

RESULTADOS EN LA OBTENCION DE INOCULOS NATIVOS DE HONGOS MICORRIZICOS EN CULTIVOS DE CACAO (*Theobroma cacao*) Y SOYA (*Glycine max*)¹

Rocío Morales² y Wuellins Durango³

INTRODUCCION

Los cultivos de cacao y soya han constituido un importante renglón para la economía de Ecuador, aunque en la actualidad enfrenta problemas de baja productividad por hectárea, alta incidencia de enfermedades, alta dependencia de insumos, entre otros. El cultivo de soya se desarrolla casi en su totalidad en la provincia de Los Ríos (98%) y el 33% de las plantaciones cacaoteras de edad avanzada también se encuentran en este sector (Enríquez G., 2004). En el Ecuador la superficie destinada a cacao entre asociado y monocultivo suma 364 418 hectáreas, siendo su volumen de producción 64 991 tm; mientras que para soya la superficie cultivada 58 576 hectáreas con un volumen de producción de 94091 tm (III Censo Nacional Agropecuario, 2001); determinándose así la importancia de los cultivos mencionados en el área socio económica del país.

El componente microbiano del suelo es importante para la salud de los ecosistemas. Los procesos agrícolas, así como el manejo de los recursos vegetales inciden sobre este componente afectando tanto a la biodiversidad como la densidad de las poblaciones microbianas implicadas; los resultados a mediano y largo plazo pueden ser la pérdida de fertilidad de los suelos y su progresiva pauperización. La sostenibilidad de un agroecosistema yace también en su menor dependencia de fertilizantes y pesticidas químicos. Dado que el sistema radicular de las plantas superiores está asociado no sólo a un ambiente inanimado, compuesto de sustancias orgánicas e inorgánicas, sino también a una vasta comunidad de microorganismos metabólicamente activos, es necesario evaluar la simbiosis del componente vegetal especialmente con hongos micorrízicos arbusculares (Morales, 2004).

El INIAP a través del Departamento de Protección Vegetal (DNPV) de la Estación Experimental Santa Catalina inició hace 10 años, investigaciones en micorrizas en cooperación con la Universidad de Minnesota; experiencias válidas cuyas actividades comprendieron la determinación de tipos de micorrizas asociadas al fréjol (*Phaseolus vulgaris* L), y su población. En conjunto al Programa de Papa del INIAP, el Centro Internacional de la Papa (CIP), y el Instituto de Ecología y Sistemática de Cuba, dentro del Proyecto Eco-suelos (Investigación para un manejo más productivo y sostenible de suelos andinos en la eco región Centro-Norte del Ecuador); se estudió la micorriza con énfasis al cultivo de papa, y como parte de los resultados, se identificó gran diversidad de micorrizas en los suelos andinos del Ecuador (Oyarzún, 1986).

Sobre la base de estos antecedentes se planteó esta investigación realizada en el marco del proyecto “*Establecimiento y mantenimiento de cepario de micorrizas nativas de cacao y soya (FUNDACYT, ahora SENACYT, PFN=RO3=008)*” con el objeto de explorar la simbiosis en condiciones naturales y aislar cepas nativas eficientes que puedan ser aplicadas en sistemas agrícolas en etapas posteriores.

Su principal objetivo es contribuir con nuevas alternativas en inoculantes a fin de mejorar la nutrición y por tanto el rendimiento de los cultivos de soya y cacao en el Ecuador; a través, de la selección y aplicación de cepas nativas de hongos micorrízicos eficientes, que además, aportarían a la conservación de los recursos naturales: suelo y agua.

¹ Proyecto financiado por SENACYT, ex FUNDACYT, desarrollado por el Dpto. de Protección Vegetal y Dpto. de Suelos de INIAP EESC y EETP, respectivamente, con colaboración del CEINCI, ESPE.

² Ing. Agrónoma. Especialista en Técnicas Microbiológicas de Suelo. Responsable de Laboratorio, ANCUPA.

³ Ing. Agrónomo. Responsable de Laboratorio de Suelos y Foliare, INIAP, Est. Exp. Tropical Pichilingue.

METODOLOGIA

El estudio, en su **fase de recolección de información y muestreo**, se desarrolló en lotes de sistemas de cultivo de cacao y soya representativos, de los cantones de Quevedo y El Empalme, correspondiente a las provincias de Los Ríos y Guayas, respectivamente. Inicialmente se realizaron encuestas para establecer un historial de los lotes. Los muestreos se realizaron en dos épocas climáticas: seca y lluviosa.

Por los resultados de las encuestas, se determinó que los factores en estudio serían:

Sistemas de cultivo cacao y soya:

- ✓ Soya de siembra directa (SD)
- ✓ Soya de siembra convencional (SC)
- ✓ Cacao en sistema agroforestal convencional (CA₁)
- ✓ Cacao en sistema agroforestal tecnificado (CA₂)
- ✓ Cacao en sistema monocultivo de manejo químico (CM₁)
- ✓ Cacao en sistema monocultivo de manejo orgánico (CM₂)

Épocas:

- ✓ Época lluviosa
- ✓ Época Seca

La Unidad Experimental correspondió a cada uno de los sitios establecidos en las diferentes localidades que formaron parte del muestreo. La parcela neta estuvo conformada por 1 muestra de suelo compuesta de una cantidad aproximada de 2kg. Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA), en arreglo factorial SxE: 6x2 (seis sistemas por dos épocas), con tres observaciones.

Se realizó a prueba de Tukey al 5%, para tratamientos, para épocas, sistemas e interacción y comparaciones ortogonales se utilizó DMS 5%.

En la **fase de reproducción e incremento de inóculo** de micorriza asociados a cacao y soya, se trabajó mediante trampeo bajo invernadero en la Estación Exp. Tropical Pichilingue, ubicada en el cantón Quevedo, provincia de Los Ríos; con inóculo a partir de cada una de las muestras colectadas en los diferentes sitios de estudio.

Para la reproducción de hongos arbusculares se utilizó el método de contenedores trampa, para lo cual se utilizó macetas plásticas de 8 kg de capacidad, donde se colocó un sustrato producto de la mezcla de suelo, pomina y tierra de plantaciones de cacao y soya, respectivamente, en una proporción de 1:1:2, esterilizado por 1 hora a 15 PSI y secado al ambiente. Como inóculo madre se usó el suelo colectado, aplicado a un hoyo sobre el cual se dispuso 20 semillas de la planta hospedera (arroz, var. INIAP 14), en cada una de las macetas, las cuales se mantuvieron en condiciones de invernadero durante 120 días, para finalmente, en base a la capacidad de colonización de los diferentes consorcios micorrízicos y la respuesta agronómica de las plantas trampa, seleccionar los “inóculos” a ser probados en condiciones controladas y de campo.

Los factores en estudio para esta fase fueron los seis (6) sistemas de cultivo entre soya y cacao.

La unidad experimental, estuvo conformada por 1 maceta de 8 kg de capacidad. El ensayo total estuvo conformado por 18 macetas conteniendo a las plantas trampa, dispuestas al azar bajo condiciones de invernadero. Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con tres observaciones.

Se realizó la prueba de Tukey al 5% para tratamientos; mientras que para sistemas de cacao y de soya se aplicó DMS 5%.

En la fase inicial las variables fueron:

Población de esporas: cuantificación por el método de tamizado y decantación en húmedo con centrifugación, Gerdemann y Nicholson (1963). Para la establecer la diversidad se trabajó en base a las características de clasificación taxonómica proporcionas por el INVAM (2006).

Porcentaje de colonización micorrízica: se realizó mediante el método de despigmentación y tinción de raíces, siguiendo la técnica de Phillips y Hayman, descrita por Herrera (1993).

En la fase de trampeo e incremento de inóculo las variables fueron:

Número de hojas: Se contabilizó el número de hojas de tres plantas al azar en cada una de las macetas. Esta variable se evaluó a finales del primero, segundo y tercer mes del ciclo de incremento de inóculo.

Altura de planta: Se evaluó el incremento en altura de tres plantas al azar en cada una de las macetas. Esta variable se evaluó a finales del primero, segundo y tercer mes del ciclo de incremento de inóculo.

Peso seco de la parte aérea: Se tomó el peso fresco de la planta para luego colocarla en la estufa por 24 h a 105° C, registrando finalmente el peso seco. Esta variable se evaluó al final del ciclo de incremento del inóculo (3 meses).

Porcentaje de colonización micorrízica: se realizó mediante el método de despigmentación y tinción de raíces, siguiendo la técnica de Phillips y Hayman, descrita por Herrera (1993).

RESULTADOS

Fase de evaluación y muestreo:

Población de esporas de hongos micorrízicos

Se realizó el análisis de varianza, considerando a las épocas climáticas como tratamientos y a las localidades como observaciones y expresó no existir diferencias estadísticas, es decir, que no difiere el comportamiento en número de esporas para épocas climáticas. Sin embargo, en base a los promedios transformados, se puede observar que existe mayor número de esporas en la época de seca. Al realizar el análisis de varianza por época climática, se encontró diferencias significativas entre los sistemas de cultivo únicamente en la época húmeda (Figura 1).

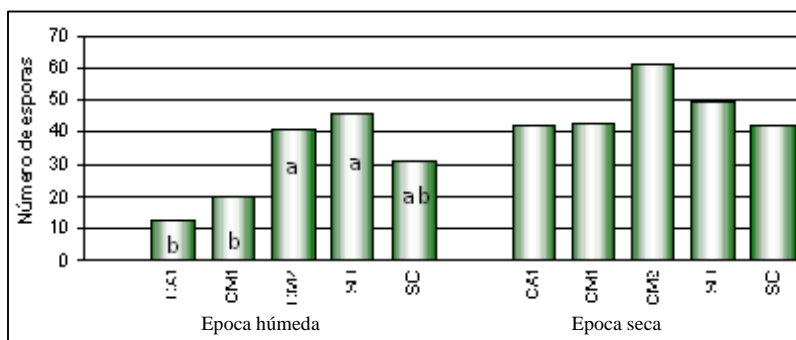


Figura 1. Número promedio de esporas de hongos micorrízicos por época climática en los diferentes sistemas de cultivo estudiados en la obtención de inóculos nativos de cacao y soya

Tasa de colonización radical

Los valores obtenidos al analizar la frecuencia de micorrización en los diferentes sistemas de cultivo estudiados, dieron el mayor valor para el sistema de cacao monocultivo orgánico y soya de siembra directa en las dos épocas climáticas, discriminados por el análisis de medias para invierno y verano (Figura 2).

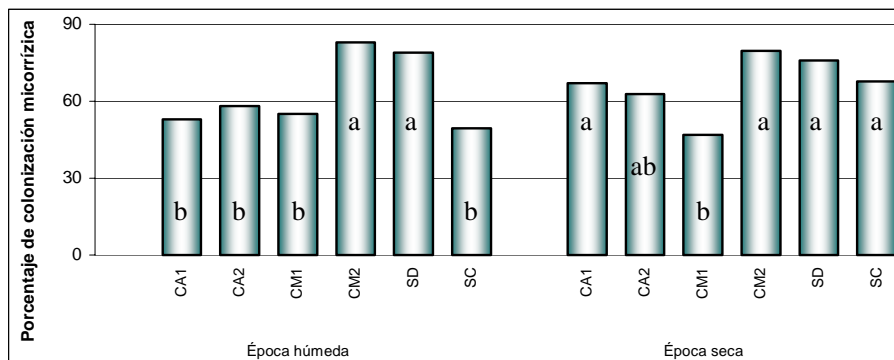


Figura 2. Porcentaje de colonización micorrízica por época climática y sistemas de cultivo estudiados en la obtención de inóculos nativos de cacao y soya.

Fase de trapeo e incremento

Número de hojas

Al realizar el análisis de variancia para número de hojas no se obtuvo diferencias estadísticas en el promedio total, aunque sí se obtuvo en la segunda evaluación (a los 60 días), siendo los sistemas agroforestales de cacao los que se ubicaron en el primer rango. Sin embargo, se puede concluir que hay similitud en el comportamiento de todos los sistemas de cultivo (Figura 3).

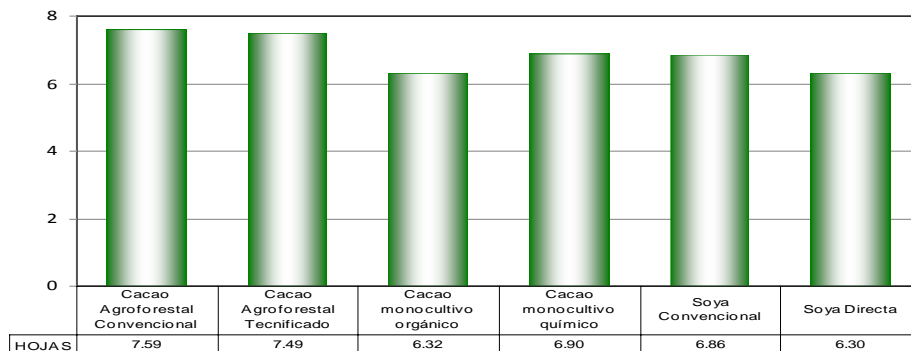


Figura 3. Número de hojas de promedio evaluadas en plantas trampa en la obtención de inóculos nativos de cacao y soya.

Altura de planta

Mediante análisis de variancia se colocó en el primer rango al sistema agroforestal convencional, y en el último rango al sistema de siembra directa de soya (Figura 4). Sin embargo el rango de diferencia numérica no es muy amplio dentro de las cantidades obtenidas en esta variable.

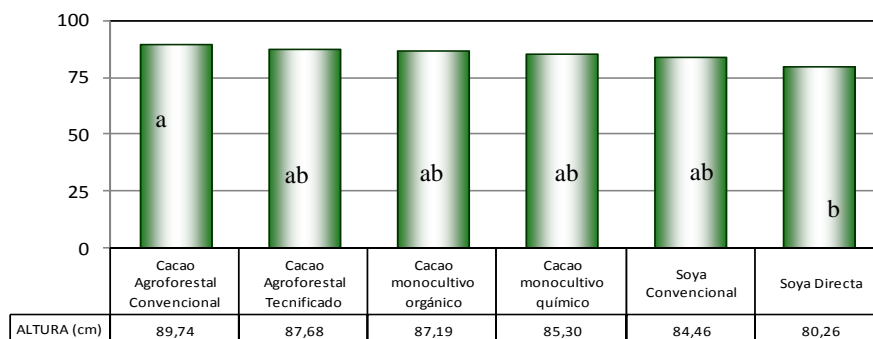


Figura 4. Altura promedio de las plantas trampa evaluadas en la obtención de inóculos nativos de cacao y soya.

Peso seco de la parte aérea

No existieron diferencias significativas en el peso seco producido por la masa foliar de las plantas trampa (Figura 5). El valor promedio fue evaluado a los noventa días de trampeo, donde ya existían hojas viejas en mezcla con hojas funcionales. Este pudo ser un factor, tanto para la similitud estadística como para los bajos valores obtenidos en esta variable.

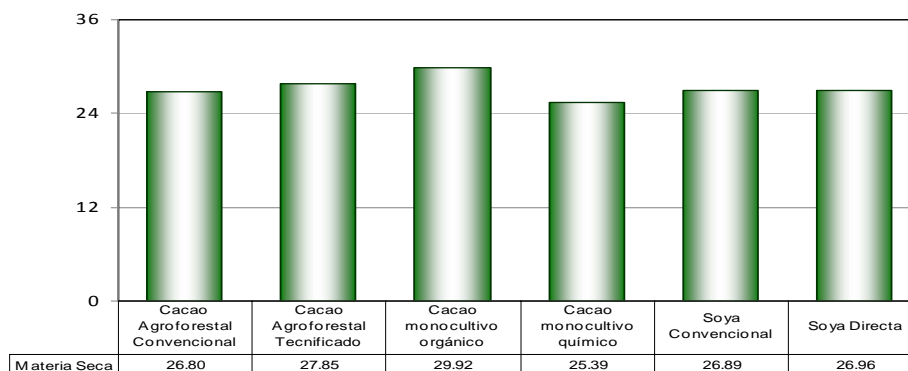


Figura 5. Peso seco de plantas trampa en la obtención de inóculos nativos de cacao y soya.

Tasa de colonización radical

Mediante análisis de variancia, se determinó la similitud estadística en el comportamiento, tanto en la tasa de infección micorrízica como en la densidad visual del endófito (Figura 6). En términos relativos, la densidad del endófito se presenta inferior a la esperada en condiciones controladas y de trampeo, cuyo máximo valor es 47.5%., mientras que en la gramínea utilizada como planta trampa

(arroz), no supera el 5%. Las frecuencias de colonización superaron el 70%, lo que demuestra la capacidad infectiva de los inóculos en forma grupal.

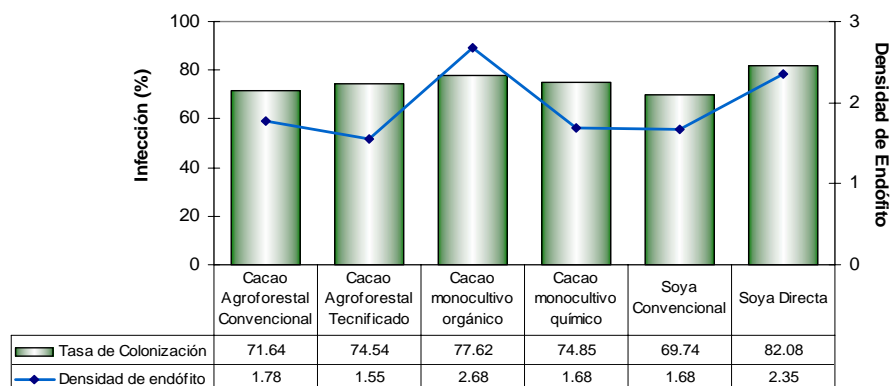


Figura 6. Porcentaje de infección y densidad del endófito, manifestado en plantas trampa en la obtención de inóculos nativos de cacao y soya.

Correlaciones entre los factores en estudio

Se encontró una correlación negativa entre la población de esporas y las épocas climáticas ($r=-0.12$). Al realizar correlaciones entre los factores en estudios no se encontraron correlaciones entre número de esporas y colonización micorrízica (0.531; pr 0.07), sugiriendo que estos factores se comportan independientemente. En la época seca se encontró alta correlación entre estas dos variables (0.85; pr 0.03).

Correlacionando los datos de los análisis de suelos realizados y las variables medidas, se observa una correlación negativa entre pH y porcentaje de colonización (-0.58615; pv 0.0276), con igual comportamiento con Calcio (-0.56476; pv 0.0354), Magnesio (-0.53939; pv 0.0465) y Zinc (-0.56733; pv 0.0344).

DISCUSION

En la fase de evaluación y muestreo, no se observaron variaciones temporales en la comunidad de hongos arbusculares. Ligeramente se observa mayor población en la época seca y diferenciación marcada entre sitios de estudio en la época de invierno. El porcentaje de colonización micorrízica no varía entre las épocas, lo que sugiere que los cambios medioambientales pueden estar influenciando a especies individuales de hongos arbusculares dominantes en estos ecosistemas; se considera también que las respuestas micorrízicas pueden estar influenciadas por la etapa fenológica, edad e historia del hospedero.

Heijden *et al* (2004) sostiene que en suelos agrícolas usualmente existe baja diversidad de hongos arbusculares variando su respuesta en dependencia de las variaciones de la comunidad vegetal, contrastando con comunidades perennes como pastos o bosques tropicales, las cuales contienen comunidades complejas de hongos arbusculares con alta diversidad. Añade que aún no está clara la interacción entre la diversidad de hongos arbusculares y ecosistemas y su influencia en la nutrición de plantas y funcionalidad de los ecosistemas, considerando el comportamiento individual de los hongos arbusculares, el autor recomienda mayores estudios de taxonomía en combinación con herramientas moleculares y morfológicas y futuros estudios con la combinación de varias especies del hongo,

reconstruyendo la comunidad que se encuentra en condiciones naturales, cuyos resultados revelarían aspectos de diversidad funcional.

La diversidad de hongos arbusculares en campo ha sido tradicionalmente estimada en base a conteos de esporas, sin embargo es necesario considerar que la esporulación del hongo es gobernada por muchos factores bióticas y abióticos; por lo tanto las esporas no son un índice directo de diversidad o funcionalidad (Morton *et al.* 1995; Bever *et al.* 1996; Eom *et al.* 2000), en el presente estudio la población de esporas no se correlaciona directamente con los factores evaluados. Complementando, Clapp *et al.*, 1995 menciona una mínima correlación entre población y colonización radical.

Las diferencias de resultados entre los sitios estudiados, reflejan la influencia en los hongos arbusculares de factores del suelo como pH, contenidos de nutrientes, los cuales ya se han reportado como factores que determinan la distribución de esporas (Cuenca y Meneses, 1996). En el presente no se encontraron mecanismos que mantengan o diferencien la relación entre los hospederos y los hongos arbusculares, sin embargo de que varias investigaciones reportan que la tasa de esporulación varía bajo diferentes especies de hospederos; pero si se muestra que la población fúngica y la simbiosis es afectada severamente por las diferentes prácticas agrícolas propias de los sistemas de cultivo estudiados; observando que sistemas agrícolas convencionales muestran valores menores de la comunidad de la simbiosis y los sitios con prácticas de rotación de cultivos y cero labranza revelaron valores notables de la simbiosis.

En la fase de incremento de inóculo mediante trapeo, bajo condiciones de invernadero, el comportamiento micorrízico, mediante variables agronómicas y biológicas correspondientes a esta simbiosis, denotan un comportamiento similar, lo que recalca las explicaciones previas en este documento. El sustrato utilizado en el trapeo fue el mismo para todas las macetas trampa, es decir, las condiciones físico, químicas y biológicas fue homóloga para las “cepas” evaluadas, lo que pudo incidir en la respuesta individual de cada una, que estadísticamente nos dio un rango amplio para la selección de inóculos a ser evaluados en soya y cacao en condiciones de invernadero y vivero, respectivamente y luego en cultivo de soya en campo y en fases de adaptación en cacao micropropagado.

Bernal y Morales (2006), mencionan que los factores previos a la selección de inóculos micorrízicos comprenden: diversidad, especificidad, dependencia hongo-planta, estado nutricional del suelo, potencial de los hongos nativos, eficiencia en infección endomicorrízica y efectividad mediante parámetros agronómicos. El estudio comprendió por ello varias fases de evaluación, siendo cada una de igual importancia para la selección final de los materiales a elegir.

CONCLUSIONES

- Las prácticas culturales influyen directamente a las poblaciones de hongos arbusculares y la simbiosis. Prácticas de rotación de cultivos, sistemas de cobertura y otras deben ser practicadas para mantener la diversidad y funcionalidad de la micorriza arbuscular, independientemente del hospedero y el ecosistema en que se desarrolle.
- En la fase de evaluación, los sistemas cacao orgánico y soya de siembra directa, expresaron valores representativos en el funcionamiento de la simbiosis, esto sugiere mayor adaptación al ecosistema en que se desarrolla y presencia de especies funcionales de hongos micorrízicos, aspecto a considerarse al momento de seleccionar propágulos nativos para experimentación en condiciones de invernadero o campo.
- En la fase de incremento mediante trapeo, la poca diferenciación de los materiales provenientes de los diferentes sistemas, sugiere evaluar para el caso del cultivo de soya, los dos materiales: siembra directa y siembra convencional. Mientras que por las ligeras

diferencias entre los sistemas de cacao se sugiere probar: el cultivo orgánico y el sistema agroforestal convencional, basados principalmente en el potencial y calidad de las esporas, así como la diversidad que presentó.

- Las cepas evaluadas e incrementadas deben ser almacenadas adecuadamente como un banco germoplásmico, pues frente a posibles pérdidas potencialidad en una generación F3, se deberá volver a trabajar desde el F1, que es el resultado de este material propagado.
- Para el uso del inóculo se debe considerar que la fuente no solo consiste en el sustrato compuesto sino las raíces picadas de las plantas trampa, una vez que se haya sometido a la fase de estrés hídrico.

RECONOCIMIENTOS

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, Estaciones: Santa Catalina y Pichilingue
Centro de Investigaciones Científicas, CEINCI-ESPE.
Ing. Agr. Marco Taípe, asesor en el área de Biometría y Bioestadística.

BIBLIOGRAFIA

- Bernal, G. y R. Morales. 2006. Micorrizas: Importancia, Producción e Investigación en el Ecuador. Pub. por ANCUPA y GAIA. Ed. Massgraficos. Quito, EC.
- Bever, J.D., J.B. Morton, J. Antonovics, y P.A. Schultz. 1996. Host-dependent sporulation and species diversity diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *Journal of Ecology*, 84, 71-82.
- Clap, J.P., J.P. YOUNG, J.W. MERRYWEATHER, y A.H. FITTER. 1995. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from natural community. *New Phytologist*, 140, 259-265.
- Cuenca, G. y E. MENESES. 1996. Diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungus associated with cacao in Venezuela. *Plant and Soil*, 183,315-322.
- Duchicela, J. y M.A. Gonzales. 2003. La Micorriza arbuscular en el contexto de la agricultura sustentable. Monografía CEINCI -02-03, ESPE, Quito, EC.
- Enriquez, G. 2004. Cacao Organico, Guia para productores ecuatorianos, Manual N° 54. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Quito, EC.
- EOM, A.H., D.C. Hartnett, y G.W. Wilson. 2000. Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia*, 122, 435-444.
- Gerdemann, J. y T. Nicholson. 1963. Spores of Mycorrhizal Endogone Species extracted from soil by wet sieving and decanting. *British Mycological Society* 46:235-244
- Heijden, M., R. Tanja, y A. Brader. 2004. Taxonomic and functional diversity in arbuscular mycorrhizal fungi – is there any relationship? *New Phytologist*, 164 201 – 204.
- Herrera, R. 1993. General methodology to analyze rootlets, raw humus and VA mycorrhizal (VAM) components. *Cuba*. p. 1-8

- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICAS Y CENSOS. 2001. III Censo Nacional Agropecuario. INEC, Quito (EC). En línea. Disponible en: www.sica.gov.ec. Consultado el 09 de Enero 2006.
- INTERNACIONAL CULTURE COLLECTION OF ARBUSCULAR & VESICULAR ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI. 2006. Disponible en: www.invam.caf.wvu.edu
- Morales, R. 2004. Estudio de la diversidad microbiana en sistemas agroforestales de café (*Coffea sp.*), y cultivos de pastos y arroz (*Oriza sativa*), en dos tipos de suelo del sur de Manabí. Tesis de Grado. Ingeniera Agrónoma. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas.
- MORton, J.B., S.P. BEntivenga, y J.D. Bever. 1995. Discovery, measurement and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungus (Glomales, Zygomycetes). Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique, 73, S25-S32.
- Oyartzún, P. 1986. Efecto de las micorrizas vesículo-arbusculares en algunos cultivos agrícolas. Tesis de Doctorado.