifican una vez más, que se requiere estudiar la relación, nivel de fertilización y el uso de inoculantes micorrizicos en los diferentes cultivos. La micorrización es un practica agronómica que debe integrarse de manera racional al cultivo, entiendo que los resultados de investigaciones reflejan, que cuando se incorporan esta práctica, el nivel de fertilizante sintético requerido suele disminuir, obteniendo los beneficios óptimos de la asociación en términos de funcionalidad y de costos. Adicionalmente se debe resaltar los resultados con el inoculo nativo, cuya adaptabilidad se refleja en mejor respuesta a la asociación y por ende en su funcionalidad, lo que conlleva a recomendar practicas agronómicas que favorezcan el mantenimiento del recurso micorrizal en el suelo y se evite la práctica de inoculación con cepas foráneas.

### Contenido nutricional

Se encontró que el contenido foliar de nutrientes de cada elemento en función de los factores fertilización y micorrización únicamente tuvo influencia por el tipo de inóculo de micorriza, y especialmente con los contenidos de fósforo y el magnesio. El tipo de inóculo de micorriza nativo fue el nivel que indujo a contenidos promedios de P y Mg superiores respecto a la micorriza comercial y al no uso de ningún tipo de micorriza (Tabla 2). No se encontró evidencias de diferencias en los promedios para los demás nutrientes frente a los diferentes niveles de los factores evaluados de manera individual ni interactivamente. Con los resultados en esta variable respuesta se ratifica la funcionalidad en la absorción de nutrientes de cepas nativas de HMA, adaptada a un medio edáfico particular con relación a cepas foráneas cuya adaptabilidad repercute en los efectos de la simbiosis.

Tabla2. Contenido promedio de nutrientes de acuerdo al tipo micorriza y comparaciones entre estos.

Micorriza	P <sup>(1)</sup>	Mg <sup>(2)</sup>
Sin mico	0,086 b <sup>(3)</sup>	0,114 b
Comercial	0,089 b	0,125 b
Nativa	0,227 a	0,435 a

<sup>(1)</sup>Fósforo. <sup>(2)</sup>Magnesio. <sup>(3)</sup>Letras iguales significa no diferencias entre los promedios con un  $\alpha = 0.05\%$ .

### Asociación micorrícica y contenido de nutrientes

Con respecto al contenido de nutrientes y la asociación micorrícica, se explica, mediante una superficie cuadrática, en un 56 % para contenido de P foliar en la planta ( $p = 0,0013$ ); los demás nutrientes analizados a nivel foliar no relacionaron de manera significativa con la asociación micorrícica.

### 3. CONCLUSIÓN

Se concluye que la fertilización y el tipo de inóculo micorrícico utilizado tienen influencia sobre el porcentaje de asociación. Este se ve favorecido por niveles bajos de nutrientes adicionados al suelo y usando inóculos nativos. A nivel de contenido foliar de nutrientes, solo el tipo de micorriza se relacionó con este, y la micorriza nativa fue el nivel que favoreció el contenido de P y Mg foliar respecto a los demás niveles. Estos resultados indican que una adición de nutrientes no siempre asegura una mayor absorción de estos y que el uso de micorrizas especialmente las nativas, si podrían favorecer una mejor nutrición de las plantas al menos respecto a P y Mg

### 4. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al laboratorio Ecología y taxonomía de hongos de la Universidad de Antioquia dirigido por la Dra. Ana Esperanza Franco Molano.

### 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Sieverding, E. 1991. Vesicular- Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. Technical Cooperation, Federal Republic of Germany.
- [2] Prager, M. 1999. Las Endomicorrizas en Agroecosistemas Colombianos. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Pp: 33-47.
- [3] Dodd JC, Burton CC, Burns RG, Jeffries P (1987) Phosphatase activity associated with the roots and the rhizosphere of plants infected with vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 107: 163-172. Feldmann F, Idczak E (1992)
- [4] Joner, E.J., Johansen, A. 2000. Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.*, 104: 81-86.
- [5] Azcón Aguilar, C.; Barea, J.M. 1992. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En Allen MF (Ed.) *Mycorrhizal Functioning. An Integrative Plant Fungal Process.* Chapman & Hall. New York, EEUU, Pp 163-198
- [6] Sieverding, E. 1984. Manual de Métodos para la investigación de Micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Cali, Colombia, 96p.
- [7] Newsham, K.K.; Fitter, A.H; Watkinson, A.R .1995. Arbuscular mycorrhiza protects an annual grass from root pathogenic fungi in the field. *J. Ecol.* 83: 991-1000.
- [8] Ruiz Lozano, J.M. , Azcon, R. 1995. Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiol. Plant.* 95: Pp:472-478.
- [9] Miller, R.M, Jastrow, J.D 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. En Kapulnik y, Douds DD (Eds.) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function.* Kluwer. Dordrecht, Holanda. pp. 3-18.
- [10] Rilling, M. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can. J. Soil Sci.* 84: 355-363.
- [11] Phillips, J. M., and D.B. Haymann. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizae fungi

for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55 (1): 158-161.

[12] INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI, 2006. Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos. Bogota, D.C. Pp: 238

[13] R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

[14] Arias, F.; Blanco, F. y Vargas, R. 1999. Evaluación de la infectividad de micorrizas arbusculares en plantas micropropagadas de banano (Musa AAA, cv. Valery) durante fases de invernadero y vivero. Corbana 25 (52): 173-188

[15] Usuga, C.E; Castañeda, D.A.; Franco E., Gomez, F. y Lopera, C. 2008. Efecto de la micorrización y la fertilización en la acumulación de Biomasa en plantas de banano (Musa AAA cv. Gran Enano) ( Musaceae)

[16] Blanco, F. y Salas, E. 1996. Micorrizas en la agricultura: contexto mundial de investigación realizada en Costa Rica. Agron. Costarricense. 21(1):55-67.

[17] Bolaños, M.M. 1998. Condiciones ecológicas que influyen sobre la población de endomicorrizas en la zona cafetera. En: Memorias IX Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo. Octubre 21-24 Paipa, Colombia. Pp: 120-121