

LA INOCULACION CON *Glomus manihotis* SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE PLANTAS DE YUCA PRODUCIDAS *in vitro*, EN LA FASE DE ACLIMATIZACION¹

Luis D. Calderón^{2/*}, Luis Gómez^{**}, Fabio Blanco^{***}, Lidieth Uribe*

Palabras clave: *Glomus manihotis*, *Manihot esculenta*, yuca, *in vitro*, aclimatización.

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la inoculación con *Glomus manihotis* sobre el desarrollo de plantas micropropagadas de yuca (*Manihot esculenta* var. Valencia) en la etapa de aclimatización. La inoculación con *G. manihotis* incrementó significativamente el desarrollo de las plantas micorrizadas en comparación con las no micorrizadas. El sistema radical de las plantas micorrizadas fue mayor que el de las no micorrizadas, lo que indica que el mayor desarrollo de las primeras podría estar asociado a una mejor nutrición. La micorrización de plantas micropropagadas de yuca podría mejorar su adaptación en campo, si se considera el empleo de suelos marginales para la producción de yuca.

ABSTRACT

Inoculation with *Glomus manihotis* on growth and development of *in vitro* propagated cassava plants during acclimatization. The effect of the fungus *Glomus manihotis* on growth of micropropagated cassava (*Manihot esculenta*) plants was studied under greenhouse conditions. Inoculation with *G. manihotis* significantly increased growth of plants in relation to non-mycorrhizal plants. Root growth was higher with mycorrhiza than without, thus *G. manihotis* appears to favor the growth of cassava plants by enhancing plant nutrition. Mycorrhizal colonization of micropropagated cassava plants may increase their field adaptability, especially in marginal soils.

INTRODUCCION

Entre los cultivos que proporcionan alimentos básicos, la yuca es uno de los más importantes en los trópicos. Las raíces de la yuca producen más calorías por unidad de área que cualquier otro cultivo, a excepción de la caña de azúcar. Además, es comúnmente cultivada en condiciones

marginales que, generalmente, dificultan la obtención de otros productos agrícolas (Allemann et al. 1993, Roca et al. 1991).

Aunque la yuca se propaga sin dificultad por esquejes caulinareos o estacas, se han establecido programas para acelerar la propagación de nuevos clones y para la obtención de material de siembra libre de plagas y enfermedades. Dentro

1/ Recibido para publicación el 12 de julio del 2000.

2/ Autor para correspondencia.

* Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

** Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

*** Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.

de esos programas, el cultivo de tejidos se ha convertido en una herramienta clave para la reproducción acelerada de las plantas de yuca (Roca et al. 1991, Azcón-Aguilar et al. 1997, Debergh y Zimmerman 1990).

El traslado de las plántulas de las condiciones *in vitro* a las condiciones externas (aclimatización) es uno de los factores más críticos del proceso de la micropropagación y en muchos casos limita la aplicación comercial de la técnica (Preece y Sutter 1990). La inoculación de plantas micropropagadas con hongos micorrizógenos vesículo-arbuscular (MVA), ha mostrado ser un procedimiento útil para aumentar la sobrevivencia y promover un mejor desarrollo y crecimiento de las plantas en la fase de aclimatización, debido a los beneficios derivados de la simbiosis mutualista que se establece entre las raíces de la planta y el hongo (Lovato et al. 1996). Estos hongos dependen de la planta para el suministro de carbono, energía y de un nicho ecológico y a la vez entregan nutrimentos minerales (especialmente los poco móviles como el P); estimulan la producción de sustancias reguladoras del crecimiento; inducen un incremento de la tasa fotosintética y ayudan en los ajustes osmóticos cuando hay sequía, dando a la planta una mayor tolerancia a condiciones de estrés ambiental, entre otros beneficios (Allen et al. 1980, Bethlenfalvay y Linderman 1992).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación con *Glomus manihotis* sobre el desarrollo de plántulas de yuca producidas *in vitro*, después la fase de establecimiento inicial en el invernadero.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron plántulas micropropagadas de yuca (*Manihot esculenta* var. Valencia) en estado IV (Debergh y Zimmerman 1990), provistas por la empresa Cristal Vitro S.A., Montes de Oca, Costa Rica. Las plántulas fueron obtenidas según la metodología propuesta por Saborío et al. (1990). Plántulas de una altura promedio de 10 ± 1 cm se recibieron en bandejas plásticas de 96 huecos.

Las plántulas fueron transplantadas a potes de polietileno negro N°100 (1 planta/pote) y colocadas en un invernadero con techo de lámina plástica transparente ubicado en San Pedro de Montes de Oca. El sustrato utilizado fue una mezcla de suelo, arena y fibra de coco (2:1:1 v/v/v), esterilizado una sola vez en el esterilizador de suelo marca PRO-GROW, a una temperatura de 180 °C/2 h.

Se evaluaron 2 tratamientos: yuca inoculada con el hongo micorrizógeno *Glomus manihotis* Howeler, Sieverding & Schenk y yuca sin inocular. Se utilizaron 15 plantas por tratamiento en un diseño experimental completamente al azar. En el tratamiento con micorriza se realizó la inoculación al momento de la siembra aplicando 10 g de inóculo/planta debajo de la raíz de manera que el hongo estuviera en contacto directo con la misma.

El inóculo de *G. manihotis* se obtuvo utilizando *Brachiaria decumbes* como planta hospedera. Dicho inóculo provino de la colección de micorrizas de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional en Heredia. El inoculante contenía suelo, esporas viables, hifas y fragmentos de raíz de *B. decumbes* infectada. La viabilidad de las esporas en el inóculo se determinó por el método de An y Hendrix (1988).

Se aplicó riego por aspersión 2 veces al día y se agregó agua al sustrato cada 2 ó 3 días. No se realizó fertilización de ningún tipo durante el experimento. Las variables medidas al concluir la etapa de invernadero (70 días) fueron: porcentaje de infección de la raíz (P.I.), la altura de la planta, el número de nudos, el número de hojas, el peso fresco total, el peso seco aéreo y el peso seco radical por planta.

Para determinar el porcentaje de infección (P.I.) se utilizó el método sugerido por Sieverding (1983). Las raíces teñidas se distribuyeron al azar en una caja petri (con muy poca agua). Se seleccionaron 20 raíces teñidas (de 1 ó 2 cm) para ser montadas en una lámina portaobjetos con glicerol y cubiertos con un cubreobjetos.

Se observaron las raíces en el microscopio con el aumento del objetivo de 20X, moviendo la lámina por medio del carro portaobjetos en toda la extensión de la muestra. El movimiento se realizó de forma transversal a las raíces, de manera que el objetivo las intersectara. Cada intersección

representaba un campo positivo (infectado) o negativo (no infectado). Se contaba la intersección como infectada si se observaba que en la raíz existía alguna estructura de *Glomus manihotis* (Figura 1A).

Se cuantificaron las intersecciones totales durante el proceso y se aplicó la siguiente fórmula para el cálculo del porcentaje de infección:

$$P.I. = \frac{N^{\circ} \text{ de campos infectados} \times 100}{N^{\circ} \text{ de campos totales}}$$

La tinción de las raíces de las plantas de yuca fue realizada con azul de tripano y se aplicó la metodología propuesta por Sieverding (1983) con las siguientes modificaciones:

- KOH 10%, 80°C, 15 min
- H₂O₂, 80°C, 15 min
- HCl 1%, temperatura ambiente, 15 h
- Azul de tripano, 80°C, 10 min

Se aplicó una prueba de T para el análisis estadístico de los datos.

RESULTADOS

El 100% de las plantas inoculadas mostró la presencia de micorriza (Figura 1A) y el porcentaje promedio de infección de la raíz (P.I.) fue de un 46%. En las plantas testigo (no inoculadas) no se observó infección.

La inoculación con *Glomus manihotis* favoreció el crecimiento y desarrollo de las plantas de yuca (Figura 1B). El número de hojas, la altura de la planta y el número de nudos, fueron significativamente mayores ($P \leq 0.0001$) en las plantas inoculadas en comparación con las no inoculadas (Cuadro 1). En relación al peso fresco total y al peso seco aéreo y radical, las plantas micorrizadas alcanzaron valores que duplicaron el de las no micorrizadas (Cuadro 1 y Figura 2). El volumen del sistema radical fue mayor para las plantas con *Glomus* (Figura 1C). Todas las variables evaluadas presentaron coeficientes de variación menores en las plantas inoculadas con

relación al testigo no inoculado (Cuadro 1), lo que se tradujo en un desarrollo uniforme de las primeras.

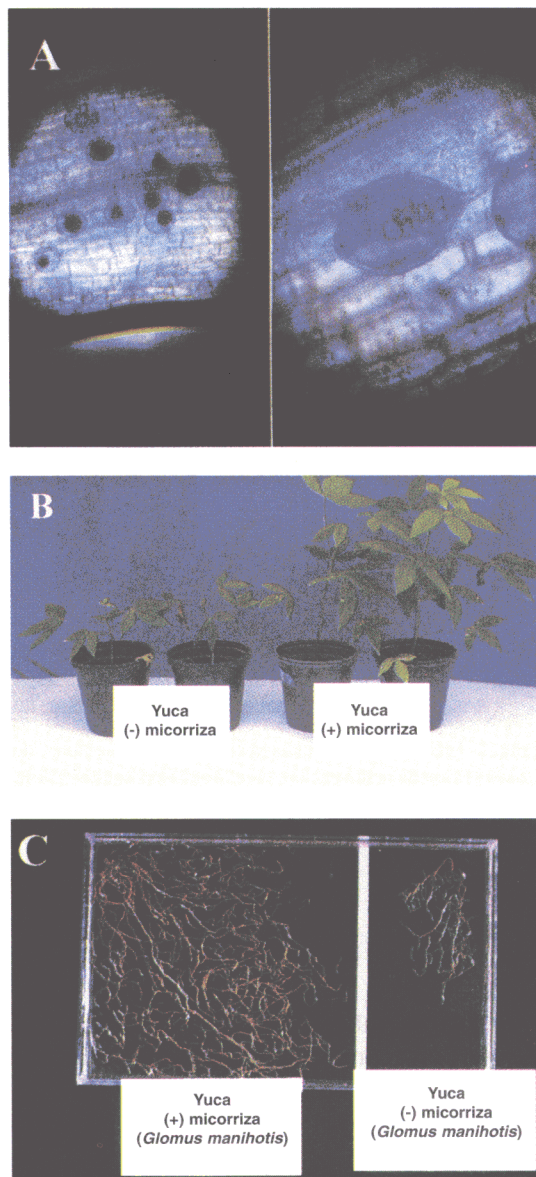


Fig. 1. Efecto de la inoculación con *Glomus manihotis* sobre el desarrollo de plantas micropropagadas de yuca var. Valencia.

- Esporas de *G. manihotis* en raíces de yuca.
- Desarrollo de plantas.
- Desarrollo radical.

Cuadro 1. Efecto de la inoculación con *Glomus manihotis*, durante la fase de aclimatación sobre la altura, el número de hojas, el número de nudos, el peso fresco, el peso seco aéreo y radical de plantas de yuca micropropagadas. n=15 (Promedio±Error estándar).

Tratamiento*	Altura (cm)	No. de hojas	No. de nudos	Peso fresco (g)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco radical (g)
Inoculadas	23.67 ± 0.78	10.53±0.19	12.53±0.16	4.31±0.19	0.92±0.05	0.23±0.02
Testigo	16.10 ±1.01	7.58±0.63	9.08±0.57	2.01±0.31	0.46±0.06	0.09±0.01

* Medias de los tratamientos son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.0001$).

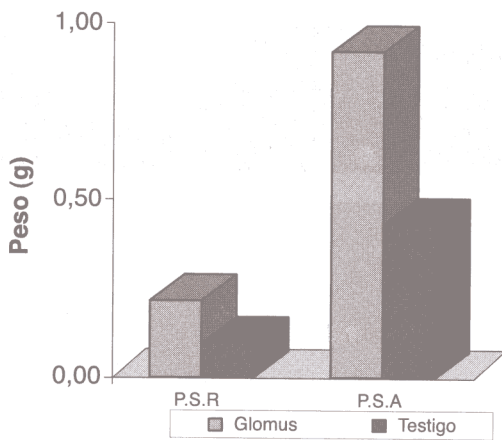


Fig. 2. Efecto de la inoculación con *Glomus manihotis*, durante la fase de aclimatación, en el peso seco radical (P.S.R.) y en el peso seco aéreo (P. S.A.) de plantas de yuca micropropagadas, 65 días después de la inoculación.

DISCUSION

La inoculación en invernadero de plantas de yuca micropropagadas con *Glomus manihotis* favoreció su crecimiento y desarrollo (Cuadro 1). Resultados similares han sido descritos para plantas micropropagadas de piña (Matos 1996), banano (Pinochet et al. 1997), vid (Alarcón et al. 1996a), fresa (Alarcón et al. 1996b), e inclusive yuca (Azcón-Aguilar et al. 1997).

La respuesta positiva a la inoculación con MVA está también directamente relacionada con su efecto sobre la rizogénesis (Schubert et al. 1990). El volumen radical de las plantas micorri-

zadas fue mayor que el de las no micorrizadas (Figura 1C), lo que permite una mejor absorción de los nutrimentos presentes en el sustrato. En la raíz infectada, el micelio del hongo crece tanto a través de las raíces como sobre ellas extendiéndose a mayor distancia que los pelos radiculares, lo cual permite una mayor exploración del suelo, logrando así, un mejor aprovechamiento de los nutrimentos y el agua del sustrato (Alarcón et al. 1996). Las plantas micorrizadas presentaron una mayor homogeneidad fenotípica que las no inoculadas (coeficiente de variación bajo), lo que indica que las mismas fueron menos afectadas por el estrés del transplante.

La cepa *Glomus manihotis* mostró una alta infectividad y un efecto muy favorable sobre el desarrollo y el establecimiento de las plantas de la variedad de yuca Valencia. La respuesta, sin embargo, podría cambiar con otras variedades de yuca según lo reportado por Azcón-Aguilar et al. (1997), quienes demostraron que la respuesta a la simbiosis dependió de la cepa micorrizógena empleada y de la variedad de yuca utilizada, así por ejemplo *G. deserticola* promovió un efecto positivo independiente de la variedad, mientras que la respuesta a la inoculación con *G. clarum* y *G. fasciculatum* fue dependiente del genotipo (Azcón-Aguilar et al. 1997).

Glomus manihotis es una cepa que se considera de una alta afinidad por la yuca y se ha observado un efecto positivo en diferentes clones de yuca, en ensayos realizados en invernadero y en el campo (Sieverding y Galvez 1988, Sieverding 1988, Sieverding y Trujillo 1986). Debe evaluarse su comportamiento sobre otros

genotipos propagados *in vitro*. También es necesario establecer si el efecto positivo observado en plantas micropropagadas de yuca durante su etapa en invernadero, favorece posteriormente el desarrollo de las mismas en vivero y en el campo.

LITERATURA CITADA

- ALARCON, M.C.; GONZALEZ-CH.; FERRERA-CERRATO, R.; VILLEGAS-MONTER, A. 1996a. Inoculación de hongos micorrízicos VA en vid y piña obtenidos por cultivo *in vitro*. Area de Microbiología, PROEDAF-Instituto de Recursos Naturales, Colegio Postgraduados en Ciencias Agrícolas. México. p. 114-121.
- ALARCON, M.C.; GONZALEZ-CH.; FERRERA-CERRATO, R.; VILLEGAS-MONTER, A. 1996b. Influencia de 3 hongos micorrízicos vesículo-arbusculares en fresa (*Fragaria x annanassa* Duch.) cv. Fern y su interacción con fertilización fosfórica. Area de Microbiología, PROEDAF-Instituto de Recursos Naturales. Colegio Postgraduados en Ciencias Agrícolas. México. p. 114-121.
- ALLEMAN, J.; SCHUMANN, J.P.; ALLEMANN, A. 1993. Current and future initiatives in cassava research in South Africa. *In: Proceedings of the 1st International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network*. Ed. By W.M. Roca, A.M. Thro. Colombia, CIAT. p. 303-308.
- ALLEN, M.F.; MOORE, T.S.; CHRISTENSEN, M. 1980. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Cytokinin increases in the host plant. *Can. J. Bot.* 58:371-374.
- AN, Z.-Q.; HENDRIX, J.W. 1988. Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycología* 80(2):259-261.
- AZCON-AGUILAR, C.; CANTOS, M.; TRONCOSO, A.; BAREA, J.M. 1997. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. *Scientia Horticulturae* 72:63-71.
- BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G. 1992. Mycorrhizae in sustainable agriculture. Madison, Wisconsin, USA. ASA Special Publication Number 54. p. 45-70.
- DEBERGH, P.; ZIMMERMAN, R. 1990. Micropropagation technology and application. Luwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. 484 p.
- LOVATO, P.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; TROUVELOT, A.; GIANINAZZI, S. 1996. The state of micropropagation. *HortScience* 10:46-52.
- MATOS, R.M. 1996. Effect of inoculation by arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of micropropagated pineapple plants. *Fruits* 51(2):115-119.
- PREECE, J.; SUTTER, E. 1990. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *In: Micropropagation technology and application*. Ed. by P. Debergh y R. Zimmerman. Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. p. 71-93.
- PINOCHET, J.; FERNANDEZ, C.; JAIZME, M.; TENOURY, P. 1997. Micropropagated banana infected with *Meloidogyne javanica* responds to *Glomus intraradices* and phosphorus. *HortScience* 32(1):101-103.
- ROCA, W.M.; NOLT, B.; MAFLA, G.; ROA, J.; REYES, R. 1991. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *In: Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Ed. by W.M. Roca y L.A. Mroginski. Cali, Colombia. p. 403-420.
- SABORIO, F.; TORRES, S.; GOMEZ, L. 1998. Development of a clean planting-material production system on tropical root and tuber crops, using *in vitro* propagated plants. *Proc. Int. Symp. Biotechnology Tropical & Subtropical Species*. Acta Hort. N°461. p. 495-501.
- SCHUBERT, A.; MAZZITELLI, M.; ARIUSSO, O.; EYNARD, I. 1990. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on micropropagated grapevines: influence of endophyte strain. P fertilization and growth medium. *Vitis* 29:5-13.
- SIEVERDING, E. 1983. Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio. CIAT. Colombia. p. 10-11.
- SIEVERDING, E.; TRUJILLO, S. 1986. Estudio de la persistencia de especies inoculadas de hongos micorrízicos VA a la yuca con 2 fuentes de fósforo y 2 sistemas de inoculación en los suelos de Mondomo, Cauca. *Suelos Ecuatoriales* 16(1):116-121.
- SIEVERDING, E.; GALVEZ, L. 1988. Performance of different cassava clones with various VA mycorrhizal fungi. *Angew. Botanik* 62:273-282.
- SIERVERDING, E. 1988. Effect of soil temperature on performance of different VA mycorrhizal isolates with cassava. *Angew. Botanik* 62:295-300.