

# **Efecto de la inoculación con *Glomus iranicum var tenuihypharum* sobre la respuesta nutricional de plantas de pimiento cultivadas sobre fibra de coco.**

R. Alcobendas<sup>1</sup>, M. Parra<sup>1</sup>, J.M. Bayona<sup>1</sup>, F. Fernández<sup>2</sup>, C. Romero<sup>1</sup>, E. Nicolás<sup>1</sup>, J.J. Alarcón<sup>1</sup>.

1. Departamento de Riego, CEBAS-CSIC, Apto. correos 164, C.P.30100 Espinardo, España
2. SYMBORG.SL. Departamento I+D. Campus de Espinardo 7, Edificio CEEIM. CP 30100. España.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, micorrizas, cultivo sin suelo, *Glomus iranicum var tenuihypharum*.

## **Resumen**

El efecto beneficioso de la inoculación de HMA en establecimiento de semilleros, así como en cultivos en suelo ya establecidos ha sido demostrado en numerosos estudios, sin embargo el uso de estos microorganismos en cultivo sin suelo no es una práctica habitual debido a la escasez de estudios que abordan la capacidad de las micorrizas de colonizar los sustratos y tampoco los cambios que se producirían en las soluciones nutritivas utilizadas en estos sistemas de cultivo para el adecuado establecimiento de la simbiosis hongo-planta. Con estos antecedentes, se planteó un ensayo con plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tipo California cultivadas en fibra de coco e inoculadas con la especie *Glomus iranicum var tenuihypharum*., con el fin de estudiar, por un lado, el establecimiento del hongo en este tipo de sustrato y, por otro, su influencia en la disponibilidad de nutrientes, sus efectos sobre la fisiología de la planta, el rendimiento y calidad de la cosecha del cultivo. Los principales resultados mostraron que las plantas micorrizadas presentaron un mayor número de flores y brotaciones laterales posiblemente relacionado con un patrón de expresión hormonal diferente entre tratamientos. Además se observó un incremento en el desarrollo radicular y en la producción de materia seca en las plantas tratadas, siendo en general los frutos procedentes de estas plantas de mejor calidad (mayor firmeza, en los tres muestreos realizados y mayor contenido en °Brix, en los dos últimos). La producción total del tratamiento inoculado con esta especie fue un 9.4% mayor que la de las plantas sin tratar al final del periodo de cosecha, destacando significativamente el incremento productivo de las plantas micorrizadas con respecto al control en el último corte realizado (primeros de agosto), que fue del 33%, momento en el que las plantas entraron en una fase de senescencia provocado por el efecto de las altas temperaturas características de este período estival.

## **INTRODUCCIÓN**

El pimiento (*Capsicum annuum* L.), es uno de los principales cultivos hortícolas de la Región de Murcia. En esta zona, las plantaciones se realizan entre los meses de noviembre-diciembre, con recolecciones que se inician sobre el mes de marzo y pueden prolongarse hasta el mes de agosto e incluso más tiempo, si los precios del mercado se mantienen asequibles. Es un cultivo bastante exigente en cuanto a condiciones climáticas, sobre todo la temperatura, además es sensible al efecto de agua con elevadas conductividades eléctricas, con lo cual, requiere agua de buena calidad y un control adecuado de las concentraciones de nutrientes en las soluciones usadas en fertirriego sobre

todo cuando se cultiva en sustrato. En este tipo de sistema agrícola intensivo, el uso de tecnologías que permitan optimizar el uso del agua, la nutrición vegetal y lograr un mayor desarrollo vegetativo y productivo, cobra especial relevancia. Dentro de estas tecnologías se encuentran los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA), los cuales establecen asociaciones mutualistas con el 85% de las plantas con interés agronómico (Smith y Read, 1997), presentando una alta especificidad con el suelo en donde se desarrolla (Wu *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2011) y aportándole a las plantas ventajas tales como: una mejor disponibilidad de agua y mayor capacidad de absorción de nutrientes, así como una mejora del desarrollo del sistema radicular (Rivera *et al.*, 2005; Hamel y Plenchette, 2007). Además, aportan ciertos beneficios respecto a la tolerancia de la planta a determinados estreses bióticos (generalmente infecciones de hongos de suelo (Cassiolata y Melo, 1991; Garmendia *et al.*, 2006) o de nemátodos (Cooper y Grandison, 1986, Jaizme-Vega *et al.*, 2001)) sobre todo cuando se realizan inoculaciones en fase de semillero. Los efectos positivos también se observan a nivel de producción: la inoculación del hongo micorrízico *Rizophagus intraradices* a plantas de pimiento, bajo un sistema de fertirriego y en condiciones de invernadero promovió una mejor calidad del fruto al aumentar los valores de longitud, ancho y peso de fruto (Díaz-Franco *et al.*, 2013).

El comportamiento de los HMA en cultivo sin suelo no ha sido muy estudiado hasta el momento. Las concentraciones de nutrientes utilizadas en estos sistemas de cultivo pueden afectar al establecimiento de la simbiosis micorrízica. Sin embargo algunos ensayos realizados hasta el momento han mostrado buenos resultados. La inoculación con *Glomus fasciculatum* de plantas de tomate cultivadas en perlita aumentó significativamente la producción neta y el tamaño de los frutos (Dasgan *et al.*, 2008) aunque sin efecto significativo sobre el crecimiento vegetativo. Ikiz *et al.*, (2009) encontraron que la inoculación, tanto en el momento de la siembra como en el trasplante, con dos especies diferentes de hongos formadores de micorrizas, de plantas de pimiento cultivadas en perlita, aumentaba el peso seco de las plantas cuando se comparaban con un control sin inocular.

Con el objetivo de conocer mejor la actuación de los hongos formadores de micorrizas en cultivo sin suelo, se planteó un ensayo con plantas de pimiento inoculadas con la especie *Glomus iranicum var tenuihypharum* y cultivadas en fibra de coco, estudiando por un lado, el establecimiento del hongo en este tipo de sustrato y, por otro, su influencia en la disponibilidad de nutrientes, sus efectos sobre la fisiología de la planta, el rendimiento y calidad de la cosecha del cultivo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El ensayo se llevó a cabo en un invernadero experimental de 60 m<sup>2</sup> situado en la finca “Tres Caminos”, (propiedad del CEBAS-CSIC) y situada en Santomera (Murcia). Se utilizaron plantas de pimiento tipo California, variedad “Tamarín” (Enza Zaden) cultivadas en sacos de fibra de coco (100x18x16, Andhra). El trasplante se realizó el 29 de febrero de 2012 y se prolongó hasta final de julio de 2012. Se utilizó riego por goteo con una solución nutritiva estándar para cultivo de pimiento modificándola según el estado de desarrollo de la planta. Las dosis de riego se determinaron en función de los drenajes, manteniendo siempre éstos entre un 25% y un 30%.

Se evaluaron dos tratamientos: T0 o control sin inocular y T1 o micorrizado, donde se realizó una única inoculación con el hongo *Glomus iranicum var tenuihypharum* con una dosis de 3 kg/ha, correspondiente a 0.5 g.p<sup>-1</sup>, 9 días después del trasplante (DDP).

Se realizaron un total de tres muestreos durante el ensayo (días 49, 104 y 152 DDP) en los que se muestrearon un mínimo de 6 plantas completas por cada tratamiento. En cada

muestreo se midieron, por un lado, parámetros de crecimiento: altura y diámetro de tallo de cada planta, número y peso de brotes laterales, área foliar (LICOR LI-3100 area meter), peso fresco y seco de hojas y tallos, n° de flores abiertas/cerradas y número, tamaño y peso de frutos. La distribución de nutrientes en la planta a lo largo del cultivo se determinó mediante análisis foliar (digestión mineral y análisis por ICP). Para determinar la influencia de esta especie de HMA sobre la disponibilidad de nutrientes en el medio radicular, se determinaron las concentraciones de absorción (cantidad de nutriente absorbido por volumen de agua consumido). Para ello, se realizaron análisis químicos y medidas de los volúmenes de la solución nutritiva de riego aplicada y del lixiviado producido siguiendo la metodología descrita por Sonneveld (2002), con una frecuencia de entre 7 y 15 días.

La cuantificación de la colonización micorrízica se realizó a través del método de los intersectos desarrollado por Giovanetti y Mosse, (1980), a partir de muestras de raíces jóvenes, que fueron lavadas con agua desionizada y clarificadas con una solución al 10% de KOH durante 10 minutos a 90°C. Posteriormente se pasaron por HCl 2N, durante 10 minutos y finalmente fueron teñidas con una solución de 0.05 lacto glicerina - Azul de tripano, lo que constituyó una modificación del método descrito por Phillips y Hayman (1970).

Para la evaluación de la producción total y comercial, se realizaron ocho cortes a lo largo del ensayo (entre el 7 de mayo y el 1 de agosto). Los frutos se recolectaron en verde y cuando éstos tenían el tamaño mínimo para ser considerados comerciales. En tres de los cortes se evaluó la calidad de la cosecha tomando una muestra de 40 frutos por tratamiento. Los parámetros de calidad medidos fueron: Peso, perímetro y altura de cada fruto, espesor de corteza, firmeza (penetrómetro Durofel DFT-100), contenido en sólidos solubles (refractómetro Atago) y color (colorímetro Minolta Sensing CR-10).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los muestreos realizados mostraron un elevado porcentaje de colonización en las plantas de pimiento inoculadas con el hongo micorrízico arbuscular que oscilaron entre un 40% al inicio del ensayo, y un 30% a lo largo del mismo, valores que evidencian el correcto establecimiento y desarrollo del hongo durante todo el ciclo de cultivo. En las plantas del tratamiento control (T0) no se observó colonización micorrízica nativa, lo cual era previsible debido a la ausencia natural de estos hongos en el sustrato utilizado.

Respecto a los parámetros evaluados relacionados con el crecimiento y la producción de biomasa aérea, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tres muestreos realizados (datos no mostrados), aunque las plantas micorrizadas siempre mostraron una tendencia a presentar un mayor número de flores, así como una mayor producción de brotaciones laterales. Sin embargo, el tratamiento micorrizado con *Glomus iranicum var tenuihypharum*, sí aumentó el peso seco de las raíces con respecto a las de las plantas control en los tres muestreos realizados (6.1 frente a 7 g·pl<sup>-1</sup>, 13.9 frente a 14.6 g·pl<sup>-1</sup> y 21.4 frente a 32.5 g·pl<sup>-1</sup> para plantas control y micorrizadas, respectivamente).

Las variaciones en las concentraciones de absorción de los principales macronutrientes a lo largo del cultivo y para los dos tratamientos ensayados, se muestran en la Figura 1. En los primeros 40 días después de la inoculación, existió una ligera disminución en la absorción de N, P, Ca y Mg en el tratamiento micorrizado con respecto al control. Es posible que, en este momento, el sistema radicular de las plantas inoculadas aún no haya alcanzado el equilibrio con el establecimiento de la simbiosis micorrízica, denominada fase de transición, en donde los componentes micorrízicos del sistema

radicular aún no están en equilibrio, existiendo cierta competencia en la disponibilidad de nutrientes entre ambos simbiontes (Bethlenfalvay, Brown y Pacovsky, 1982). Sin embargo, a partir del mes de mayo, las concentraciones de absorción son, en general, ligeramente mayores para las plantas micorrizadas, diferencias que se mantienen hasta el final del periodo de ensayo. Las concentraciones de absorción variaron, sobre todo, en función de las condiciones climáticas y del estado de desarrollo de la planta. En este ensayo, el comienzo de la fase de equilibrio entre desarrollo vegetativo y productivo de las plantas, coincide con el inicio del periodo estival y cierta variabilidad climática importante, alternándose días con temperaturas mínimas de 14 °C con otros donde las mínimas pasaban de 21°C y alcanzándose máximas por encima de 40°C. En las gráficas de absorción se observa, sin embargo, que durante este periodo, las concentraciones de absorción de N, Ca, K y Mg en el tratamiento micorrizado presentaron menores variaciones que en el tratamiento testigo, lo cual podría significar que las plantas inoculadas mantiene un mejor equilibrio nutricional, en condiciones de estrés. Esta tendencia también se vio reflejada en el contenido iónico foliar de plantas control y micorrizadas (tabla 1) en el último muestreo realizado, donde los niveles de Ca, K, Mg y Zn fueron ligeramente superiores en las plantas micorrizadas con respecto a las del tratamiento control.

En la figura 2 se muestra la producción mensual ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ) de las plantas micorrizadas con respecto al control. Durante todo el periodo de cosecha, la producción de las plantas inoculadas fue mayor que las plantas control, con incrementos productivos que oscilaron entre el 2 y el 33% en el último corte realizado, dando una producción total de  $11.6 \text{ kg m}^{-2}$  frente a  $10.6 \text{ kg m}^{-2}$  para los tratamientos micorrizado y control, respectivamente, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Similares resultados, en términos de incremento productivo, con esta especie de HMA, se han obtenido en diferentes cultivos como arroz (Fernández *et al.*, 2010), lechuga (Vicente-Sánchez, 2011) o parral (Nicolás *et al.*, 2014). En ensayos de tomate en cultivo sin suelo usando tanto sistema abierto como cerrado, se encontraron diferencias significativas en cuanto a producción sin que se vieran diferencias a nivel de desarrollo vegetativo (Dasgam *et al.*, 2008). Cuando la asociación simbiótica es funcional y eficiente, hay un claro efecto beneficioso sobre el incremento productivo de diversos cultivos sobre todo en condiciones de bajos insumos, agricultura extensiva y situaciones de estrés (Terry *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2005; Hamel y Plenchette, 2007; Herrera *et al.*, 2011).

En cuanto a los parámetros de calidad evaluados, los frutos del tratamiento micorrizado mostraron valores más elevados de firmeza y mejores indicadores de color en los tres muestreos realizados, con respecto al tratamiento control, mientras que el contenido en sólidos solubles fue mayor sólo en los dos últimos muestreos (Tabla 2). Este incremento en la firmeza así como la mejora en los grados Brix en los dos últimos muestreos, podrían estar relacionadas con la mejor absorción y estado nutricional en Ca, K o Mg que mostraron las plantas inoculadas con respecto al control (Fig. 1; Tabla 1), sobre todo en el último mes del ensayo lo que podría influir en una mayor distribución de los asimilados hacia el fruto.

El tratamiento micorrizado por la cepa seleccionada, produjo un incremento medio del 9% en la productividad de plantas de pimiento cultivadas en invernadero, así como frutos de mejor calidad (más firmes, con una mayor intensidad de coloración y un mayor contenido en sólidos solubles). Respecto a la fisiología de la planta, las plantas inoculadas fueron más activas en la captación de los nutrientes presentes en la solución de fertirrigación y tuvieron tendencia a emitir mayor número de flores y brotaciones laterales. *Glomus iranicum var tenuihypharum*, tuvo una elevada capacidad de colonización y un

adecuado establecimiento radicular durante todo el ciclo del cultivo, proporcionando un efecto estimulador tanto nutricional como fisiológico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bethlenfalvay, G. J, Brown, M.S, Pacovsky, R. S. Relationships between host and endophyte development in mycorrhizal soybeans. *New Phytologist*. 90:537-543, 1982.
- Cassiolata, A.M.R. and Melo, I.S. 1991. Interaction between *Rhizoctonia solani* and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in tomato. *Summa Phytopathologica*, 17 (3): 195-200.
- Cooper, K. and Grandison, G.S. 1986. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and root-knot nematode on cultivars of tomato and white clover susceptible to *Meloidogyne hapla*. *Ann.Appl.Biol.*108:555-565
- Dasgan, H.Y., Kusvuran, S. and Ortas, I. 2008. Responses of soilless grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal (*Glomus fasciculatum*) colonization in re-cycling and open systems. *African Journal of Biotechnology* 7 (20): 3606-3613.
- Díaz-Franco, A., Alvarado Carrillo, M., Ortiz Chairez, F. y Grageda Cabrera, O., 2013. Nutrición de la planta y calidad de fruto de pimiento asociado con micorriza arbuscular en invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol. 4 (2): 315-321.
- Fernández, F., Rivera, R., Herrera, R. y Furrázola, E. 2005. Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares y diferentes relaciones suelo: humus de lombriz sobre el crecimiento del cafeto (*Coffea arabica*. L) var. Catuaí bajo la etapa de vivero en Cuba. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. Vol. 11, nº. 1 (enero-junio 2005), p. 175-184
- Fernández, F., Dell'Amico, J.M., Alarcón, J.J., Nicolás, E. y Pedrero, F. 2010. Mejora del rendimiento del cultivo del arroz mediante la aplicación de micorrizas aisladas en condiciones salinas. *Agricultura*. Diciembre. pp: 916-926.
- Garmendia, I., Aguirreola, J. and Goicoechea, N., 2006. Defence-related enzymes in pepper roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Verticillium dahlia*. *BioControl*, 51: 293:ont.
- Giovannetti, M. and Mosse, B., 1980. An evaluation of technique for measurement vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84, 3: 489-500.
- Hamel, C and Plenchette, C. 2007. *Mycorrhizae in Crop Production* (eds.). Chantal Hamel and Christian Plenchette. Haworth Press, Binghamton, NY Hard Cover ISBN: 978-1-56022-306-1 (CL).
- Herrera, R.A., Hamel, C., Fernandez, F., Ferrer, R.L. and Furazola, E. 2011. Soil-strain compatibility: the key to effective use of arbuscular mycorrhizal inoculants? *Mycorrhiza* 21: 183-193.
- Ikiz, Ö., Abak, K., Dasgan, H.Y. and Ortas, I., 2009. Effects of mycorrhizal inoculation in soilless culture on pepper plant growth. *Acta Hort*. 807: 533-539.
- Jaizme-Vega, M.C., García de la Rosa, P., Rodríguez-Romero, A.S. y Tenoury, P. 2001. Empleo combinado de plantas aromáticas y micorrizas, sobre *Meloidogyne incognita* en tomate. *Actas de Horticultura* 30: 1267-1274.
- Nicolás, E., Maestre-Valero, J.F., Alarcón, J.J., Pedrero, F., Vicente-Sánchez, J., Bernabé, J., Gómez-Montiel, J., Hernández, J.A. and Fernández, F. 2014. Effectiveness and persistence of arbuscular mycorrhizal fungi on the physiology, nutrient uptake and yield

- of Crimson seedless grapevine. *Journal of Agricultural Science* (doi: 10.1017/S002185961400080X).
- Phillips, D.M. and 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.
- Rivera, R.A. and Fernández, F. 2005. Chapter 33: Inoculation and management of mycorrhizal fungi within tropical agroecosystems. pp: 479-488. In: *Biological approaches to sustainable soil systems*. Norman Uphoff. Cornell University, New York.
- Smith, S.E. and Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*, 2<sup>nd</sup> Edn. Academic Press, London.
- Sonneveld, C. (2002). Composition of Nutrient Solutions. En: "Hydroponic Production of Vegetables and Ornamentals". (D. Savvas y H. Passam, ed.): 179-210. Embryo Publications. Athens.
- Vicente-Sánchez, J. 2011. Efecto del riego con aguas regeneradas sobre el crecimiento y estado nutricional de plantas de lechuga "iceberg" micorrizadas con el hongo *Glomus* sp1. Tesis de Master. Facultad de Biología. Murcia.
- Terry, E., Núñez, M., Pino, M.A. y Medina, N. 2002. Efectividad de la combinación biofertilizantes-análogo de brasinoesteroides en la nutrición del tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill). *Cultivos Tropicales* 22 (2): 56-59.
- Wu, Q.S., Zou, Y.N., Xia, R.X. and Wang, M.Y. (2007). Five *Glomus* species affect water relations of Citrus tangerine during drought stress. *Bot Stud* 48:147-154.

Tabla 1. Contenido iónico foliar (% de peso seco para macronutrientes y  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  peso seco para Zn) en plantas control y tratadas con *Glomus iranicum var tenuihypharum* (G.i var T.) en los tres muestreos realizados a lo largo del periodo de ensayo (DDP: Días después del trasplante).

	Tratamiento	% p.s.				mg·kg <sup>-1</sup> p.s.
		P	Ca	Mg	K	Zn
Abril (49 DDP)	Control	0.48	3.7	1.3	5.7	115.6
	G.i var T.	0.54	4.0	1.3	5.9	109.4
Junio (104 DDP)	Control	0.28	6.2	2.0	5.6	117.6
	G.i var T	0.31	6.2	1.9	5.2	119.8
Julio (152 DDP)	Control	0.25	5.1	1.3	5.3	92.6
	G.i var T	0.23	5.7	1.5	5.7	113.1*

Los valores medios obtenidos en cada columna y fecha de muestreo para cada uno de los tratamientos, fueron comparados mediante el Test de la T de Student ( $P<0.05$ ); ns  $P>0.05$ .

Tabla 2. Parámetros de calidad de fruto (CSS: Contenido en sólidos solubles; firmeza y unidades de color) medidos en tres momentos del periodo de cosecha en plantas control y tratadas con *Glomus iranicum var tenuihypharum* (G.i var T.). Los datos son medias de 40 frutos por tratamiento y muestreo.

	Tratamiento	CSS			Color		
		(°Brix)			Firmeza (Nm <sup>-2</sup> )	L	Hue
Día 77	Control	4.77	88.51	41.18	125.88	12.59	
	G.i var T	4.39 ***	92.53 **	40.34 ns	126.74 ns	11.97 *	
Día 112	Control	5.26	89.42	41.60	113.62	13.27	
	G.i var T	5.45 *	94.09 *	41.00 *	116.99 *	12.40 ns	
Día 152	Control	5.58	90.18	42.65	116.80	14.95	
	G.i var T	5.99 ***	96.10 **	41.77 *	118.42 **	13.67 *	

Los valores medios obtenidos en cada columna y fecha de muestreo para cada uno de los tratamientos, fueron comparados mediante el Test de la T de Student ( $P<0.05$ ); ns  $P>0.05$ .

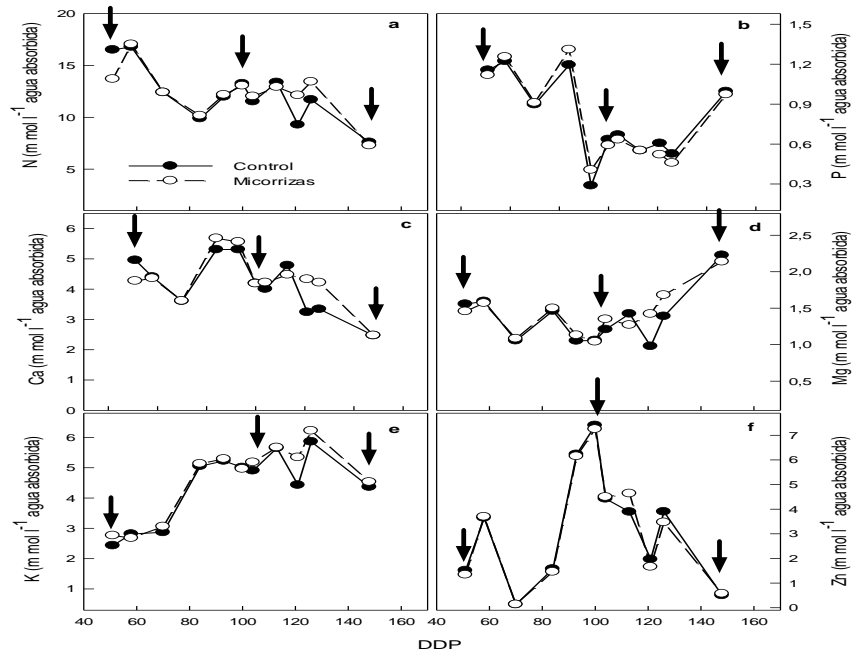


Figura.1. Evolución de las concentraciones de absorción de los principales nutrientes durante el ciclo de cultivo. Las flechas sobre los gráficos identifican los días en los que se hicieron los tres muestreos realizados (49, 104 y 152 DDP).

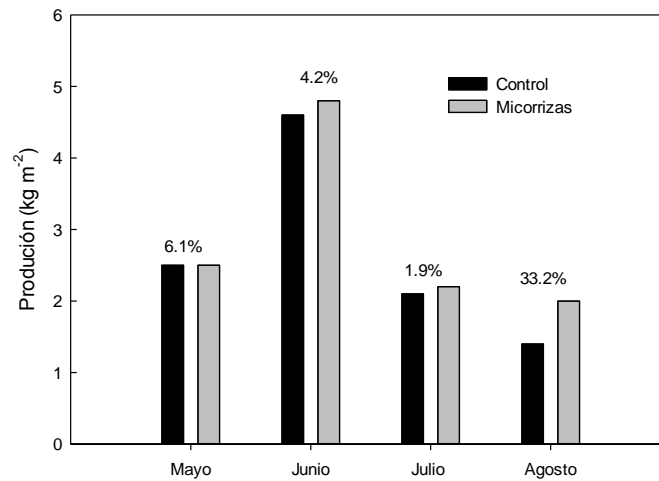


Figura. 2. Producción mensual ( $\text{kg m}^{-2}$ ) de plantas de los tratamientos control y micorrizado. El número encima de las barras indica el incremento productivo del tratamiento micorrizado con *Glomus iranicum var tenuihypharum* con respecto al control sin inocular.