

MULTIPLICACIÓN DE HONGOS MICORRIZA ARBUSCULAR (H.M.A) Y EFECTO DE LA MICORRIZACIÓN EN PLANTAS MICROPROPAGADAS DE BANANO (*Musa* AAA cv. Gran Enano) (Musaceae)

MULTIPLICATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAE FUNGI (AMF) AND MYCORRHIZATION EFFECT IN MICROPROPAGATED PLANTS OF BANANA (*Musa* AAA cv. 'Gran Enano') (Musaceae)

Carmen Elena Usuga Osorio¹; Darío Antonio Castañeda Sánchez² y Ana Esperanza Franco Molano³

Resumen: Se evaluó el proceso de multiplicación de hongos que forman micorriza arbuscular (HMA), para lo cual se usaron diferentes tipos de inóculos entre ellos nativos de agroecosistemas bananeros del Urabá (Antioquia-Colombia), en sustrato sólido, con diferentes plantas hospedadoras y la infectividad y efectividad sobre plantas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano). La colonización micorrizal promedio general de los HMA a las plantas trampa fue de $37,76 \pm 21,86$ %, con respecto a este porcentaje, las plantas B (*Brachiaria decumbens*) y S (*Sorgum vulgare*) fueron las que más favorecieron la simbiosis. Teniendo en cuenta el sustrato, el S2 (Arena 50 - suelo 50) y el S6 (Vermiculita 50-suelo 50) permitieron expresiones significativamente mayores respecto a los demás. El *Sorgum vulgare* y *Pueraria phaseoloides* y en el sustrato S1 (Arena 30 - suelo 70), se encontró un mayor número de esporas. La combinación planta-sustrato que más favoreció la asociación fue la planta trampa B en los sustratos S2 y S4 (cascarilla de arroz 50-suelo50) y la producción de esporas fueron las plantas K y S en el sustrato S1. La asociación micorrizal general en plantas de banano provenientes de cultivo de tejidos fue de $48,74 \pm 30,44$. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre plantas de cero días con plantas de 30 de aclimatadas. Los inóculos que significativamente favorecieron la asociación fueron los provenientes de agroecosistemas bananeros al compararse con el inóculo comercial y el proveniente de ecosistemas naturales del Urabá. El mayor peso seco foliar y radical se encontró en plántulas de banano inoculadas con I5 (Inóculo proveniente de agroecosistema bananeros de la zona de estudio). Para las variables de crecimiento no se encontraron diferencias.

Palabras claves: *Musa* AAA cv. Gran Enano, sustrato, crecimiento, aclimatación, planta trampa, simbiosis.

Abstract. The process of multiplication of arbuscular mycorrhizae fungi (AMF) from indigenous banana agro-environments from Urabá (Antioquia - Colombia) was evaluated, using solid substrate, with different 'host' plants and substrates, and the effectiveness of the samples obtained from banana plants (*Musa* AAA cv. 'Gran Enano'). The average association of the HMA to the plants was $37,76 \pm 21,86$ %, regarding this percentage, the plants 'B' (*Brachiaria decumbens*) and 'S' (*Sorgum vulgare*) favored greatly the association. Considering the substrate, the 'S2' (sand 50-soil 50) and the 'S6' (Vermiculite 50-soil 50) had associations significantly superior to treatments. In plants 'S' and 'K' (*Pueraria phaseoloides*) and in substrate S1 (sand 30-soil 70), was found a higher number of spores. The combination plant-substrate that most favored the association was the plant B (used as a trap culture) using substrates 'S2' and 'S4' ('cascarilla de arroz' 50-soil 50) and the production of spores were plants 'K' and 'S' in substrate 'S1'. The general HMA association in banana plants coming from tissue crop was $48,74 \pm 30,44$; there were not found significant differences between plants with zero days and plants with 30 days already acclimated. The samples with inoculum diseases spread upon them which favored the association, were the ones coming from the banana agro-environment compared to the commercial samples and those from natural environments in Urabá. The greatest foliar dry and root weight was found on banana samplings applied with 'I5' (sample from agro-environment). For the growth variables there was not found any difference.

Key words: *Musa* AAA cv. Gran Enano, substrate, growth, acclimate, host plants, symbiosis.

¹ Investigadora. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Facultad de Ciencias Agrarias. A.A. 4932, Medellín, Colombia. <ceusugao@gmail.com>

² Profesor Ocasional. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Facultad de Ciencias Agrarias. A.A. 4932, Medellín, Colombia. <dacastanedas@gmail.com>

³ Profesora Asociada. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. A.A. 1226, Medellín, Colombia. <afranco@quimbaya.udea.edu.co>

Los hongos que forman micorriza arbuscular (HMA) establecen asociación simbiótica mutualista con la mayoría de las plantas vasculares. El desarrollo de sus estructuras a nivel radical conlleva a la funcionalidad de la asociación, con una serie de beneficios para las plantas en términos de eficiencia en la toma de nutrientes del suelo y la resistencia a factores adversos bióticos y abióticos; lo anterior ha motivado la utilización de este recurso con fines agronómicos, por lo cual se requiere optimizar sus procesos de multiplicación y aplicación.

En el proceso de multiplicación el carácter de simbiote obligado por parte del hongo implica el uso de plantas hospedadoras con las cuales pueda completar su ciclo de vida y finalmente producir esporas y/o otros propágulos. La planta hospedadora debe sembrarse en un sustrato adecuado, buscando obtener alta versatilidad, buena capacidad de intercambio catiónico, aireación y retención de humedad (Habte y Osorio, 2001). El sustrato además, debe permitir producción abundante de propágulos, fácil manipulación, que sea recurso de la zona a trabajar y que no sea costoso.

Las plantas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano) comúnmente son propagadas mediante técnicas *in vitro*. A pesar de los múltiples beneficios de este procedimiento, es reconocida la etapa crítica cuando se transfieren a condiciones *ex vitro*, especialmente con índices de alta mortalidad y limitaciones para resistir el estrés del trasplante, incluyendo pobre desarrollo de la cutícula, estomas no funcionales, hábitos heterotróficos y pobre desarrollo de raíces (Azcón y Barea, 1997). La total esterilidad de los medios utilizados no les permite a las plantas adquirir el estado micorrízico y sus beneficios (Barea y Azcón, 2002). Adicionalmente la planta de banano exhibe un cierto grado de dependencia con los HMA (Declerck, Planchette y Strullu, 1995). Las nuevas propuestas biotecnológicas sugieren aprovechar el recurso de la micropropagación, acompañada de la inoculación con HMA. (Lovato *et al.*, 1996, Varma y Schuepp, 1998; citados por Azcón y Barea, 1997).

En este trabajo se desarrollaron dos objetivos: el primero, la evaluación de diferentes plantas hospedadoras y sustratos en la multiplicación de HMA nativos de Urabá- Antioquia, Colombia; el segundo, la evaluación de la infectividad y

efectividad de los inóculos obtenidos sobre plantas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano) obtenidas por multiplicación *in vitro*, con 0 y 30 días de tiempo de aclimatación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El inóculo micorrízico nativo se obtuvo del muestreo efectuado en el área bananera conformada por los municipios de Chigorodó, Carepa, Apartadó y Turbo de la región de Urabá, Colombia. Esta región se encuentra ubicada en el sector noroccidental del departamento de Antioquia, Colombia a 200 km de la ciudad de Medellín, a una altitud promedio sobre el nivel de mar de 40 m. La zona bananera comprende las cuencas hidrográficas de los ríos Chigorodó, Carepa, Vijagual, Zungo, Apartadó, Riogrande y Currulao. Las aguas se dirigen de occidente a oriente para encontrarse con el río León que las conduce hacia el Golfo de Urabá.

Zonas de vida. Las zonas de vida predominantes son: el bosque húmedo tropical (bh-T) que representa el 40 % de la zona bananera hacia la parte norte; el bosque muy húmedo premontano (bmh-PM), donde se asienta el 20% de la zona bananera hacia la parte centro y, el bosque muy húmedo tropical (bmh-T) en el cual se ubica el 40% de la zona bananera, en su parte sur.

Aspectos climáticos. En cuanto a precipitación, las isoyetas anuales muestran un aumento longitudinal desde los 2.000 mm, en las cercanías de Turbo, hasta los 4.000 mm, hacia la población de Mutatá. La zona bananera propiamente dicha, presenta en promedio anual de 2.400 mm. Esta precipitación sobrepasa los requerimientos hídricos del cultivo; sin embargo, su distribución unimodal, no uniforme a lo largo del año, hace que se presente un período de verano de 500 mm entre enero y marzo. La fluctuación diaria de la temperatura a lo largo del año oscila entre los 46,6 y 19,8°C. La temperatura media multimensual no tiene variaciones significativas con un valor de 26,6°C.

El montaje de experimentos para la multiplicación del inóculo y la evaluación de los parámetros de asociación con las plantas de banano, se efectuó en la estación experimental de la Universidad de Antioquia, situada en el municipio de Medellín (Antioquia-Colombia), con las siguientes características climáticas: temperatura media de 22°C, precipitación

promedio mensual variando a lo largo del año entre los 500 y los 2000 mm y humedad relativa media de 68%.

Muestra. El área bananera de Urabá (Antioquia, Colombia) para la época de muestreo (Agosto de 2004) contaba con un total de 345 fincas, de las cuales se seleccionaron aleatoriamente 20. En cada una de estas se escogió un lote igualmente de manera aleatoria de lotes existentes en cada finca. El muestreo fue compuesto, es decir, en cada lote se seleccionaron haciendo un recorrido en zig-zag 16 plantas, en cada una de éstas y a una distancia de 30 cm del seudotallo y de los primeros 30 cm de profundidad, se tomó una submuestra de 1 kg de la mezcla de suelo más raíces de banano encontradas. Las submuestras se homogenizaron en un recipiente mayor y se separaron 5 kg de la mezcla de suelo más raíces. Se identificó adecuadamente con el número del lote y el nombre de la finca. Estas muestras se usaron como fuente de inóculo nativo en el proceso de multiplicación de HMA para evaluar los tipos de sustratos - plantas hospederas y sustrato con las plantas de banano (*Musa* AAA, cv. Gran Enano).

Multiplicación de los HMA, Tipos y Combinaciones de Sustratos y Plantas Hospederas

Preparación del sustrato. En la preparación del sustrato sólido utilizado para la multiplicación de los hongos, se usó suelo proveniente de la misma zona bananera de Urabá donde los HMA nativos fueron colectados. Éste inóculo se combinó con tres tipos de materiales inertes, arena, cascarilla de arroz y vermiculita, en proporciones volumen a volumen de 70/30 y 50/50 de suelo con cada uno de los materiales inertes, resultando así, un total de seis mezclas de sustratos (Tabla 1). Las características químicas del suelo fueron: pH 5,2; materia orgánica 4,7%; fósforo 27 mg·kg⁻¹; azufre 6 mg·kg⁻¹; hierro 317 mg·kg⁻¹; manganeso 29 mg·kg⁻¹; cobre 6 mg·kg⁻¹; zinc 3 mg·kg⁻¹; aluminio 0,4 cmol·kg⁻¹; calcio 12 cmol·kg⁻¹; magnesio 5,2 cmol·kg⁻¹; potasio 1,86 cmol·kg⁻¹ y presentó una capacidad de intercambio catiónico de 19,6 cmol·kg⁻¹. La textura del suelo fue franco arenoso.

Tabla 1. Tratamientos obtenidos por la combinación de cuatro niveles del factor planta hospedadora, tres tipos de materiales inertes con dos niveles cada uno, para el estudio de la multiplicación de hongos micorriza arbuscular (HMA) y el efecto en la micorrización en plantas micropropagadas de banano.

Sustrato					Planta hospedera			
					<i>Brachiaria decumbens</i> (B)	<i>Pueraria phaseoloides</i> (K)	<i>Sorgum vulgare</i> (S)	<i>Tajetes erecta</i> (T)
Proporción	%	(v/v)	Proporción	Código	Tratamientos			
Suelo	50	50	Cascarilla arroz	S4	T1	T2	T3	T4
		50	Arena	S2	T5	T6	T7	T8
		50	Vermiculita	S6	T9	T10	T11	T12
	70	30	Cascarilla arroz	S3	T13	T14	T15	T16
		30	Arena	S1	T17	T18	T19	T20
		30	Vermiculita	S5	T21	T22	T23	T24

Los sustratos se esterilizaron tres veces durante una hora a 120°C, a 15 libras de presión cada 24 horas; al final de este proceso se pasó a través de un tamiz con un tamaño de poro de 2 mm.

Inoculación de los HMA. En materos plásticos de 22 cm de diámetro y 18 cm de profundidad se vertieron 3 kg de sustrato por 3 materos de cada una de las mezclas de los sustratos preparados. Se utilizó como inóculo una muestra compuesta de todos los lotes colectados en la zona bananera de

Urabá. El inóculo estaba compuesto de suelo más raíces de banano y se le determinó un nivel basal de 2 esporas por gramo de suelo, siguiendo el método de decantado, tamizado, y centrifugación propuesto por Sieverding (1983). A cada unidad con su respectivo sustrato, se le adicionó en la parte superior 200 g del inóculo nativo (suelo más raíces de banano).

Material vegetal. Como plantas trampa se usaron: *Brachiaria decumbens* (B), *Pueraria phaseoloides* (K),

Sorgum vulgare (S), y *Tagetes erecta* (T) (Tabla1). Estas, se sembraron a partir de semilla comercial pregerminada sobre papel humedecido en recipientes plásticos, y cubriéndolas con una capa superficial de la mezcla del respectivo sustrato preparado e inoculado con los HMA nativos. Se anota, que los porcentajes de germinación presentados fueron de 70, 66, 16 y 14%, respectivamente y se estimó colocando 100 semillas sobre papel húmedo en cajas de Petri.

Mantenimiento. Durante los cinco meses siguientes a la siembra (noviembre de 2004 a abril de 2005), las plantas se sometieron a riego, manteniendo el suelo a capacidad de campo y sin ningún tipo de fertilización. Después de los cinco meses (mayo de 2005) y durante 15 días se suspendió el riego para provocar estrés hídrico en las plantas hospedadoras e inducir la esporulación de los HMA (Sieverding, 1991).

Evaluación de la Asociación de los Hma con Plantas Micropropagadas de Banano (Musa AAA cv. Gran Enano)

Sustrato. Se preparó una mezcla con el suelo descrito y arena, en una proporción 70:30 volumen a volumen, respectivamente. Los sustratos se esterilizaron tres

veces durante una hora a 120°C, a 15 libras de presión cada 24 horas; al final de este proceso se pasó a través de un tamiz con un tamaño de poro de 2 mm. El sustrato se esterilizó, bajo las mismas condiciones enunciadas de temperatura, tiempos y ciclos de exposición, al final del proceso el sustrato se pasó a través de un tamiz de tamaño de poro de 2 mm.

Inóculo. Se evaluaron cinco tipos de inóculos, de los cuales tres de ellos fueron preparados a partir de un inóculo nativo del agroecosistema bananero de Urabá, Colombia; multiplicados en tres sustratos diferentes (suelo/arena, suelo/cascarilla de arroz y suelo/vermiculita), otro se obtuvo de un ecosistema natural (sin intervención antrópica) colectado en el municipio Chigorodó de la región de Urabá- Colombia, multiplicado en el sustrato suelo-arena 70/30 volumen a volumen, con la planta hospedadora *Brachiaria decumbens* y un inóculo comercial utilizado en la zona. Cada inóculo fue caracterizado con los géneros de HMA presentes teniendo en cuenta caracteres morfológicos y el número de esporas por gramo de suelo húmedo siguiendo el método de decantado, tamizado, y centrifugación propuesto por Sieverding (1983) (Tabla 2).

Tabla 2. Tipos de inóculos utilizados en la evaluación de la asociación con plantas de banano; caracterizados por su procedencia, géneros, sustrato de multiplicación y número de esporas.

Procedencia	Especies	Sustrato de multiplicación	Esporas g ⁻¹ de suelo	Inóculo
Inóculo nativo de agroecosistema bananero	<i>Glomus</i> (<i>G. aggregatum</i> , <i>G. geosporum</i> , <i>G. clarum</i>),	Suelo:arena (70:30% v/v)	28	5
	<i>Acaulospora</i> (<i>A. morrowiae</i> , <i>A. mellea</i> , <i>A. gerdermannii</i>),	Suelo: cascarilla arroz (70:30% v/v)	6	4
	(<i>S. calospora</i>) y <i>Entrophospora</i>	Suelo vermiculita (70:30% v/v)	36	3
Inóculo de ecosistema natural (Urabá)	<i>Acaulospora</i> spp., <i>Glomus</i> spp., <i>Entrophospora</i> spp.	Suelo:arena (70:30% v/v)	11	1
Inóculo comercial	<i>Glomus</i> sp., <i>Acaulospora</i> sp., <i>Scutellospora</i> sp. y <i>Entrophospora</i>		30	2

Inoculación. En vasos blancos de polietileno de 8 cm de diámetro y 10 cm de profundidad, se vertieron 500 g del sustrato preparado. En la superficie de éste, se dispersó el inóculo (suelos más raíces) que contenía 500 esporas por vaso; por tratamiento se tuvieron 3 repeticiones. Como testigo se dejaron tres vasos con el sustrato sin la adición de ningún tipo de inóculo.

Material vegetal. Se utilizaron plantas micropropagadas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano) procedentes del laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Católica de Oriente (Antioquia, Colombia). Se evaluó la respuesta de plántulas micropropagadas sin aclimatar, es decir extraídas del medio de cultivo y sembradas directamente en cada uno de las mezclas de sustratos

inoculados con los diferentes tipos de inóculos y de plantas con 30 días de iniciado el proceso de aclimatación, las cuales se encontraban en un sustrato compuesto por arena al 100% y se transplantaron a cada una de las mezclas inoculadas anteriormente mencionadas.

Mantenimiento. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero durante un período de 60 días, tiempo durante el cual únicamente se adicionó agua y no se aplicó ningún tipo de fertilizante (Arias, Blanco y Vargas, 1999).

Medición de variables respuesta. Tanto en el caso de las plantas trampas como de las plántulas de banano, se midió colonización de las raíces por los HMA en una muestra de 2 g de raíces extraídas. La colonización se evaluó por la observación de raíces, al microscopio de luz, previamente decoloradas con KOH 10% y teñidas con azul de tripano como lo describen Phillips y Haymann (1970), modificada para banano (Usuga y Franco, 2002); La colonización se calculó por el método en laminas de Sieverding (1983). Adicionalmente se evaluó el número de esporas por gramo de inóculo por el método de decantado, tamizado, y centrifugación propuesto por Sieverding (1983), a partir de una muestra de 100 g. También se cuantificó el número de nemátodos por gramo de suelo por el método de flotación y centrifugación en azúcar (Montecinos y Franco, 1993) con el fin de evaluar su calidad sanitaria. Al final del experimento a las plántulas de banano se les determinó el peso seco tanto de la parte aérea como radical; también se determinó con una frecuencia semanal, la altura, el diámetro del pseudotallo de las plántulas y la tasa de emisión foliar.

Diseño Experimental

Multiplicación de HMA. Para la evaluación de la multiplicación de los HMA se montó un arreglo factorial 2 X 6 X 4, en donde los factores fueron tipo de sustrato, tipo de planta hospedadora y de sustrato el factor tipo de sustrato contó con 6 niveles, obtenidos por la combinación de suelo proveniente de la zona bananera de la región de Urabá y materiales inertes arena, cascarilla de arroz y vermiculita en proporciones 70: 30 y 50: 30 (S1 suelo: arena 70:30, S2 suelo: arena 50:50, S3 suelo: cascarilla de arroz 70:30, S4 suelo: cascarilla de

arroz 50:50, S5 suelo: vermiculita 70:30 y S6 suelo: vermiculita 50:50). El factor planta hospedadora involucró 4 niveles o tipos de plantas trampa: *Brachiaria decumbens* (B), *Pueraria phaseoloides* (K), *Sorgum vulgare* (S) y *Tagetes erecta* (T). La combinación de cada uno de los niveles de los diferentes factores, generaron 24 tratamientos evaluados en tres repeticiones y distribuidos aleatoriamente dentro del invernadero.

Evaluación de la asociación de los HMA con plantas micropropagadas de banano. La asociación de los HMA con plantas micropropagadas de banano se evaluó mediante un arreglo de factores 5 x 2. En donde los dos factores fueron tipo de inóculo y tiempo de inoculación. En el tipo de inóculo se probaron 5 niveles. El inóculo 11 correspondió al proveniente de ecosistema natural multiplicado en suelo: arena en proporción 70: 30, el 12 correspondió a inóculo comercial y los inóculos 13 a 15 a los provenientes de agroecosistemas bananeros multiplicados en los sustratos suelo: vermiculita, suelo: cascarilla de arroz suelo:arena, todos en la proporción 70 : 30. El tiempo de inoculación contó con dos niveles: a los cero días y 30 días de iniciado el proceso de aclimatación. En análisis estadístico completo de los datos, se utilizó el software R, versión 2.4 año 2007.

RESULTADOS

Respuesta de los HMA a los Tipos y Combinaciones de Sustratos y Plantas Trampa

Porcentaje de colonización. La asociación general expresada en porcentaje de los HMA sobre las plantas hospedadoras fue de $37,76 \pm 21,86\%$. Se discriminó de acuerdo a la planta e independientemente del sustrato usado, las plantas B (*Brachiaria decumbens*) y S (*Sorgum vulgare*) presentaron los más altos porcentajes de colonización con $46,61 \pm 19,41$ y $44,84 \pm 18,67 \%$ respectivamente. De acuerdo al sustrato e independientemente de la planta trampa los que mejor favorecieron la asociación a las plantas fueron el S2 (suelo 50: arena 50) y el S6 (suelo 50: vermiculita 50) con porcentajes de $49,97 \pm 16,37$ y $43,52 \pm 23,64\%$ respectivamente. El sustrato S3 (suelo 70: cascarilla de arroz 30) fue el que menos favoreció la asociación con $25,162 \pm 17,41 \%$ (Tabla 3).

De acuerdo con el análisis de varianza realizado, se encontraron diferencias significativas tanto por los factores planta hospedadora y sustrato como por la interacción de los dos. Usando la prueba de Tukey para las medias de los porcentajes de asociación, se establecieron para el factor planta hospedadora tres grupos, cuyos promedios presentan diferencias significativas entre sí pero homogéneas dentro del

grupo. Así, un grupo se conformó por las plantas B y S; las plantas K y T formaron cada una un grupo independiente y diferente de las demás. En el caso del sustrato se establecieron cuatro grupos; uno se constituyó por los sustratos S1, S4 y S5; los sustratos S2 y S6 formaron otro grupo y el sustrato S3 se ubicó independientemente de los demás (Tabla 4).

Tabla 3. Estadísticos descriptivos para las variables respuesta, porcentaje de colonización de hongos micorriza arbuscular (HMA) y número de esporas de acuerdo a la planta hospedadora y el sustrato. Donde, B: *Brachiaria decumbes*, K: *Pueraria phaseoloides*, S: *Sorgum vulgare* y T: *Tajetes erecta*; S1 a S6 los sustratos obtenidos por la mezcla de suelo y materiales inertes en diferentes proporciones.

Variable respuesta	Factor	Niveles	N	Mínimo	Promedio	Mediana	Máximo	Rango	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
Asociación (%)	Planta hospedera	B	18	15,2	49,0	46,6	93,4	78,3	19,4	0,4
		K	18	5,1	36,6	33,6	69,6	64,5	20,1	0,6
		S	18	6,7	44,8	45,8	86,4	79,6	18,7	0,4
		T	18	1,6	20,6	12,4	64,0	62,4	19,0	0,9
	Sustrato	S1	12	21,5	36,6	38,5	50,0	28,5	8,8	0,3
		S2	12	22,5	50,0	51,1	70,0	47,5	16,4	0,3
		S3	12	1,6	25,2	26,7	50,4	48,8	17,4	0,7
		S4	12	4,1	36,2	26,8	93,4	89,4	34,5	1,0
		S5	12	7,7	35,1	42,2	63,4	55,7	17,3	0,5
		S6	12	10,9	43,5	49,7	73,7	62,8	23,6	0,5
Esporas/100 g ss	Planta hospedera	B	18	519,0	965,8	908,5	1747,0	1228,0	296,8	0,3
		K	18	547,0	1470,6	1440,5	2862,0	2315,0	725,1	0,5
		S	18	358,0	1617,9	1634,0	3307,0	2949,0	818,1	0,5
		T	18	174,0	678,7	540,5	2341,0	2167,0	517,5	0,8
	Sustrato	S1	12	454,0	1790,8	1842,5	3307,0	2853,0	1081,4	0,6
		S2	12	336,0	1114,9	1159,0	1876,0	1540,0	527,8	0,5
		S3	12	322,0	723,3	692,0	1026,0	704,0	242,6	0,3
		S4	12	174,0	586,8	582,0	1011,0	837,0	265,5	0,5
		S5	12	626,0	1495,3	1435,0	2341,0	1715,0	552,8	0,4
		S6	12	665,0	1388,3	1399,5	2386,0	1721,0	522,9	0,4

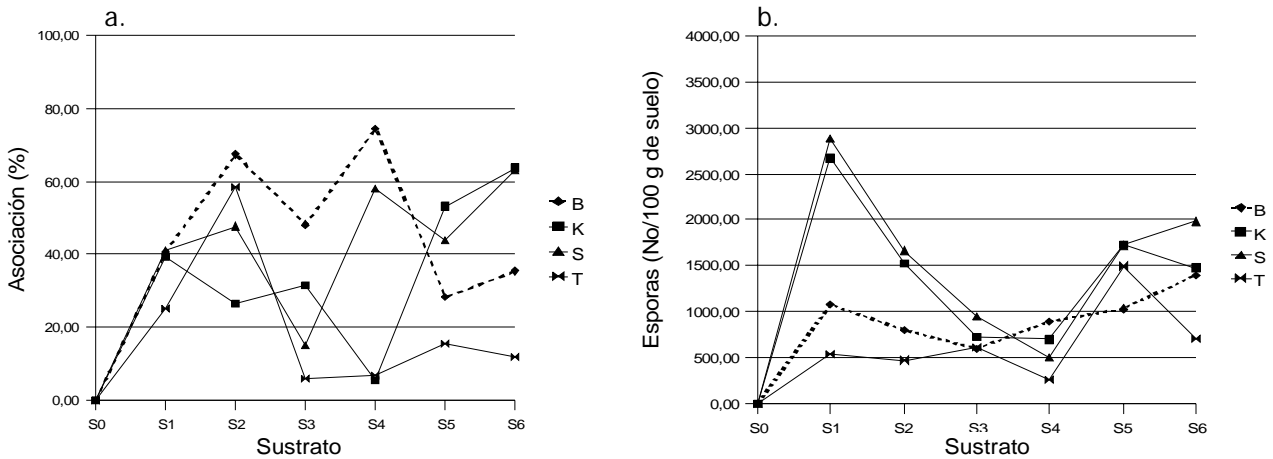
Tabla 4. Comparaciones múltiples de Tukey para las medias de los porcentajes de asociación de hongos micorriza arbuscular (HMA) y número de esporas de los diferentes niveles de los factores planta hospedadora y sustrato.

Factor	Nivel	Asociación (%)	Prueba Tukey (P<0,05)	Esporas 100 g ss	Prueba Tukey (P<0,05)
Planta hospedera	B	49,0	a	966	b
	K	36,6	b	1471	a
	S	44,8	a	1618	a
	T	20,6	c	679	c
Sustrato	S1	36,6	a	1791	a
	S2	50,0	b	1115	b
	S3	25,2	c	723	c
	S4	36,2	a	587	c
	S5	35,1	a	1495	ad
	S6	43,5	ab	1388	bd

Donde, B: *Brachiaria decumbes*, K: *Pueraria phaseoloides*, S: *Sorgum vulgare*, y T: *Tajetes erecta*; S1 a S6 los sustratos obtenidos por la mezcla de suelo y materiales inertes en diferentes proporciones.

La planta B en combinación con los sustratos S2 y S4 tuvieron un efecto positivo en la asociación promedio con porcentajes de 67% y 75%, respectivamente. La planta S en el sustrato S6 presentó una asociación positiva y similar a la planta K en el mismo sustrato con porcentajes del 63% igualmente, las plantas T en el sustrato S2 y la S en el sustrato S4 presentaron

asociaciones similares con un porcentaje del 58 %. Las demás combinaciones de plantas trampa sustrato no tuvieron un efecto significativo en los porcentajes de asociación respecto a la media general, oscilando al rededor de esta en unos casos o con porcentajes inferiores en otros (Figura 1a).



Donde, B: *Brachiaria decumbens*, K: *Pueraria phaseoloides*, S: *Sorgum vulgare*, y T: *Tagetes erecta*; S1 a S6 los sustratos obtenidos por la mezcla de suelo y materiales inertes en diferentes proporciones.

Figura 1. Efecto de la interacción entre el tipo de planta hospedadora y sustrato en él. a) Asociación micorrícica; b) Número de esporas.

Número de esporas. El número de esporas promedio general producido fue de $1.183,25 \pm 718,00$. Las plantas hospedadora que más producción de esporas indujeron sin tener en cuenta el sustrato fueron S y K, en el mismo orden con $1.617,89 \pm 818,07$ y $1.470,61 \pm 75$ esporas por 100 g de suelo; la planta T fue la que menos favoreció la producción con $678,67 \pm 517$ esporas por 100 g de suelo. De acuerdo al sustrato e independientemente de la planta trampa, el S1 fue en el que más esporas se produjo con $1.790,75 \pm 1081,39$ esporas por 100 g de suelo; en los sustratos S3 y S4 se encontró el menor número de esporas por 100 g de suelo con $723,33 \pm 242,64$ y $586,83 \pm 265,48$ respectivamente (Tabla 3).

el caso del factor planta trampa, las plantas K y S se ubicaron en un grupo, la B y la T conformaron cada una un grupo independiente y diferente de las demás (Tabla 4). De acuerdo al tipo de sustrato, no presentaron diferencias significativas S1 con S5; ni, S2 con S6; tampoco S5 con S6; ni S3 con S4; las demás combinaciones posibles presentaron promedios de esporas diferentes (Tabla 4).

El análisis de varianza permitió establecer diferencias significativas debidas a los factores planta hospedadora y sustrato, así como a diferencias por la interacción de los dos factores. La prueba de comparaciones múltiples de Tukey usada para establecer las diferencias entre las medias de los niveles de cada factor permitió establecer grupos; en

El efecto en el número de esporas obtenido por la combinación de la planta hospedadora y el sustrato fue positivo para las plantas K y S, ambas en el sustrato S1; cuyos promedios fueron de 2.668 y 2.888 esporas por 100 g de suelo. También se observó para estas dos plantas un efecto positivo aunque menor cuando se colocaron en los sustratos S2, S5 y S6, que oscila entre las 1.477 y 1.980 esporas por 100 g de suelo. El efecto de la combinación de la planta T con cada uno de los sustratos en general tuvo un comportamiento negativo, las demás combinaciones de plantas y sustratos oscilaron al rededor del promedio general, (Figura 1b).

Colonización Micorrícica en Plantas de Banano (*Musa AAA cv Gran Enano*), Procedentes de Cultivo de Tejidos.

Colonización micorrícica. La asociación micorrícica general fue de $48,74 \pm 30,44$ y no se presentaron diferencias significativas entre plantas con cero y treinta días de aclimatación (Figura 2). Con respecto al inóculo, se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de asociación promedio. Se usó la prueba de Tukey, estableciéndose los siguientes grupos, uno conformado por los inóculos, 13, 14 e 15 (provenientes de agroecosistemas), entre los cuales no se encontró diferencias significativas, y los

inóculos 12 (inóculo comercial) e 11 (proveniente de ecosistema natural) conformaron cada inóculo un grupo independiente (Tabla 5).

Peso seco foliar y radical. El peso seco foliar de las plántulas de banano, respondieron significativamente al tipo de inóculo usado, sin embargo, de acuerdo con la prueba de Tukey se formaron dos grupos, uno conformado por los inóculos 11, 12, 13 e 15, y otro formado por el inóculo 14, en el cual se encontró el mayor peso foliar (Figura 3 a)). En el caso del peso seco de raíz, de nuevo en el inóculo 14 favoreció el peso seco de la raíz (Figura 3 b)); no obstante, no fue diferente de 15, 13 e 12, (Tabla 5).

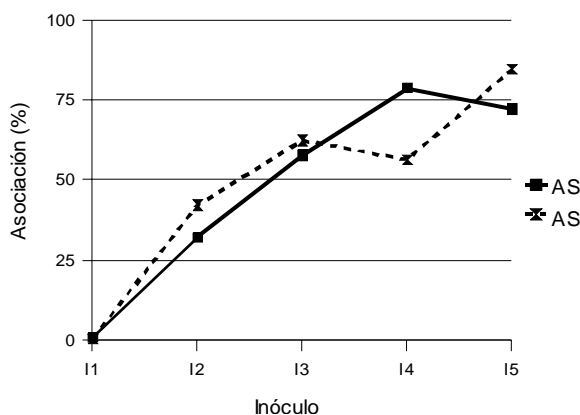


Figura 2. Comportamiento de la colonización micorrícica (%) en plantas de banano (*Musa AAA cv. Gran Enano*), con cero y 30 días de aclimatación bajo cinco tipo de inóculo.

Tabla 5. Comparaciones múltiples de Tukey para las medias de los porcentajes de colonización de hongos micorriza arbuscular (HMA) en plantas de banano bajo los diferentes tipos de inóculo.

Inóculo	AS %	Prueba Tukey (P≤0,05)	PSF g	Prueba Tukey (P≤0,05)	PSR g	Prueba Tukey (P≤0,05)
11	0,697	c	0,783	b	1,750	b
12	37,250	b	1,050	b	2,033	ab
13	60,068	a	1,083	b	2,083	ab
14	67,453	a	1,417	a	3,283	a
15	78,230	a	1,100	b	2,650	ab

Donde: AS: asociación de HMA en porcentaje, PSF: peso seco foliar, PSR: peso seco raíz.

Altura de la planta, diámetro y emisión foliar. El análisis de las curvas promedio de crecimiento para las variables altura, diámetro y emisión foliar, no presentaron diferencias significativas, datos no mostrados.

DISCUSIÓN

En la evaluación de sustratos para la multiplicación de inóculos de HMA por el método de Sustrato Sólido, generalmente se busca un

medio que proporcione aireación, baja proporción de nutrientes disponibles que no inhiban el establecimiento de la asociación y libre de patógenos. En estudios realizados se han utilizado diferentes tipos de sustratos, en donde algunos han proporcionado buenos resultados y otros como algunas turbas y sustratos compuestos, efectos negativos (Jaizme y Rodríguez, 2004).

En este experimento los sustratos que mejor favorecieron la asociación de HMA sobre la planta hospedera fueron el S2 arena 50) y el S6 (vermiculita 50), no obstante desde el punto de vista de costos de los materiales inertes, así como

de facilidad de obtención, el sustrato S2 resulta ventajoso sobre el S6. La proporción de sustrato/suelo que más favoreció la respuesta en porcentaje de colonización de raíces fue la proporción volumen a volumen 50/50. El sustrato S3 (suelo 70: cascarilla de arroz 30) no favoreció la asociación micorrícica, ni la producción de esporas probablemente porque la proporción y calidad del material inerte adicionado no fue suficiente para generar unas propiedades físicas adecuadas del sustrato y evidenciado en el mejor comportamiento del sustrato S6 cuya única diferencia fue la proporción del material inerte adicionado.

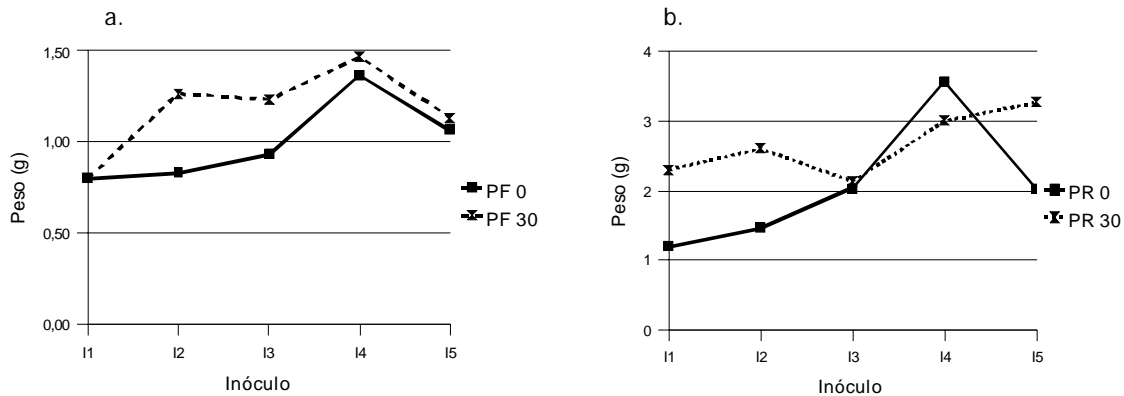


Figura 3. Comportamiento del peso seco del sistema foliar (PF) a) y radical (PR) b), de plantas de banana (*Musa AAA* cv. Gran Enano) con cero y 30 días de aclimatación, bajo cinco tipos de inóculo.

La planta hospedadora que mejor favoreció la asociación micorrícica independientemente del sustrato fue la B; sin embargo, su comportamiento respecto al número de esporas, fue contrario. Un comportamiento inverso presentó la planta K, la cual favoreció la producción de esporas y no así la asociación. Es frecuente encontrar un comportamiento inverso entre la asociación y la producción de esporas, es decir cuando una planta favorece la asociación micorrícica, la producción de esporas puede comprometerse y viceversa.

Si se tienen presentes las características del inóculo a usar, es decir la producción de un inóculo compuesto de esporas enriquecido con raíces de la planta hospedadora, fue la planta S la que favoreció tanto la colonización micorrícica como la producción de esporas. Estos resultados positivos obtenidos con el *Sorgum*

vulgare se apoyan en el trabajo práctico desarrollado por el INVAM (Colección Norteamericana de Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular). Allí se ha utilizado esta planta rutinaria en el banco de germoplasma, considerada como excelente hospedadora para un amplio rango de HMA en condiciones de invernadero; sin embargo, pueden no comportarse como óptimos en todas las regiones geográficas. Adicionalmente se considera una buena planta hospedadora utilizada en suelos nativos, o en poblaciones de hongos heterogéneos u homogéneos en cultivos a granel, por poseer un sistema radical más vigoroso y sus semillas menos susceptibles al estrés por transplante (Morton, Bentivenga y Wheeler, 1993).

En la producción de HMA, las variables porcentaje de colonización y número de esporas

pueden evaluar el inóculo obtenido, como se observa en este experimento. La producción de las especies nativas de HMA de agroecosistemas bananeros del Urabá muestran resultados diferentes para estas variables en la obtención de propágulos (raíces, esporas), dependiendo de la planta hospedadora o del sustrato. De esta manera si el interés es producir raíces colonizadas deberá utilizarse la B (*B. decumbens*) y si es para obtener esporas, el S (*S. vulgare*) presenta mejores resultados. Es importante resaltar que un inóculo con solo raíces colonizadas como propágulos infectivos, es de excelente calidad siempre y cuando se utilice de inmediato, porque sin la planta viva, el micelio colonizador muere en pocas semanas, aún almacenado en un ambiente fresco (Hass y Krikum, 1985).

Para este caso, la multiplicación por el método de Sustrato Sólido implica una selección de un sistema de propagación conformado por una planta hospedadora y un sustrato. Así la planta B en sustrato S2 y S4 es un sistema que favorece la producción de raíces y la planta S en sustrato S1 favorece la producción de esporas.

Lo anterior refleja una tendencia en los resultados para la producción de inóculos de HMA, bien sea raíces colonizadas o esporas de HMA. De esta manera se acepta que para la multiplicación de HMA en Sustrato Sólido no solo debe tenerse en cuenta el sustrato y la proporción a utilizar sino además la planta hospedadora que se sembrara sobre este, convirtiéndose en un sistema de multiplicación (sustrato-planta) propio para cada caso.

La planta trampa T (*T. erecta*) parece ser adecuada al menos para el inóculo, condiciones y sustratos trabajados tanto en la colonización como en la inducción de la producción de esporas.

Con relación al tiempo de inoculación con HMA sobre planta micropropagadas, existen tres estadios en que podría realizarse: *in vitro*, *ex vitro* durante fase de enraizamiento al inicio de aclimatación y *ex vitro* en aclimatación o fase de vivero (Vestberg y Estaún, 1994).

Se han publicado varios estudios descriptivos de experimentos que evalúan la inoculación *ex*

vitro al inicio y al final de la etapa de aclimatación en plántulas de vid, frambuesa, platanera, piña, fresa, pera, entre otras y al comparar lo que tarda la inoculación al comienzo de la aclimatación o al principio de la etapa de endurecimiento, se ha visto que en algunos casos, se produce una mejor respuesta de la planta cuando la inoculación tiene lugar al principio de la etapa de endurecimiento (Vidal *et al.*, 1992; Azcón *et al.*, 1992).

En plantas de plátano los estudios muestran un buen resultado al combinar la multiplicación *in vitro* acompañada de la micorrización temprana, optimizando el enraizamiento y el desarrollo de la microplántula (Jaizme y Azcón, 1995; Jaizme *et al.*, 2002; Jaizme y Rodríguez, 2004).

Los resultados de este experimento muestran un buen comportamiento para la inoculación *ex vitro* sin diferencias significativas al inocular el día 0 ó 30 días de esta etapa, esto indica que las plántulas cuando salen del laboratorio cuentan ya con un sistema radical suficientemente desarrollado para facilitar una asociación adecuada. Sin embargo, para experimentos posteriores se recomienda evaluar una diferencia en tiempo más marcada e igualmente una evaluación de los parámetros de crecimiento y desarrollo durante mayor tiempo.

Adicionalmente, en términos de mano de obra, la inoculación puede ser ejecutada simultáneamente con la preparación del sustrato para la aclimatación de las plantas *in vitro* consumiendo menor tiempo.

En cuanto a los inóculos evaluados fueron los nativos de agroecosistemas bananeros (I3, I4 e I5) los que mayores valores de colonización micorrizal alcanzaron; el inóculo comercial (I2) y el de ecosistema natural (I1) presentaron valores de colonización mucho menores que los anteriores. Teniendo en cuenta que el sustrato de crecimiento utilizado fue suelo del Urabá, característico del agroecosistema de banano, las cepas provenientes de agroecosistemas se adaptaron mejor a dichas condiciones reflejado en mayores porcentajes de colonización. Así mismo, Bolaños (1998) considera que existen condiciones ecológicas que ejercen mayor influencia sobre la

distribución de las especies de HMA como las propiedades físico-químicas del suelo, y que existe un planteamiento biogeográfico donde cada especie tiene características propias y funciones adaptadas a un medio edáfico particular.

Aunque no hubo diferencias significativas entre los inóculos para las variables de crecimiento y desarrollo (altura, diámetro del pseudotallo y emisión foliar), si se presentó diferencias para variables del peso seco foliar y de raíces, mostrando mejores resultados el inóculo I4 (proveniente de agroecosistemas, en sustrato arena).

Los resultados obtenidos en este experimento indican que la inoculación con HMA al inicio de la aclimatación es benéfica porque se colonizan las raíces en desarrollo y se obtienen los beneficios de la simbiosis desde una etapa temprana. Además que la inoculación de cepas nativas del mismo agroecosistema, se convierte en una práctica agronómica potencial al considerar los costos de inóculos foráneos y el impacto ecológico de la manipulación de cepas de un ambiente a otro.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los investigadores Carlos Alberto Rivillas Osorio (Cenicafé) y a María del Carmen Jaizme Vega (Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Tenerife, España) por su asesoría y aportes académicos. Al Centro de Investigaciones del Banano (Cenibanano) y a la Universidad de Antioquia, por el apoyo financiero y logístico.

BIBLIOGRAFÍA

Arias, F., F. Blanco y R. Vargas. 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.

Azcón-Aguilar, C., A. Barcelo, M.T. Vidal and G. Delavina. 1992. Further studies on the influence of mycorrhiza on growth and development of micropropagated avocado plants. *Agronomie* 12(10): 837-840.

Azcon-Aguilar, C. and J.M. Barea. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Sci. Hort.* 68(1-4):1-24.

Barea, J.M., y C. Azcón-Aguilar. 2002. Técnica de elaboración y control de calidad de inoculantes micorrizicos. Departamento de Microbiología de Suelos y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidin, CSIC, Granada, España.

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

Declerck, S., C. Plenchette and D.G. Strullu. 1995. Mycorrhizal dependency of banana (*Musa acuminata*, AAA group) cultivar. *Plant Soil.* 176(1):183-187.

Habte, M. y Osorio, N.W. 2001. Arbuscular mycorrhizas: producing and applying arbuscular mycorrhizal inoculum. CTAHR, College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii. p. 2-47.

Hass, J.H., J. Krikum. 1985. Efficacy of endomycorrhizal-fungus isolates and inoculums quantities required for growth response. *New Phytol.* 100(4): 613-621.

Jaizme Vega, M.C, y A.S. Rodríguez Romero. 2004. Uso de las micorrizas en banano: logros y perspectivas. 143-160. En: Memorias XVI Reunión Internacional ACORBAT. Oaxaca, México.

Jaizme Vega, M.C y R. Azcon. 1995. Responses of some tropical and subtropical cultures to endomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 5(3):213-217.

Jaizme Vega, M.C, M. Esquivel Delamo, P. Tenoury Dominguez, y A.S. Rodriguez Romero. 2002. Efectos de la micorrización sobre el desarrollo de dos cultivares de plantanera micropropagada. *Infomusa* 11(1): 25-28.

Lovato, P.E., V. Gianinazzi-Pearson, A. Trouvelot and S. Gianinazzi. 1996. The state of art of mycorrhiza. and micropropagation. *Adv. Hort. Sci.* 10: 46-52. Citados por Azcon-Aguilar, C. and J.M. Barea. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Sci. Hort.* 68(1-4):1-24.

Montecinos, R. y J. Franco. 1998. Diagnóstico de los principales nematodos del cultivo de papa. Manual Técnico. Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria, IBTA, Cochabamba, Bolivia. 26 p.

- Morton, J.B., S.P. Bentivenga, and W.W. Wheeler. 1993. Germ plasm international collection of arbuscular and vesicular - arbuscular mycorrhizal fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48(1):491-528.
- 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.
- Sieverding, E. 1983. Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Cali. Colombia. 96 p.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems., Dtsch. Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, GTZ No 224. Eschborn, Germany. 370 p.
- Usuga, C.E. y A.E. Franco. 2002. Identificación taxonómica de hongos micorriza arbuscular (M.A) en agroecosistemas bananeros del Urabá antioqueño. *Augura*, Medellín, Colombia, 1(213):20-23.
- Vidal, M.T., C. Azcon-Aguilar, J.M. Barea and F. Pliego-Alfaro. 1992. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. *Hort. Sci.* 27(7): 785-787.
- Varma, A. and H. Schuepp, 1998. Influence of mycorrhization on the growth of micropropagated plants. In: Mukerji, K.G. (ed.). *Concepts in mycorrhizal research*. Kluwer Academic Publisher, Dordrech, the Netherlands. 374 p. Citados por Azcon-Aguilar, C. and J.M. Barea. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Sci. Hort.* 68(1-4):1-24.
- Vestberg, M. and Estaún, 1994. Micropropagated plants, an opportunity to positively manage mycorrhizal activities. p. 217-226. In: Gianinazzi, S. and H. Xchüep (eds.). *Impacto of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhäuser Verlag, Basel, Seitzerland. 226 p.