Boletín Técnico No. 35

Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) en palma de aceite

Yurany D. Rivera Méndez, Tania Galindo Castañeda, Arley Fernando Caicedo, Edwin Arley Navia y Hernán Mauricio Romero

fedepalma
COLCIENCIAS
cenipalma

Boletín Técnico No. 35

Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) en palma de aceite

Autor

Yurany D. Rivera Méndez
Tania Galindo Castañeda
Arley Fernando Caicedo
Edwin Arley Navia
Hernán Mauricio Romero

Centro de Investigación en Palma de Aceite - Cenipalma
Bogotá, septiembre de 2014

Boletín Técnico No. 35

Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) en palma de aceite

Publicación del Centro de Investigación en Palma de Aceite - Cenipalma, cofinanciada por Fedepalma - Fondo de Fomento Palmero.

Autor
Yurany D. Rivera Méndez
Tania Galindo Castañeda
Arley Fernando Caicedo
Edwin Arley Navia
Hernán Mauricio Romero*

Coordinación editorial
Yolanda Moreno Muñoz
Esteban Mantilla

Diagramación
Fredy Johan Espitia Ballesteros

Impresión
Javegraf

Cenipalma
Calle 20 A No. 43 A-50, piso 4
PBX: (57-1) 2086300 Fax: (57-1) 3681152
www.cenipalma.org
Bogotá, D. C. - Colombia

Septiembre de 2014
ISBN: 978-958-8360-50-8

* Profesor Asociado, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia.

Presentación

Sostenibilidad y competitividad son conceptos que están hoy en el lenguaje de todos los sistemas productivos en el mundo. La agroindustria de la palma de aceite, que es responsable de suplir casi el 40 % de las necesidades de aceites y grasas de la población mundial, no es ajena a estas presiones; por ello, el desarrollo de tecnologías de cultivo y procesamiento que aumenten su competitividad y sostenibilidad son fundamentales. Dentro de los renglones más susceptibles de mejora está la fertilización y nutrición del cultivo, y el uso y aprovechamiento de microorganismos del suelo que puedan ayudar al proceso de absorción y asimilación de los nutrimentos es una muy buena alternativa de mejora.

Los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) son quizás los microorganismos mejor estudiados y usados para ayudar en la sostenibilidad de los cultivos, ya que al hacer una simbiosis con la planta ayudan en la absorción de nutrimentos y agua por parte de la raíz; además, juegan un papel importante en la tolerancia de las plantas a algunos microorganismos que de otra manera podrían causar graves enfermedades a la planta.

De esta forma, en este boletín ponemos a disposición del gremio palmicultor colombiano los resultados de varios años de investigación entre Cenipalma y el Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, en la búsqueda de HFMA y su utilización para aumentar la competitividad del cultivo. El boletín da una visión global y un marco conceptual de lo que son las micorrizas, su uso y aprovechamiento en el cultivo de la palma de aceite, así como metodologías sencillas y prácticas para que los palmicultores puedan aprovechar este recurso biológico para aumentar la productividad y sostenibilidad del cultivo.

Adicionalmente, se introducen los Microorganismos Solubilizadores de Fosfatos (MSF), que son hongos o bacterias que pueden ayudar a aumentar la disponibilidad de fósforo, para que a partir de fuentes no solubles, la planta pueda absorber los nutrimentos que requiere.

El boletín es una invitación para que los palmicultores utilicen alternativas biológicas en la búsqueda de soluciones a los problemas y limitaciones que pueda presentar el cultivo y, especialmente, para mejorar la sostenibilidad y productividad de la agroindustria de la palma de aceite en Colombia.

Contenido

Pág.

Introducción 7

Biología de los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) 9

Micorrizas: simbiosis HFMA–raíces de las plantas terrestres 11

Colonización radical por parte de HFMA 11

Uso de inóculos micorrizógenos en palma de aceite 21

Producción de inóculo a partir de esporas de HFMA 25

HFMA efectivos para la palma de aceite 27

Obtención de un inóculo efectivo de HFMA 28

Protocolo 1: Extracción e identificación de esporas de HFMA 29

Protocolo 2: Producción de inóculo a partir de esporas de HFMA 34

Los HFMA y los Microorganismos Solubilizadores de Fósforo (MSF) 37

La interacción HFMA-MSF y su papel en la disponibilidad de fósforo para las plantas 39

Los MSF en la rizósfera de la palma de aceite 41

Consideraciones finales 44

Agradecimientos 46

Anexo. Protocolo de laboratorio para clareo, blanqueo, tinción de raíces e identificación de estructuras de HFMA 47

Referencias 52

Introducción

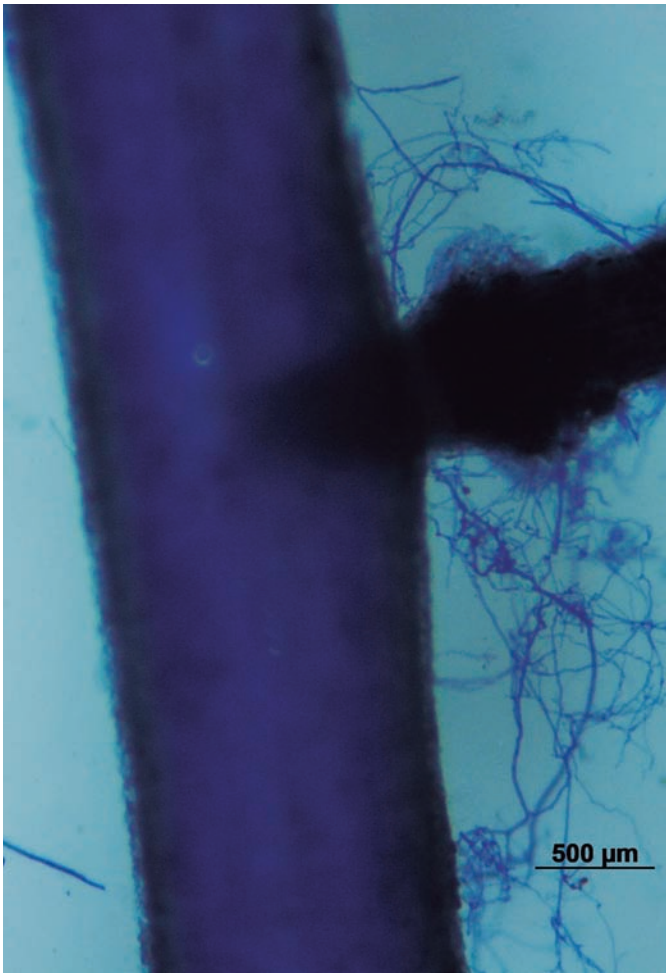
La palma de aceite es un cultivo importante a nivel mundial, tanto para la producción de aceite para el consumo humano como para usos industriales, especialmente para la producción de biodiésel. Es una planta perenne cuyo ciclo económico puede durar hasta 30 años y su productividad en términos de toneladas de aceite por hectárea es hasta 10 veces la del siguiente cultivo oleaginoso. En Colombia, el área sembrada en el año 2013 alcanzó las 476.781 ha y se estima que crezca a un ritmo cercano al 10 % anual (Fedepalma, 2014). Pese a esta gran expansión, una alta proporción del cultivo se encuentra sobre suelos de baja fertilidad (fijadores de fósforo, ácidos o con altos niveles de salinidad sódica) que limitan en buena medida la productividad (Munévar, 1998), y la competitividad del cultivo que están impactadas por los altos requerimientos nutricionales de la planta (Galindo y Romero, 2010) y el elevado costo de los fertilizantes (20 a 30 % de los costos de producción del fruto fresco). Lo anterior justifica la búsqueda de tecnologías que hagan más eficiente la fertilización y/o sustituyan los fertilizantes inorgánicos.

Una alternativa para la nutrición biológica de la palma de aceite son los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA), un proceso natural de la palma en campo (Motta y Munévar, 2005), que aumentaría la superficie de absorción de sus raíces mediante una profusa red de HFMA y microorganismos asociados (Phosri *et al*., 2010).

El presente Boletín Técnico recoge las principales experiencias del grupo de Biología y Mejoramiento genético del Centro de Investigación en palma de aceite, Cenipalma, durante el desarrollo del Proyecto Micorrizas arbusculares efectivas de la palma de aceite en la Zona Oriental y Central Colombiana (Contrato No. 7262-454-25875), entre los años 2010 y 2014, cofinanciado por el Fondo de Fomento Palmero, FFP, administrado por Fedepalma y el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias. El documento se divide en tres capítulos que abordan desde la biología de los HFMA y su relación con la palma de aceite, pasando por su producción como biofertilizante para el cultivo, hasta la relación de los HFMA con los Microorganismos Solubilizadores de Fósforo en la rizósfera de la palma.

El propósito es facilitar la consulta de este documento por parte de la comunidad palmera (Directivos, técnicos y personal responsable o participante del área de microbiología de suelo en plantación), así como de estudiantes universitarios, de manera que se convierta en referencia para todas las personas y empresas interesadas en el cultivo de la palma de aceite.

Primera parte



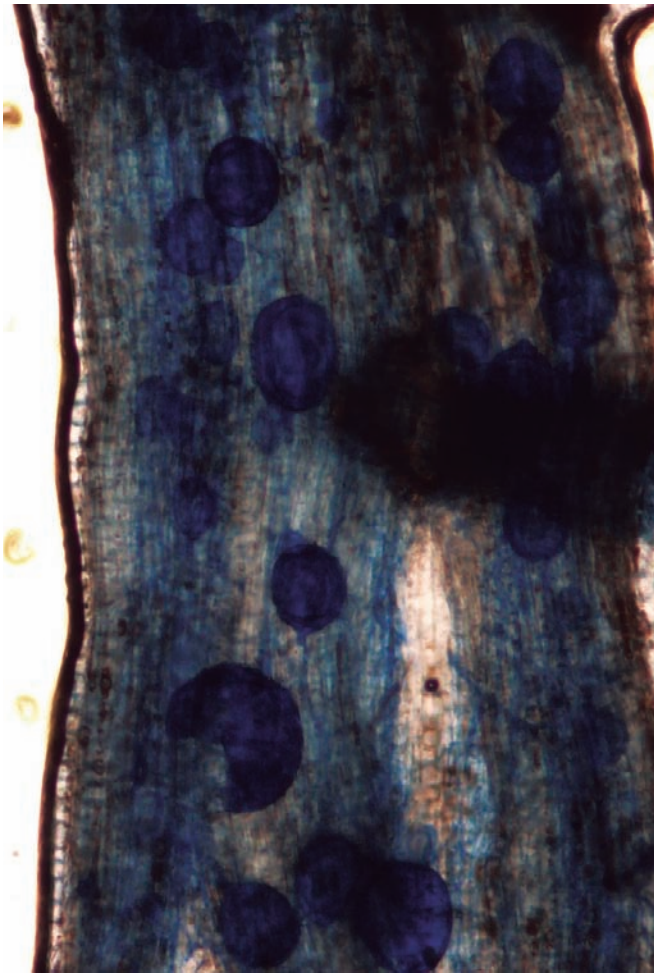
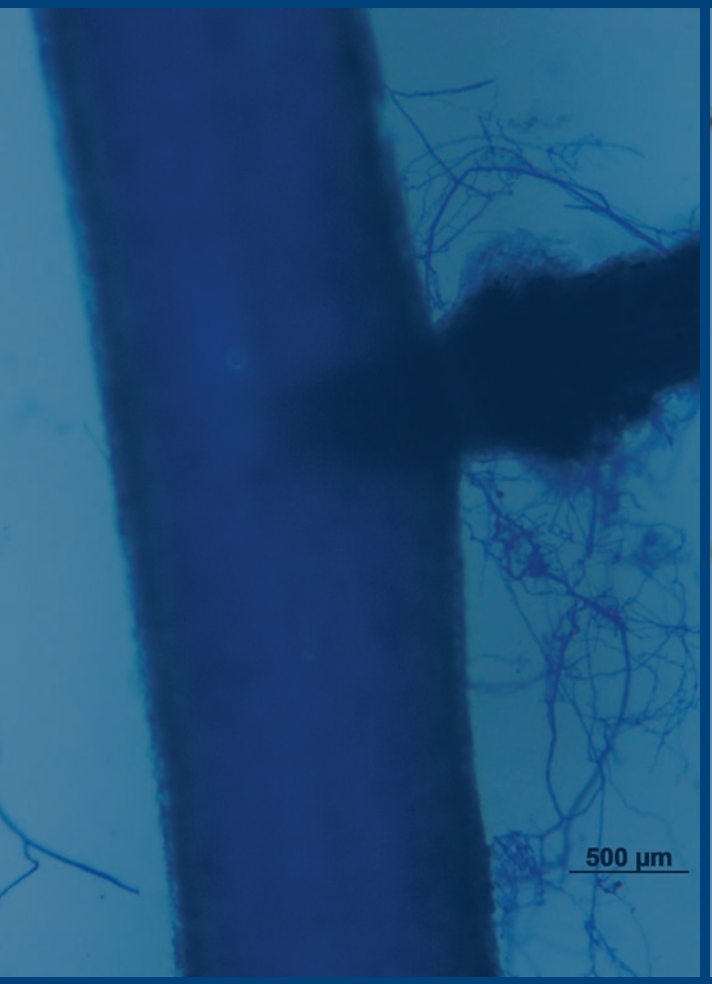
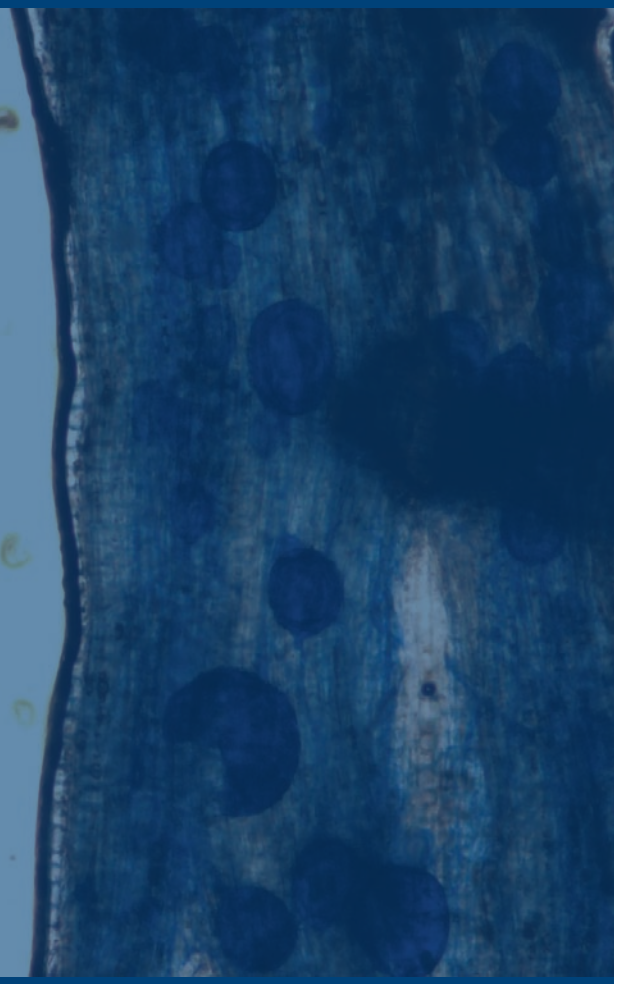


Foto: Caicedo, A. 2013.

Biología de los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA)


500 µm



Biología de los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA)

A continuación se presentan los beneficios de la simbiosis entre los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) y las raíces de las plantas, el proceso de colonización en raíces de palma de aceite, y los principales avances de investigación en cuanto al uso de inóculos micorrizógenos en el cultivo.

Micorrizas: simbiosis HFMA–raíces de las plantas terrestres

El término micorriza (del griego *mykes*: hongo, *rhiza*: raíz) hace referencia a la asociación mutualista entre algunos hongos microscópicos del suelo y las raíces del 80 % de las plantas terrestres. Los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) constituyen aquellos que colonizan el tejido intrarradical de la planta hospedera, y taxonómicamente pertenecen a la división monofilética Glomeromycota (en el mismo nivel que Basidiomycota y Ascomycota), que según un consenso a nivel molecular sobre algunas regiones de los genes de ARN ribosomal (Redecker *et al.*, 2013), incluyen nueve familias y 18 géneros (Figura 1).

Tal asociación entre el hongo y la planta, actúa como un complemento de la raíz en la toma de nutrientes, especialmente en la absorción de fósforo (Cenipalma, 1995); estimula la tolerancia a condiciones de estrés abiótico como sequía, fluctuación de temperatura, toxicidad por metales, salinidad, etc. (Harris *et al.*, 2009), y a enfermedades, en particular las de origen edáfico, al secretar sustancias antibióticas y metabolitos secundarios como las fitoalexinas y compuestos fenólicos (Hashim, 2004); mejora la calidad del suelo, al participar en la formación de los agregados que facilitan la circulación del agua y el aire, y evitan la erosión (Rillig y Mummey, 2006); aumenta la diversidad y productividad de las plantas en un ecosistema determinado (Barrer, 2009). En contraprestación, los hongos adquieren fotoasimilados de las plantas de forma directa y efectiva través del contacto celular entre las hifas y las células de la raíz (Schultz, 2001).

Colonización radical por parte de HFMA

Dentro de las células corticales de las plantas que colonizan, los HFMA desarrollan estructuras características de la simbiosis, esporas, arbúsculos y vesículas en algunas especies (Phosri *et al.*, 2010), así como micelio intra y extrarradical (Figura 2a-2d). Según Smith y Smith (1997), los arbúsculos son hifas invaginadas por la membrana plasmática de las células corticales con periodos de vida cortos, dónde

se presenta la mayor parte del tránsito de fotoasimilados hacia el hongo y de fósforo hacia la planta; las vesículas son estructuras de reserva que se forman en la parte terminal de las hifas y están compuestas de lípidos principalmente; el micelio extrarradical interactúa con la rizósfera y es el encargado de colonizar una o varias raíces y tomar de nutrientes, mientras el micelio intrarradical da origen a vesículas, arbúsculos o esporas, éstas últimas son estructuras reproductivas que aseguran la dispersión y permanencia del hongo en el suelo.

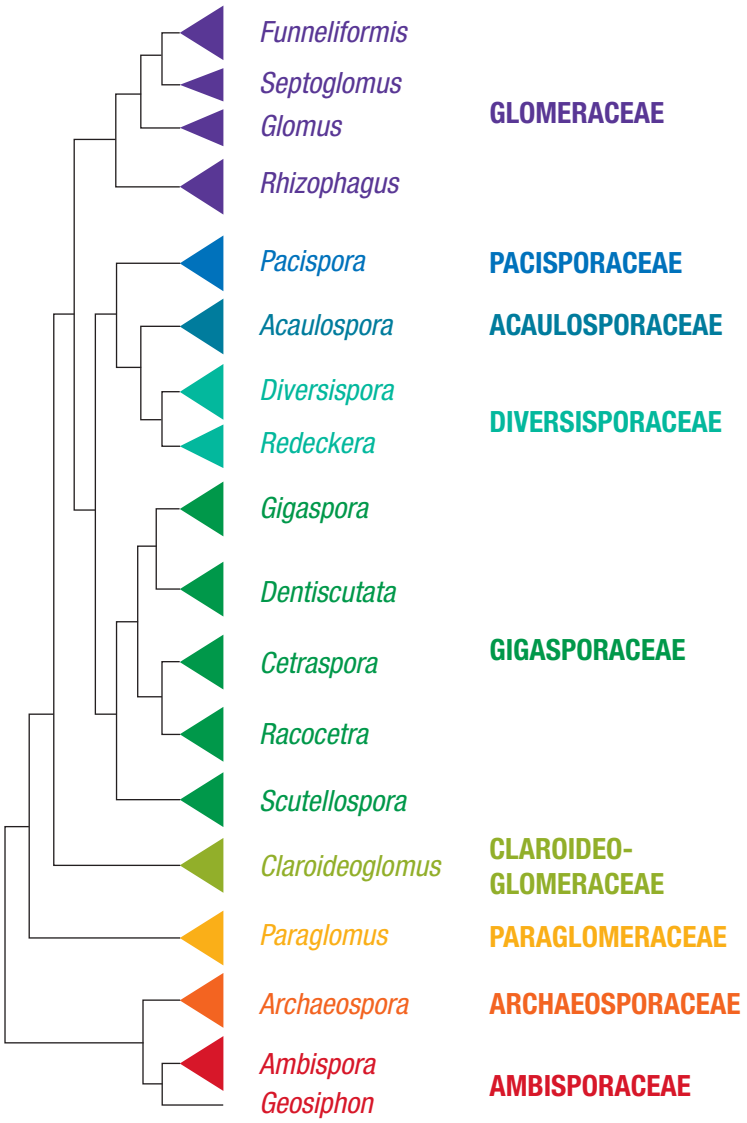


Figura 1. Reconstrucción filogenética de la división Glomeromycota. (Tomado de Redecker *et al.*, 2013).

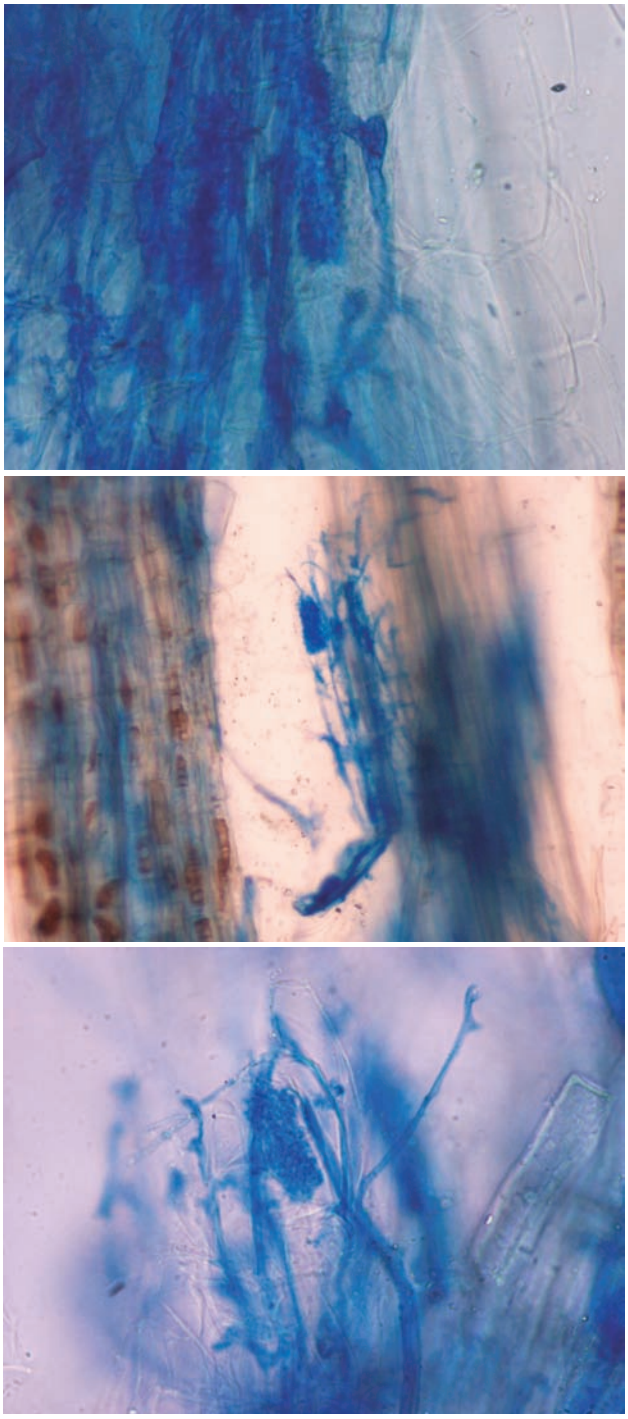


Figura 2a. Arbúsculos de HFMA en raíces de plántulas de *E. guineensis* y el híbrido OxG. Fotos: Rivera, Y.; Caicedo, A. 2013.

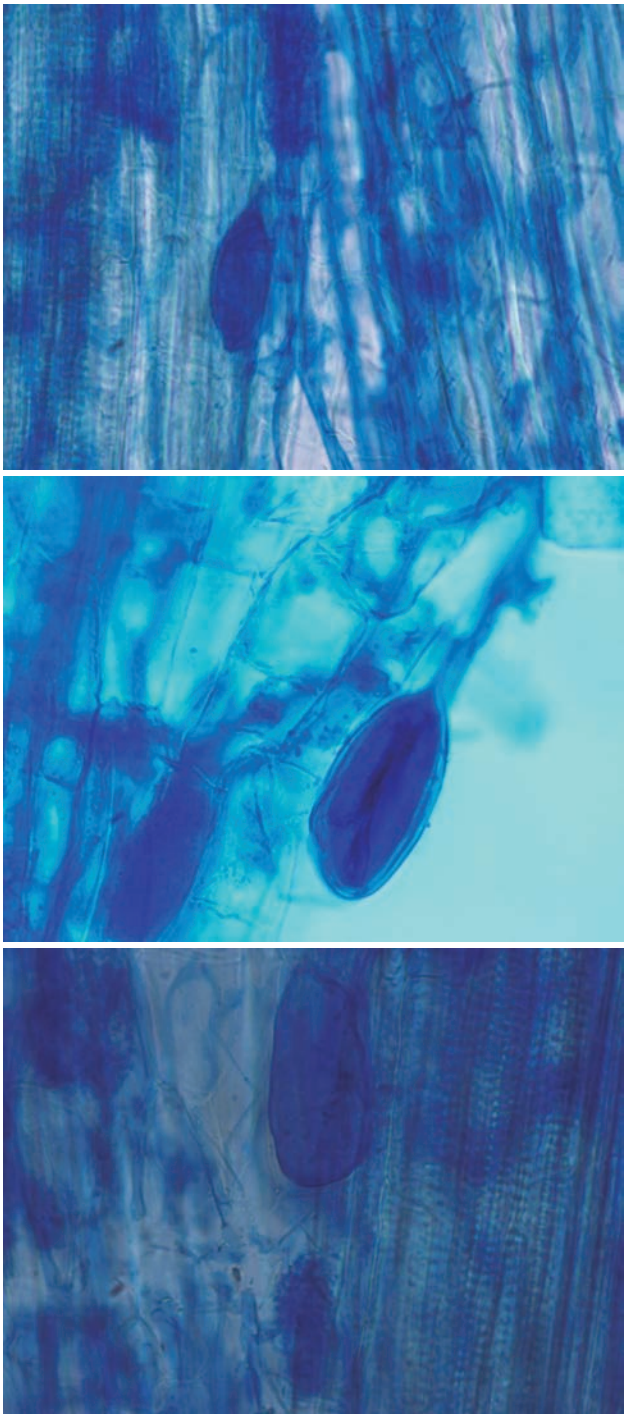


Figura 2b. Vesículas de HFMA en raíces de plántulas de *E. guineensis* y el híbrido OxG. Fotos: Rivera, Y.; Caicedo, A. 2013.

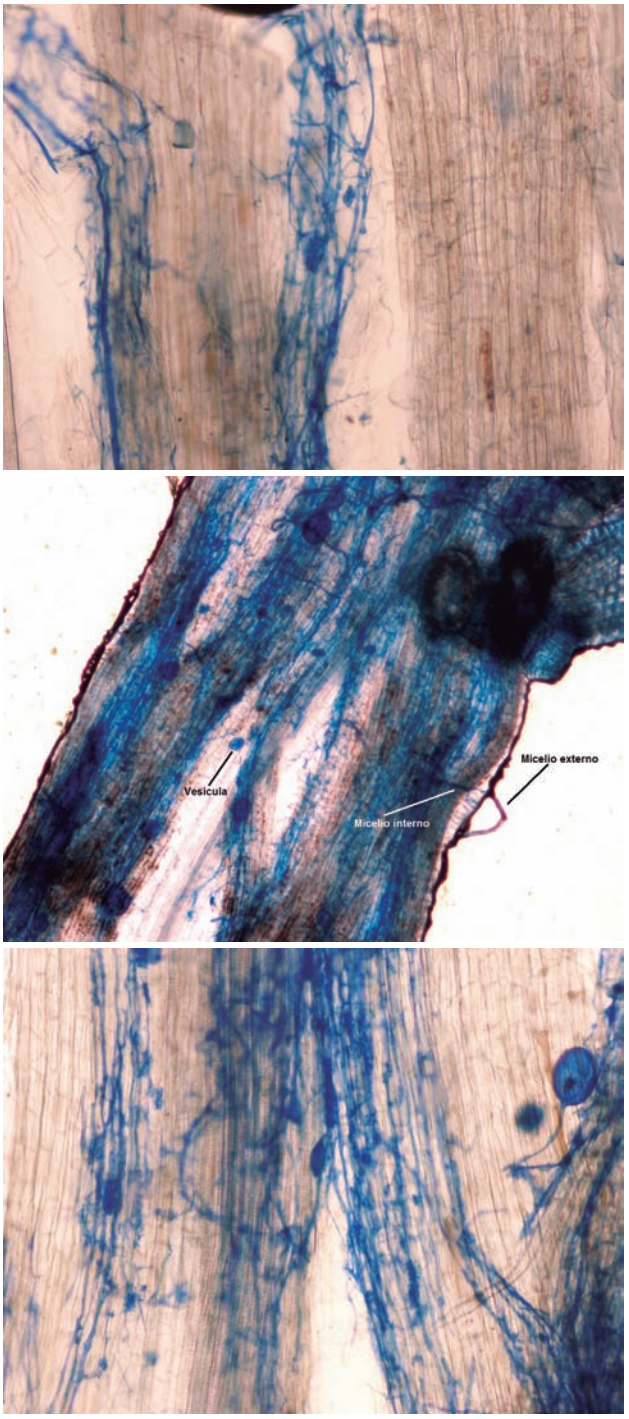


Figura 2c. Micelio intra y extraradical de HFMA en raíces de plántulas de *E. guineensis* y el híbrido OxG. Fotos: Rivera, Y.; Caicedo, A. 2013.

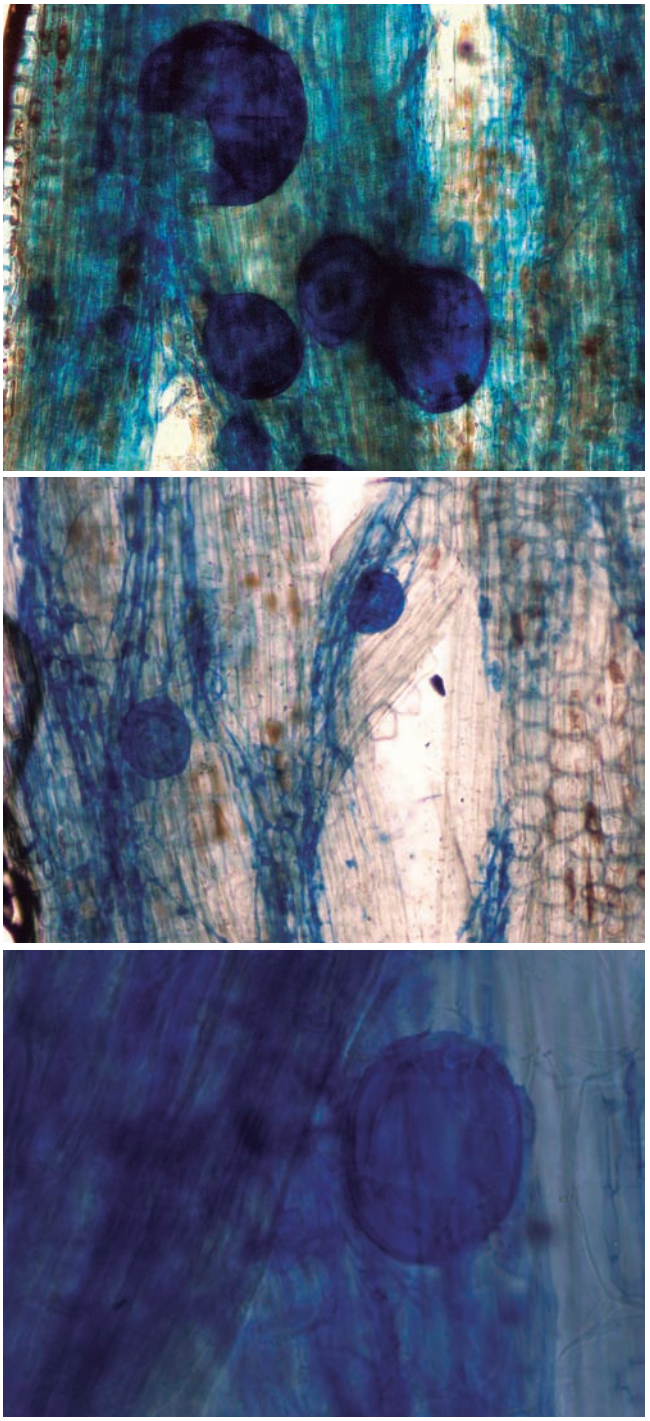


Figura 2d. Esporas de HFMA en raíces de plántulas de *E. guineensis* y el híbrido OxG. Fotos: Rivera, Y.; Caicedo, A. 2013.

El proceso de colonización inicia cuando el hongo hace contacto con la raíz del hospedero y desarrolla una estructura llamada apresorio por donde las hifas penetran a las células corticales de la raíz para formar los arbúsculos e incrementar el área de contacto entre la planta y el hongo. Cuando esto ocurre, la planta no inicia los cambios fisiológicos y bioquímicos que usualmente suceden cuando un microorganismo del suelo la invade, de manera que el hongo emite señales que la planta reconoce para no iniciar una reacción de defensa, y más bien libera compuestos de naturaleza volátil o difusible (exudados) que estimulan el crecimiento de la hifa en diferentes puntos de la colonización (Gadkar *et al.*, 2001). Morfológicamente existen dos tipos de colonización (Barrer, 2009), el tipo *Arum*, donde las hifas crecen intercelularmente y los arbúsculos se encuentran dentro de las células corticales de la raíz, y el tipo *Paris*, en el cual las hifas y los arbúsculos presentan crecimiento intracelular con enrollamientos (Figura 3).

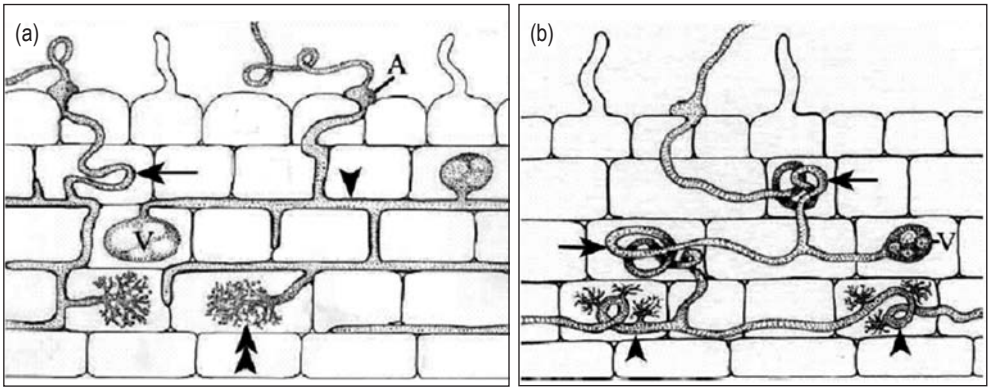
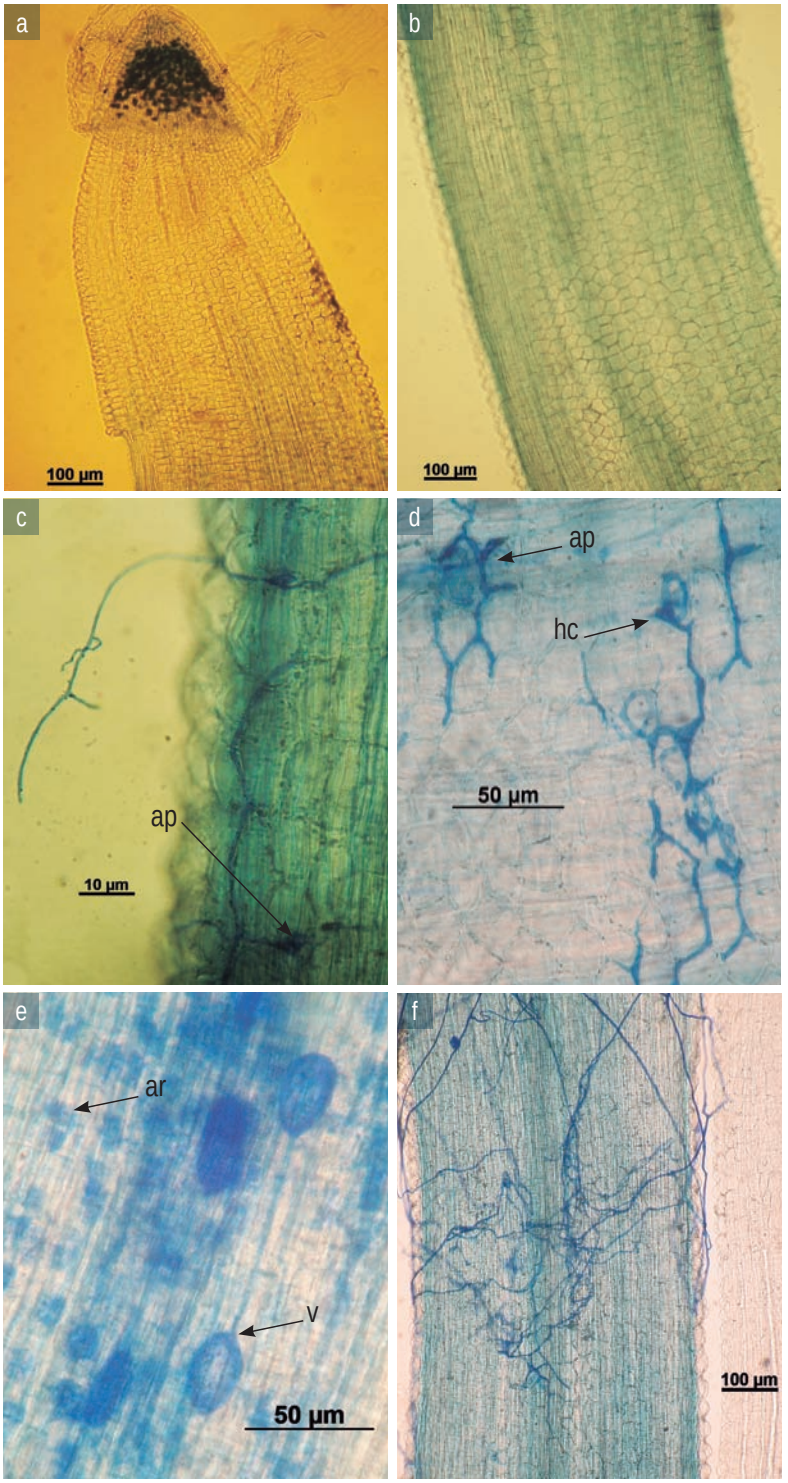


Figura 3. Tipos de asociación micorrízica arbuscular. (a) Tipo *Arum*, (b) Tipo *Paris*. (V) vesículas, (A) apresorio, (Flechas) hifas, (Doble flecha) arbúsculos. (Tomado de Barrer, 2009).

Siguiendo el protocolo de laboratorio para clareo, blanqueo, tinción de raíces e identificación de estructuras de HFMA (Anexo 1), Galindo y Romero (2012), documentaron el proceso de colonización de HFMA en raíces de *Elaeis guineensis* y del híbrido interespecífico OxG (*E. oleífera x E. guineensis*) en etapa de previvero (Figuras 4 y 5 respectivamente). Para ello se comparó el avance del proceso de micorrización en plántulas inoculadas y no inoculadas con *Glomus intraradices* en suelo esterilizado y no esterilizado y, encontraron que aunque las plantas no son micotróficas obligadas (pueden crecer sin micorrizas); en las plantas inoculadas, la colonización radical se inició un mes después de siembra (mds) en previvero y al final de ésta etapa (3 mds), arbúsculos, redes hifales y vesículas ya estaban establecidas, especialmente en plántulas de *E. guineensis*.


a
100 µm
b
100 µm
c
ap
10 µm
d
ap
hc
50 µm
e
ar
v
50 µm
f
100 µm

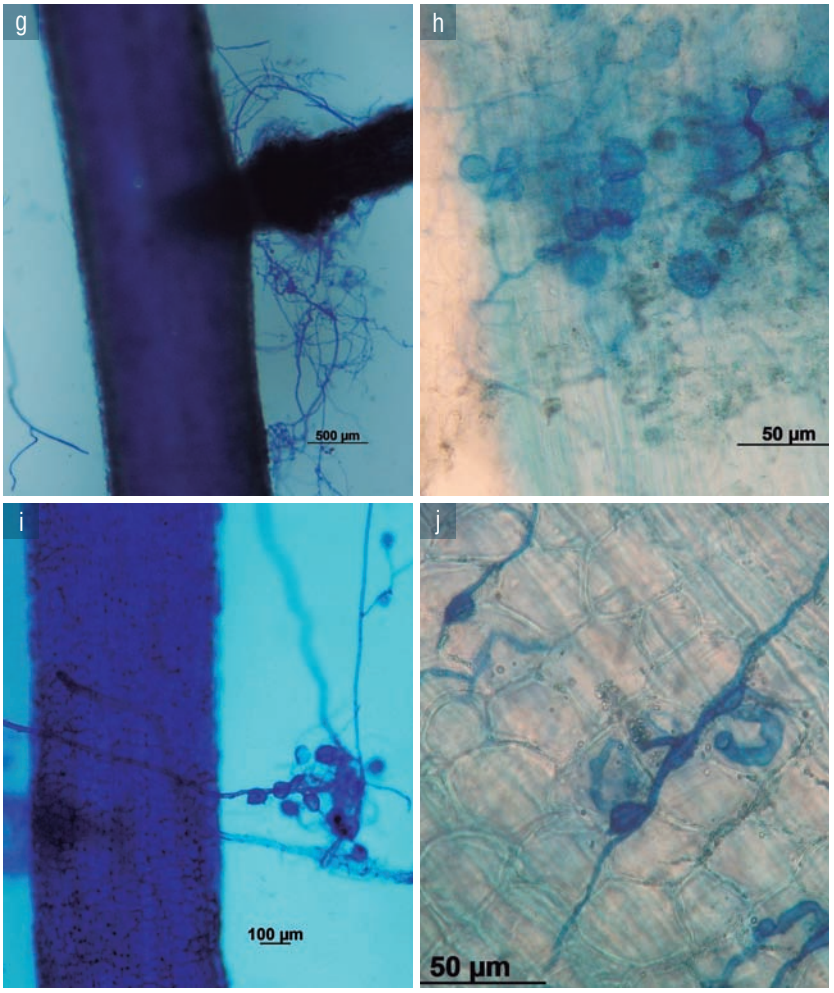
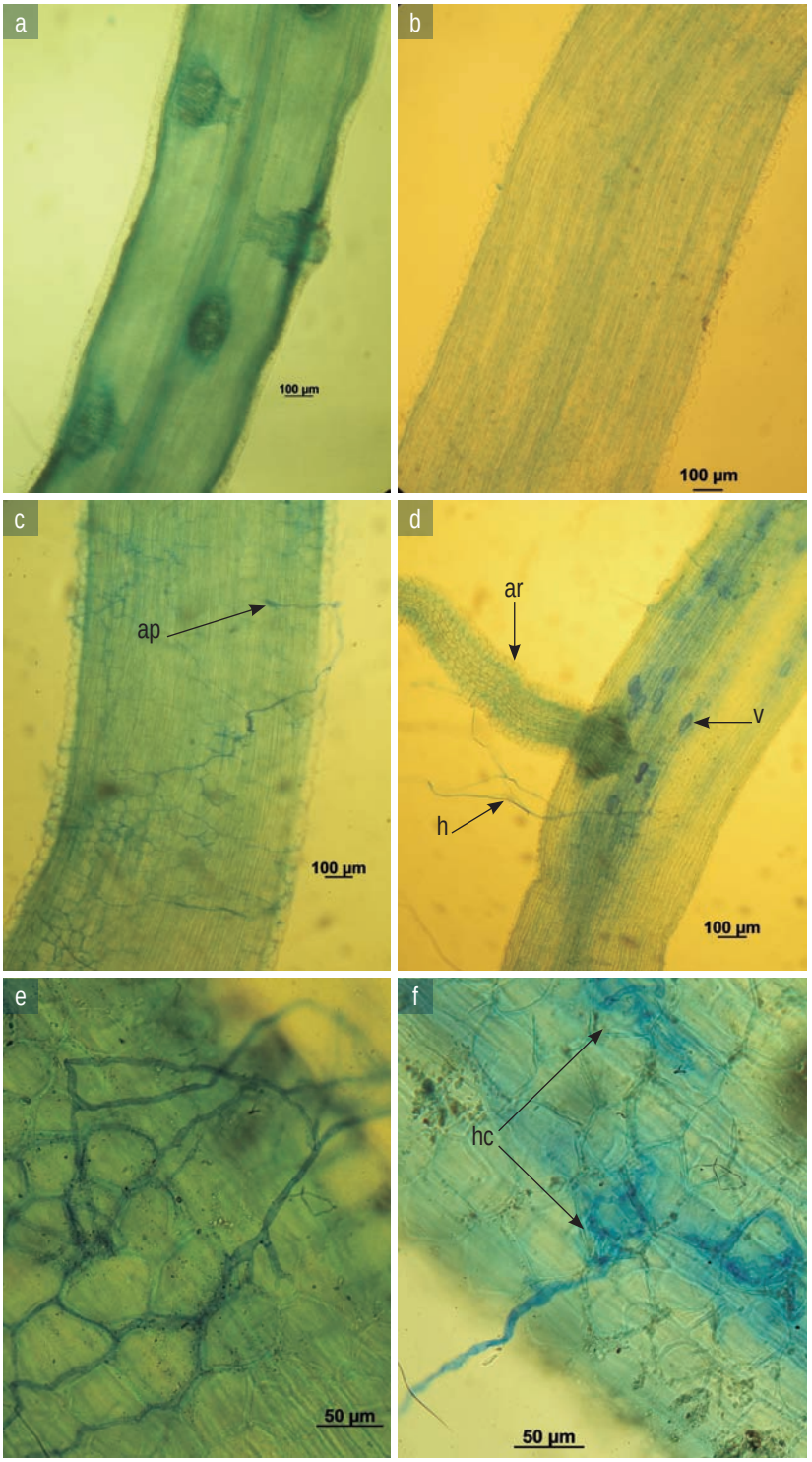


Figura 4. Proceso de micorrización en plántulas de *E. guineensis* durante los primeros meses de crecimiento en previvero. a, b, c: Raíces un mes después de la siembra en previvero (mds). d, e: Raíces dos mds. f, g, h, i: Raíces tres mds. a. Meristemo apical de raíz terciaria sin puntos de colonización. b. Raíz terciaria sin puntos de colonización. c. Inicio de la colonización, se presentan redes de hifas intramatricales. d. Producción de arbúsculos, e. Propios de morfología tipo *Arum.* f. Hifas extrarradicales cubren raíz terciaria. g. Raíz secundaria y terciaria cubiertas por red de hifas extrarradicales. h. Esporas intramatricales en raíz terciaria. i. Esporas extrarradicales rodeando una raíz terciaria. j. Formación de micorrizas de morfología tipo *Paris.* Vesícula (v). Arbúsculo (ar). Apresorio (ap). Entorchamiento hifal (hc). (Fotos: Galindo, T. 2009).


a
100 µm
b
100 µm
c
ap
100 µm
d
ar
v
h
100 µm
e
50 µm
f
hc
50 µm

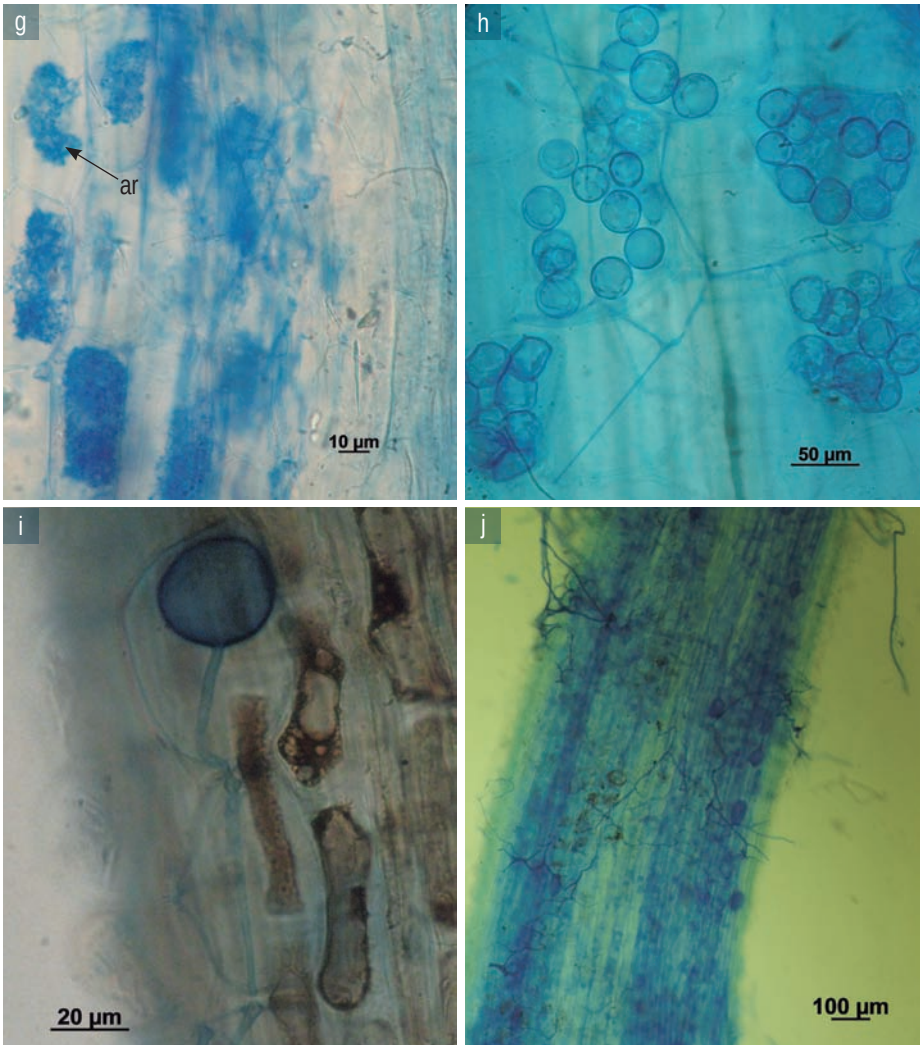


Figura 5. Proceso de micorrización en plántulas de híbrido OxG durante los primeros meses de crecimiento en previvero. a, b, c. Raíces terciarias un mds. d, e, f. Raíces dos mds. g, h, i. Raíces cuatro mds. a. Raíz lignificada. b. Raíz no lignificada sin puntos de colonización. c. Raíz con inicio de puntos de colonización. d. Raíz terciaria micorrizada. e. Redes de hifas intramatricales en la corteza. f. Entorchamientos hifales propios de la morfología tipo *Paris.* G. Arbúsculos tipo *Arum.* h, i. Esporas intramatricales. j. Raíz terciaria completamente micorrizada. Apresorio (ap). Arbúsculo (ar). Vesícula (v). Hifas extrarradicales (he). Raíz cuaternaria (qr). Entorchamiento hifal (hc). (Fotos: Galindo, T. 2009).

Uso de inóculos micorrizógenos en palma de aceite

El conocimiento a nivel mundial sobre la simbiosis HFMA - palma de aceite no es amplio y los principales avances de investigación en el ámbito nacional e internacional se relacionan con el efecto que estos microorganismos tienen sobre la resistencia

a algunas enfermedades y el crecimiento vegetativo del cultivo. Respecto al primero, Hashim (2004) a fin de determinar el efecto de los HFMA sobre la diseminación u ocurrencia de la Pudrición basal del estípite (PBE) causada por *Ganoderma boninense*, inoculó plántulas de *E. guineensis* con cepas de HFMA y/o del patógeno y meses después registró la evolución de la enfermedad y el crecimiento radical. Encontró que las plántulas micorrizadas presentaron mayor resistencia a la PBE entendida como una prolongación del período de incubación y por tanto, un retardo en la aparición de los síntomas de la enfermedad como necrosis foliar y radical, y muerte (el 100 % de las palmas no micorrizadas sucumbieron a la enfermedad), así como también mayor crecimiento, contenido de lignina y calcio en las raíces.

Esto fue corroborado por Bakhtiar *et al.* (2012), quiénes al evaluar la eficacia y compatibilidad de la coinoculación de esporas de HFMA y una bacteria endosimbionte micorrízica (*Bacillus subtilis*) en plántulas de palma de aceite bajo la presencia de *G. boninense*, registraron que la coinoculación no sólo redujo el porcentaje de incidencia de la PBE sino también aumentó significativamente la altura de la planta y la absorción de fósforo, lo que sugiere que *B. subtilis* trabajó en sinergia con los HFMA en el aumento de la adaptación de las plantas al estrés causado por *G. boninense*, y podrían convertirse en agentes de control biológico.

En cuanto a adaptación y crecimiento estimulado por los HFMA, Schultz (2001), reporta que plántulas de *E. guineensis* propagadas *in vitro* e inoculadas con (12) aislamientos de HFMA mostraron un aumento en la supervivencia durante la etapa de endurecimiento (entre el 83 y 100 %), mayor crecimiento tanto radical como de la parte aérea, y un incremento en la toma de fósforo, siendo las especies más eficientes *Glomus manihotis*, *Entrophospora colombiana*, *Acaulospora mellea* y *Acaulospora appendicula*.

En etapa de previvero, Galindo y Romero (2013) señalan que la inoculación con esporas de *Glomus intraradices* incrementó el peso seco de las plántulas de *E. guineensis* y del híbrido OxG, y Rivera *et. al* (2013), indican que la inoculación de esporas de diferentes especies de HFMA (poliinóculo) y no de una sola especie (inóculo monoespecífico) aumentó significativamente la altura, el área foliar y el peso seco total de las plántulas del híbrido OxG, y el tamaño de la superficie fotosintética de las plántulas de *E. guineensis*, lo que sugiere que la inoculación con HFMA cuando se inicia el crecimiento radical podría incrementar potencialmente el vigor de las plántulas trasplantadas al vivero.

Por su parte, Motta y Munévar (2005), encontraron que la inoculación de esporas de *Gigaspora* sp. y *Glomus* sp., estimuló el crecimiento de plantas de *E. guineensis*

en términos de número de hojas, altura, circunferencia de estípite y acumulación de materia seca, e incrementó los contenidos de N, P, K, B y Cu, principalmente al finalizar la etapa de vivero (al cabo de 570 días). Además, confirmaron el establecimiento de la colonización desde el inicio del previvero, incluso en los ensayos no inoculados debido a la presencia de HFMA nativos y el alto nivel de fósforo disponible en el suelo. Finalmente, Cenipalma (1995) en un estudio en palma adulta, encontró diez años después de haber inoculado las plantas al momento del trasplante a sitio definitivo con HFMA, que una mayor simbiosis HFMA-palma, principalmente con los géneros Glomus y Acaulospora no tuvo efecto sobre la incidencia de la Pudrición del cogollo (PC), la longitud del raquis y el área foliar, pero si sobre el área foliar específica y la producción en términos de número y peso de racimos debido posiblemente al aumento en la captación de fósforo y otros nutrimentos.

Así, la mayoría de estudios coinciden en que la aplicación de la tecnología de los HFMA en el cultivo de palma de aceite es una opción que podría beneficiar tanto a la palma agronómicamente como la salud de su ecosistema, ya que la inoculación con HFMA en etapas tempranas de crecimiento incrementa el vigor de las plántulas trasplantadas al vivero (Galindo y Romero, 2012), disminuye considerablemente el tiempo en ésta etapa (Hashim, 2004), y favorece el funcionamiento sostenible del ecosistema palmero al reducir el impacto ambiental por sustitución en el uso de fertilizantes químicos (Phosri *et al.*, 2010). Por ello, resulta imprescindible enriquecer la investigación relacionada con ésta simbiosis, y Cenipalma convoca a los departamentos de I+D y/o producción de bioinsumos de las plantaciones a iniciar experiencias conjuntas. Una aproximación inicial podría ser la obtención de biofertilizantes a partir de HFMA aislados de los propios suelos y efectivos para uso en el vivero, como se indica en el siguiente capítulo.

Segunda parte

Foto: Rivera, Y. 2013.

Producción de inóculo a partir de esporas de HFMA

Producción de inóculo a partir de esporas de HFMA

A continuación se definen y caracterizan las especies de HFMA más efectivas para estimular el crecimiento y desarrollo de la palma de aceite y mejor adaptadas a las condiciones ambientales de este sistema productivo, así como también el procedimiento para obtener un inóculo con estas especies.

HFMA efectivos para la palma de aceite

Como se mostró en el capítulo anterior, los HFMA hacen parte de la biota nativa de cualquier suelo y la simbiosis con palma de aceite se forma de manera espontánea, sin embargo, en diversas circunstancias las poblaciones de los hongos son muy bajas o están constituidas por especies o cepas de limitada eficiencia en su papel simbiótico, lo que hace conveniente inocular la planta huésped para promover su micorrización (Motta y Munévar, 2005). Por ser un cultivo perenne, la aplicación de HFMA en palma de aceite bajo condiciones de campo está restringida a pequeñas áreas por la dificultad para producir grandes volúmenes de inóculo (Sieverding, 1983), de manera que el uso comercial de inóculos portadores de HFMA en los viveros resulta la alternativa más adecuada. Así, en cuanto al inóculo ideal como biofertilizante para palma de aceite, Motta y Munévar (2005) señalan que hongos de los géneros Glomus. Acaulospora, Gigaspora y Entrophospora se han encontrado asociados a palmas micorrizadas; sin embargo, a nivel de género estos hongos difieren enormemente en su biología y eficiencia en la promoción de crecimiento del cultivo, por lo que Schultz (2001) en un estudio con especies de HFMA (y no con géneros) determinó que las más eficientes en cuanto a estimulación del crecimiento y toma de fósforo fueron *Glomus manihotis*, *Glomus occultum*, *Entrophospora colombiana*, *Acaulospora mellea* y *Acaulospora appendicula*, especies que Howeler *et al.*, (1987), reportan como efectivas en términos económicos y biológicos al estar mejor adaptadas a las condiciones limitantes del trópico e incrementar el desarrollo de cultivos (Tabla 1).

Tabla 1. Efectividad de algunos aislamientos de HFMA en cultivos tropicales. 0: No efectivo; x: Efectividad baja; xx: Efectividad media; xxx: Efectividad alta (Howeler *et al.*, 1987). Se resaltan los más efectivos para palma de aceite según Schultz (2001).

# Aislamiento CIAT	Especie de HFMA	Efectividad para			
		Producción de masa seca	Toma de fósforo	Longitud radical	% Colonización radical
C-85	***A. appendicula***	**xxx**	**xxx**	**xxx**	**xx**
C-90-1	*A. appendicula*	0	xx	x	x
C-3-15	*A. laevis*	x	xx	0	xxx
C-86-2	*A. laevis*	xxx	xxx	xx	xxx
C-12-1	*A. longula*	xxx	xxx	xxx	x
C-13-6	*A. longula*	xxx	xxx	xxx	xxx
C-15-2	***A. mellea***	**xx**	**xx**	**xxx**	**xx**
C-93-1	*A. mellea*	0	0	0	x
C-3-12	*A. morrowae*	0	0	0	x
C-89-3	*A. morrowae*	0	0	0	xx
C-3-4	*A. myriocarpa*	xxx	xxx	xxx	xx
C-17-3	*A. myriocarpa*	xxx	xxx	x	xxx
C-10	***E. colombiana***	**xxx**	**xxx**	**-**	**x**
C-90-2	***E. colombiana***	**xx**	**xx**	**xxx**	**x**
C-1-1	***G. manihotis***	**xxx**	**xxx**	**xx**	**xxx**
C-3-10	***G. manihotis***	**xxx**	**xxx**	**xx**	**xxx**
C-3-2	***G. occultum***	**xxx**	**xxx**	**xxx**	**x**
C-13-8	***G. occultum***	**xx**	**xx**	**xxx**	**xx**
C-9	*Gi. heterogama*	0	0	0	0
C-89-1	*Gi. pellucida*	x	xx	x	x
C-13-3/4	*Glomus sp.*	xxx	xxx	x	xxx
C-105	*Glomus sp.*	xxx	xx	xx	xx

Obtención de un inóculo efectivo de HFMA

Inicialmente, se debe hacer la extracción de esporas de HFMA a partir de suelo palmero o productos comerciales micorrizógenos, luego, se deben identificar y seleccionar las más efectivas y, finalmente, multiplicarlas hasta obtener el biofertilizante o abono biológico. Para ello, el Laboratorio de Microbiología del Suelo de Cenipalma con base en su experiencia en el establecimiento y mantenimiento del banco de HFMA y las recomendaciones de Sieverding (1983), estandarizó los siguientes protocolos que le permitirán a cualquier usuario con el apoyo del mismo laboratorio y los materiales indicados obtener inóculos de HFMA.

Protocolo 1: Extracción e identificación de esporas de HFMA

- Método: (i) Extracción de esporas de HFMA por centrifugación y gradiente de sacarosa, propuesto por Sieverding (1983); (ii) Identificación de esporas de HFMA por análisis morfológico, según las claves taxonómicas propuestas por la Colección Internacional de Cultivos de HFMA de la Universidad de Davis, EEUU (INVAM por sus siglas en inglés) o el conocimiento de un experto dedicado a esta labor.

- Fundamento: la identificación de especies de HFMA está basada principalmente en las características morfológicas de las esporas fenotípicamente estables independiente de las condiciones ambientales y de la planta huésped (Morton *et al*., 1995), y fácilmente observables al estereoscopio y/o microscopio como tamaño, forma, color, presencia de hifas, células auxiliares, sáculo esporífero u ornamentaciones sobre la pared de la espora, número y grosor de las paredes; otras estructuras como micelio interno y externo durante la asociación micorrízica no permiten distinguir la morfología ni entre especies del mismo género ni entre géneros (INVAM, 2013).

- Materiales y reactivos: muestra de suelo o producto micorrizógeno; embudo, juego de tamices de 710 µm y 45 µm de abertura de malla, tubos para centrifuga, jeringa adaptada con tubo delgado acoplado en la punta, cajas *Petri*, vidrios de reloj, agujas y micropipetas para su extracción, láminas portaobjetos y cubreobjetos, agujas y micropipetas; licuadora, centrifuga, estereoscopio, microscopio compuesto; agua destilada, solución de sacarosa al 70 %, solución de PVLG (100 ml de agua destilada +100 ml de ácido láctico + 10 ml de glicerol + 16.6 g de alcohol polivinílico).

- Procedimiento: la extracción e identificación de esporas se lleva a cabo de la siguiente manera:

    - Tomar una muestra de suelo rizosférico. Ésta suele ser compuesta, tomando submuestras con una cantidad representativa de raíces, en cada punto cardinal de la palma. Se deben registrar las variables químicas que determinan la distribución de los HFMA en el suelo: contenido de materia orgánica, concentración de fósforo y pH. También pueden evaluarse 10 g de producto comercial micorrizógeno.

    - Mezclar la muestra en una licuadora con 250 ml de agua destilada durante 30 segundos. Esto con el fin de romper restos radicales y así liberar las esporas unidas a las raíces o al suelo.

- Tamizar la solución a través de dos tamices: inicialmente por el tamiz superior de 710 µm para capturar restos de raíces y materia orgánica, y finalmente por el tamiz de 45 µm para capturar las esporas de los HFMA.
- Recuperar el material retenido en el tamiz de 45 µm, llevándolo con ayuda de un embudo y agua destilada a un tubo de centrífuga de 50 ml.
- Dejar decantar y eliminar el material sobrenadante.
- Adicionar 15 ml de agua destilada y 15 ml de solución sacarosa al 70 %.
- Centrifugar la solución durante tres minutos a 2.500 rpm. Como consecuencia de esto se obtiene la sedimentación de las partículas del suelo o producto en el fondo del tubo, mientras las esporas se ubican en la capa intermedia (gradiente de sacarosa).
- Extraer las esporas con una jeringa adaptada para ello: verter el contenido sobre un tamiz de 45 µm, eliminar la sacarosa con abundante agua y depositar las esporas en una caja *Petri*.
- Realizar los recuentos en el estereoscopio y determinar la densidad de esporas por gramo de muestra. En este momento las esporas se separan por las características morfológicas (color, tamaño y forma) que la puedan diferenciar de otra, es decir por morfotipos.
- Depositar una gota de PVLG en una lámina porta objetos, y en el centro de ésta adicionar algunas gotas con las esporas de HFMA aisladas usando una aguja o una micropipeta.
- Colocar suavemente una lámina cubre objetos sobre la gota de PVLG evitando que las esporas se deslicen hacia los bordes y queden por fuera de la zona de observación.
- Observar al microscopio compuesto, describir el género y, si es posible, la especie.
- Identificar las especies de HFMA con base en las características fácilmente observables al microscopio como tamaño, forma, color, ornamentaciones, número y grosor de las paredes, etc. Una guía para ello, lo constituye la siguiente descripción morfológica de las esporas de algunas especies de HFMA encontradas en suelos palmeros de las Zonas Central y Oriental de producción, junto con su clasificación taxonómica tanto clásica (Oehl *et al.*, 2011) como actual (INVAM, 2013). En caso de incertidumbre o de encontrar un morfotipo diferente se debe consultar la página del INVAM o a un taxónomo experto para su correcta identificación.

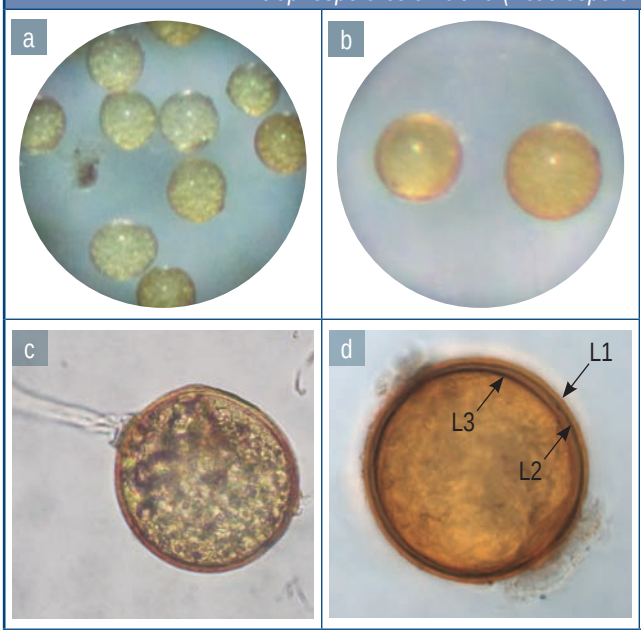
Especie de HFMA	Características fenotípicas
Entrophospora colombiana (Acaulospora colombiana)	
	**Color:** naranja a naranja-marrón oscuro. Las esporas maduras son mucho más opacas que las inmaduras. **Forma:** globosa a subglobosa. **Tamaño:** 100-140 µm, media = 121 µm. **Paredes de la espora:** posee tres, la más externa es membranosa, transparente, de menos de 1 µm de espesor; la segunda es laminada, de 2 a 4 µm de espesor, de color amarillo; y la más interna es transparente. Forma una cicatriz por la conexión entre la hifa y el sáculo

Figura 6. Apariencia de la espora de *E. colombiana* (*A. colombiana*), observada (a), (b) al estereoscopio, y (c), (d) al microscopio. Fotos: Rivera, Y. 2013.

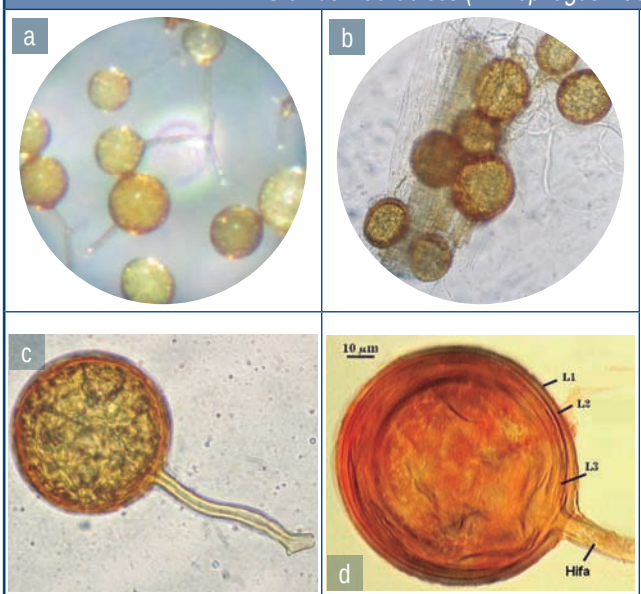
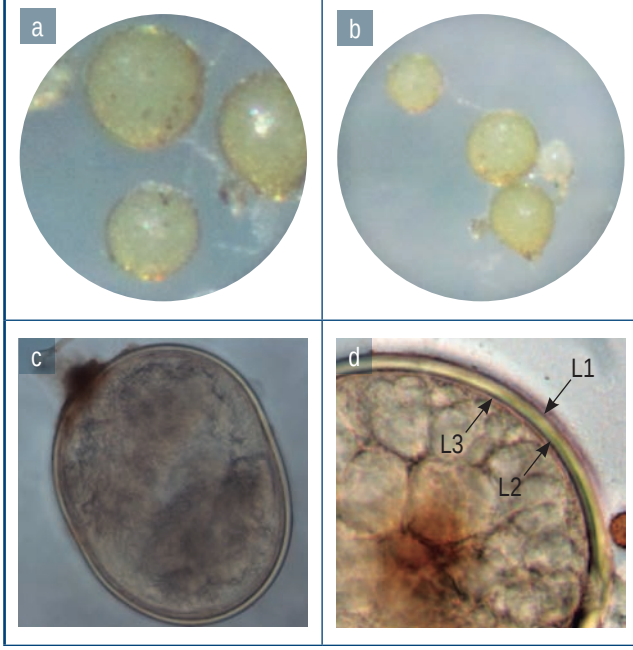
Glomus intraradices (Rhizophagus intraradices)	
	**Color:** blanco, crema pálido a marrón-amarillo, a veces con un tinte verde. **Forma:** globoso, sub globoso, irregular, con muchas esporas elípticas (extraídas especialmente de raíces micorrizadas). **Tamaño:** 40-140 µm, media = 93,3 µm. **Pared de la espora:** presenta tres (L1, L2 y L3), las dos primeras son mucilaginosas y tienden a degradarse al madurar. La conexión hifal es recta, de 6 a 10 µm de ancho, de color amarillo traslúcido, más clara que la espora.

Figura 7. Apariencia de la espora de *G. intraradices* (*R. intraradices*), observada (a) al estereoscopio, y (b) - (d) al microscopio. (Colección fotográfica (a) – (c) Cenipalma. Y. Rivera, 2013; (d) http://invam.wvu.edu/).

Glomus manihotis (Rhizophagus manihotis)



Color: blanco a amarillo o marrón pálido.

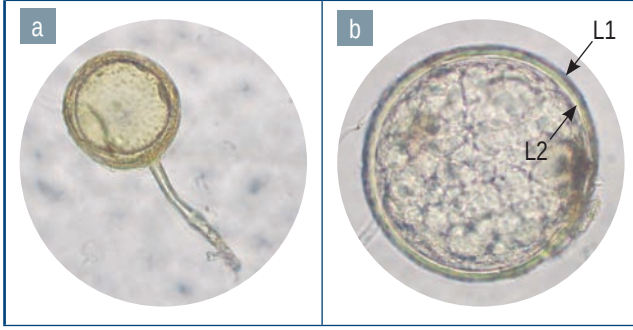
Forma: globoso, a veces elípticas, oblongas o irregulares.

Tamaño: 100-260 µm, media = 182 µm

Pared de la espora: compuesta por tres capas (L1, L2 y L3) adheridas, pero a menudo L3 que es mucilaginosa puede o no estar presente. Éstas forman un halo brillante y bien definido que sirve de carácter de diferenciación al observar las esporas al microscopio.

Figura 8. Apariencia de la espora de *G. manihotis* (*R. manihotis*), observada (a), (b) al estereoscopio, y (c), (d) al microscopio. Fotos: Caicedo, A. 2013.

Glomus etunicatum (Claroideoglomus etunicatum)



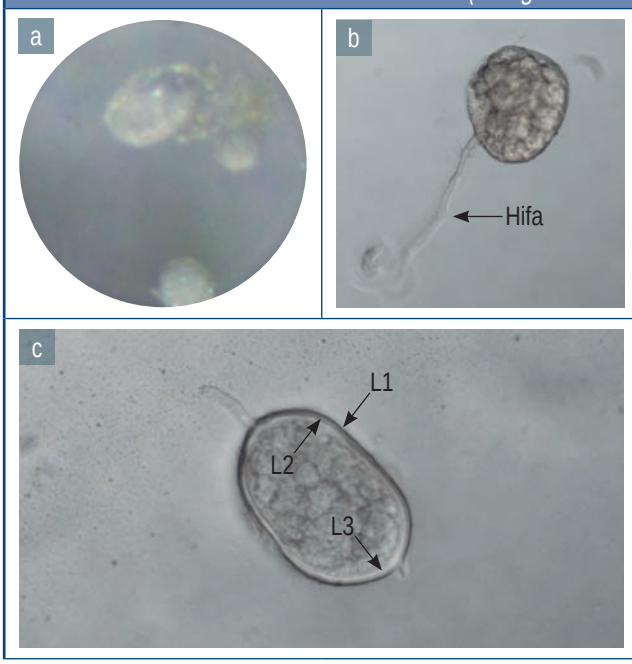
Color y forma: naranja a rojo marrón; globosa, subglobosa.

Tamaño: 60-160 µm, media = 129 µm.

Pared de la espora: conformada por dos capas (L1 y L2) que forman un halo de color naranja-marrón a un rojo-marrón.

Figura 9. Apariencia de la espora de *G. etunicatum* (*C. etunicatum*), observada (a) al estereoscopio, y (b) al microscopio. Fotos: Rivera, Y. 2013.

Glomus occultum (Paraglomus occultum)



Es muy abundante en suelos ácidos.

Color y forma: hialino a crema pálido; globosa, a menudo ligeramente irregular.

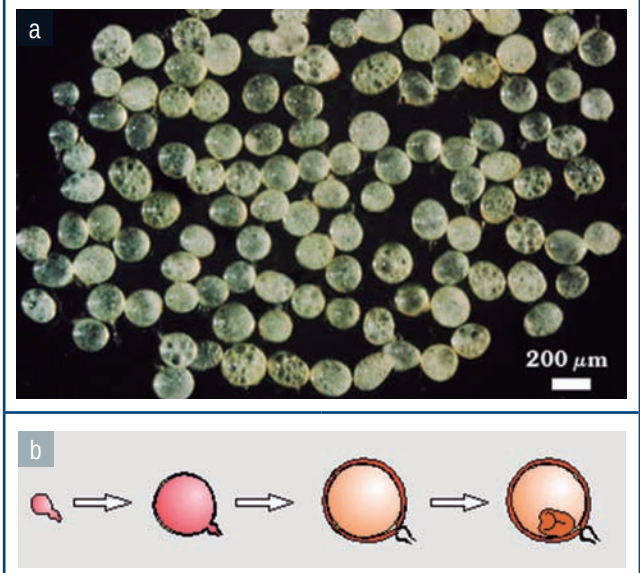
Tamaño: 60-100 µm, media 71,5 µm.

El contenido citoplasmático es fragmentado, semejando cristales

Pared de la espora: consta de tres capas (L1, L2 y L3), las dos últimas son permanentes mientras que L1 es desprendible. Por lo general las esporas conservan la hifa.

Figura 10. Apariencia de la espora de *G. occultum (P. occultum)*, observada (a) al estereoscopio, y (b), (c) al microscopio. Fotos: Caicedo, A. 2013.

Scutellospora spp.



Requieren raíces para reproducirse.

Son especies de lenta colonización y de efectividad intermedia.

Las esporas se desarrollan de un extremo de las hifas que se hinchan y convierten en la célula esporogénica. Una vez alcanza su tamaño completo (25-50 µm en la mayoría de las especies), la espora empieza a desarrollarse: dos capas la componen y el escudo germinativo característico de este género.

Figura 11. Apariencia de la espora del género Scutellospora, (a) Observación al microscopio, (b) Esquema del desarrollo de la espora (Fuente: http://invam.wvu.edu/).

Protocolo 2: Producción de inóculo a partir de esporas de HFMA

- Método: producción de inóculo de HFMA en plantas trampa
- Fundamento: este sistema permite bajo condiciones controladas aumentar la cantidad de esporas sanas de los HFMA nativos colectados en suelos palmeros, y establecer así cultivos monoespecíficos o mezclas de especies con altos valores de efectividad para la aplicación en plántulas de palma de aceite. Para ello, emplea sustratos estériles y plantas micotróficas (que no pueden vivir sin HFMA) o plantas trampa, adaptadas a las condiciones ambientales donde los HFMA serán cultivados, compatibles con un amplio rango de HFMA, perennes, de fácil manejo, tolerantes a podas y resistentes a problemas abióticos (Salas y Blanco, 2000).
- Materiales: esporas de las especies de HFMA seleccionadas, semillas de pasto Brachiaria (*Brachiaria decumbens*) y/o Kudzú (*Pueraria phaseoloides*); tubos Eppendorf de 2 ml, vasos de *icopor* o plástico, materas de 5 kg de capacidad, tamiz de 1 cm de apertura de malla; estereoscópico, microscopio, refrigerador, autoclave; camas o eras de siembra, arena y suelo estéril.
- Procedimiento: la producción de inóculo de HFMA incluye la selección y multiplicación de las esporas de la siguiente manera (Figura 12):
    - Seleccionar las especies a multiplicar. Se debe tener en cuenta la efectividad de algunas especies de HFMA para estimular el crecimiento y la toma de fósforo en palma de aceite (Tabla 1).
    - Disponer las esporas seleccionadas sobre arena estéril contenida en tubos Eppendorf de 2 ml. A partir de cada uno se inicia un cultivo monoespecífico que será multiplicado y empleado como fuente de inóculo para los cultivos trampa.
    - Tomar entre 25 a 50 esporas contenidas en el tubo Eppendorf, colocarlas a 2 o 3 cm de la superficie de un vaso de *icopor* o plástico con 200 g de suelo estéril, cuyas condiciones químicas correspondan con las del suelo original, y sembrar las semillas de pasto Brachiaria y/o Kudzú que servirán como cultivos trampa. Se recomienda realizar como mínimo diez repeticiones de cada inoculación.
    - Mantener el riego constante (a capacidad de campo), a fin de incrementar el inóculo presente en las muestras originales.
    - Desde los tres a cinco meses, hacer la evaluación de colonización y control de pureza de la inoculación tomando una muestra de suelo con raíces para

separar las esporas, y observar al estereoscópico y microscopio si la especie seleccionada se ha multiplicado.

- Una vez confirmada la presencia de una sola especie, tomar el contenido de cada recipiente y mezclarlo con el mismo sustrato estéril utilizado al inicio del establecimiento, en materas de mayor capacidad (generalmente de 5 kg) para repetir el proceso e incrementar el inóculo. La fertilización debe ser mínima para no inhibir el desarrollo de los HFMA (Salas y Blanco, 2000). Cuando las plantas muestren signos de deficiencias de nutrimentos, Sieverding (1991) recomienda aplicar fertilización N – P – K – Mg en una dosis 50 – 25 – 50 – 10.
- Escalar el procedimiento anterior, disponiendo 1 kg de suelo con inóculo de HFMA en canecas de 20 litros de capacidad, o eras sembradas con Brachiaria y/o Kudzú, cuyas dimensiones deben ser [80-120 cm] x [30 cm] (equivalente a la efectividad radical de los cultivos trampa) x [largo variable] (según la disposición de espacio que se tenga). Diez días antes de la siembra, el sustrato puede ser desinfectado mediante la aplicación e incorporación bajo condiciones de capacidad de campo del producto Basamid® en una dosis de 60 g / m^2 (Sieverding, 1991).
- Para obtener el inóculo a aplicar en las bolsas de previvero y vivero de palma de aceite, después de tres meses, se dejan de regar las materas hasta que las plantas muestren síntomas de estrés por sequía (2 a 3 semanas), se poda su parte aérea, se cortan las raíces en pequeños fragmentos y se homogeniza el material pasándolo por un tamiz de 1 cm de apertura de malla; éste material se seca al sol hasta que tenga un porcentaje de humedad menor del 5 %, se guarda en bolsas o frascos plásticos a una temperatura entre 8 a 10 ºC y, cuando se requiera, se aplica a las plántulas en una dosis de 100 – 200 esporas/plántula, equivalente a 30 – 50 g producto/plántula.

Las herramientas metodológicas para producir inóculo (de esporas) de HFMA y para evaluar su efectividad son de sencilla aplicación en plantación, ya que no demandan demasiados recursos materiales, financieros, logísticos o de capital humano. Cenipalma mediante el apoyo técnico promoverá la producción de inóculos efectivos para las condiciones particulares de suelos, clima y materiales de palma de aceite que cada plantación posea, que conlleven a reducir la cantidad de fertilizante fosfórico usualmente aplicado y a obtener plantas más vigorosas y en menor tiempo en la etapa de vivero. Beneficios que en el mediano plazo, podrían potencializarse si además se emplean cepas de Microorganismos Solubilizadores de Fósforo (MSF) afines y complementarios de la actividad de los HFMA en la rizósfera de palma de

aceite. La biología y dinámica de estos microorganismos en el cultivo se descubrió al mismo tiempo que se realizaban los estudios de abundancia, distribución y diversidad de HFMA, y los principales resultados se presentan en el siguiente capítulo.

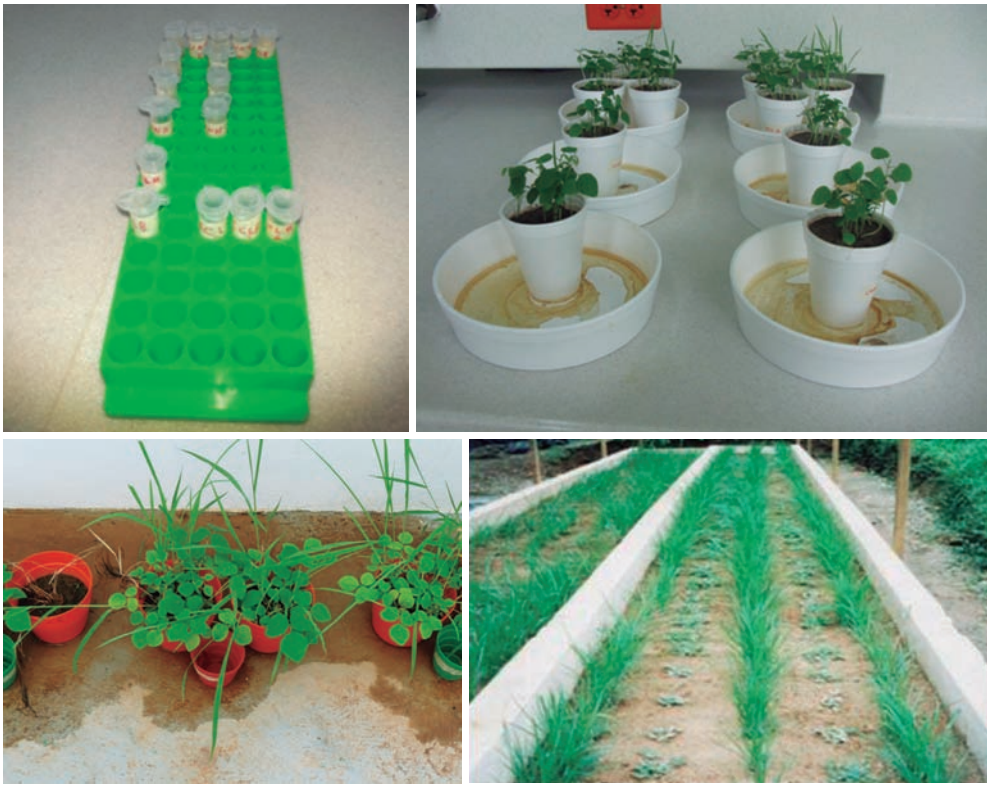


Figura 12. Etapas de la multiplicación del inóculo de HFMA: (a) Tubos Eppendorf que contienen los cultivos monoespecíficos, Plantas trampa de pasto Brachiaria y Kudzú en (b) vasos desechables, y (c) materas de 5 Kg, (d) en eras de multiplicación a gran escala. Fotos: Navia, E. 2013.

Tercera parte

Foto: Prada, F. 2011.

Los HFMA y los Microorganismos Solubilizadores de Fósforo (MSF)

Los HFMA y los Microorganismos Solubilizadores de Fósforo (MSF)

A continuación se describe la dinámica del fósforo en el suelo y cómo este nutriente, mediante la actividad conjunta de los Microorganismos Solubilizadores de Fósforo (MSF) y los HFMA, se vuelve disponible para las plantas. Asimismo, se presentan los principales resultados de investigación en cuanto a biología, actividad y potencial uso como biofertilizante de estos microorganismos en el sistema productivo de palma de aceite.

La interacción HFMA-MSF y su papel en la disponibilidad de fósforo para las plantas

El agroecosistema de la palma de aceite está inmerso en una red de interacciones biológicas complejas y dinámicas, cómo la relación entre la misma planta y las comunidades microbianas del suelo o de estos microorganismos entre sí, que en muchos casos resultan siendo sinérgicas y favorecen el crecimiento de la planta. Un ejemplo de ello, lo constituye la interacción entre los HFMA y los MSF, que le permite a la raíz explorar de forma más extensa el suelo y aprovechar mejor éste elemento de poca movilidad**.** Es decir, tal interacción se convierte en un biofertilizante, que facilita de manera directa e indirecta la disponibilidad de fósforo y estimula así el crecimiento de las palmas.

El fósforo es un importante macronutriente para las plantas, hace parte de moléculas como ácidos nucléicos, fosfolípidos (componente de las membranas celulares), NADP y ATP, está implicado en la división y alargamiento celular (Patiño, 2010), y está involucrado en el control de reacciones enzimáticas y en la regulación de rutas metabólicas, de manera que las plantas no pueden crecer sin un adecuado suministro de este nutriente (Schachtman *et al.*, 1998). Pero, la disponibilidad de fósforo para las plantas en los suelos tropicales es escasa, a pesar de que éstos contienen buenas reservas, por lo que se requiere la aplicación de fertilizantes fosforados para mantener los altos niveles de productividad (Adesemoye y Kloepper, 2009). Esos depósitos son tanto orgánicos como inorgánicos (Schachtman *et al.*, 1998): entre el 20 y 80 % es fósforo orgánico, representado por fitatos, fosfoésteres, fosfodiésteres y fosfotriésteres que deben ser convertidos a formas más simples y disponibles, como los aniones fosfatos (HPO_4^{-2} y $H_2PO_4^{-1}$) cuyas concentraciones en solución se encuentran alrededor de 1-10 µM (Figura 13).

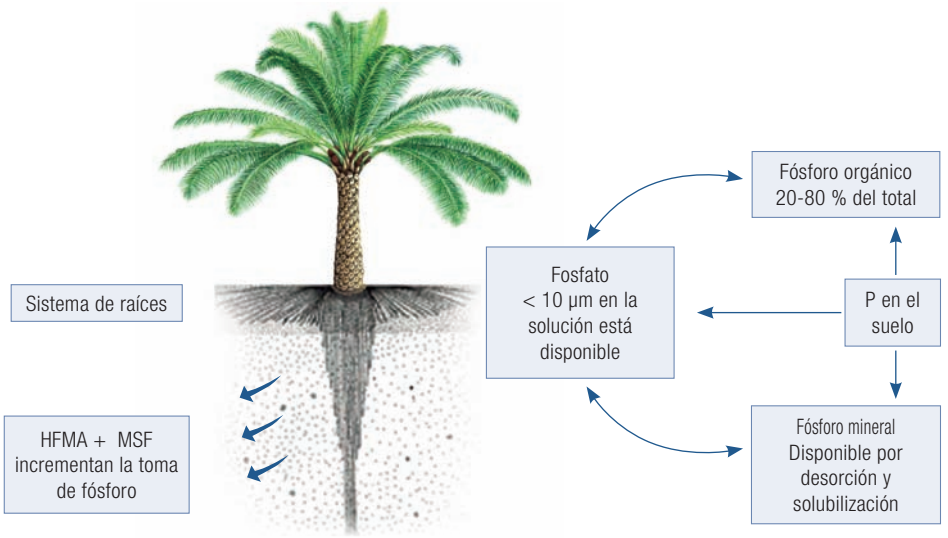


Figura 13. Adquisición del fósforo del suelo por parte de las plantas. (Adaptado de Schachtman *et al.*, 1998).

Por su parte, el fósforo inorgánico se encuentra precipitado o adsorbido formando complejos metálicos con hierro, aluminio y calcio (Figura 14); en suelos ácidos forma fosfatos insolubles de hierro y aluminio, mientras que en suelos con pH básico se fija principalmente mediante fosfatos de calcio, por lo que se encuentra disponible en un rango de pH muy estrecho, entre 6 y 7 (Patiño, 2010).

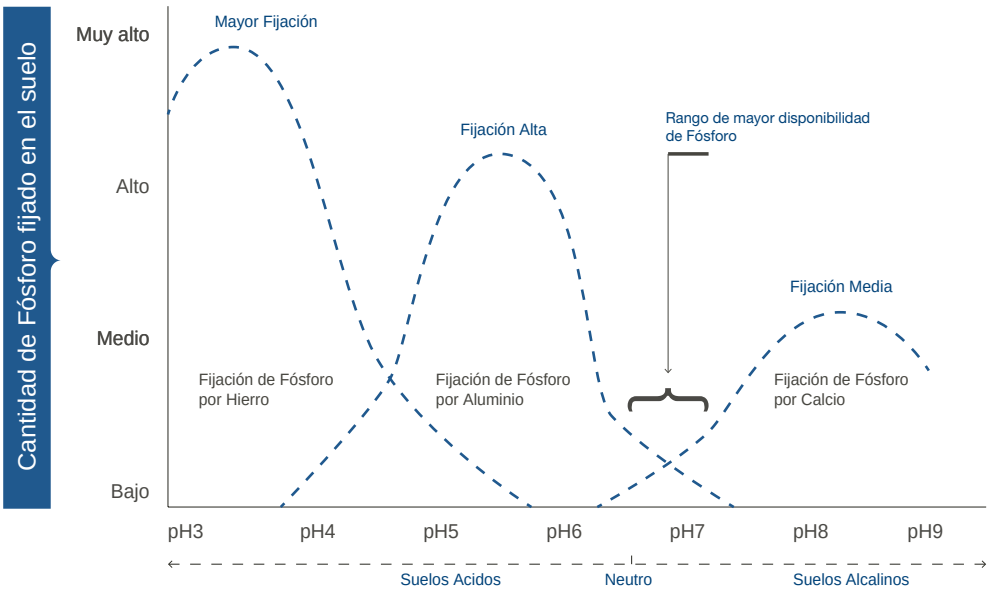


Figura 14. Disponibilidad del fósforo en función del pH del suelo (Adaptado de Stevenson y Cole, 1986).

Así, los MSF incrementan la movilización y disponibilidad de fosfatos mediante la solubilización del fósforo mineral y orgánico. El primero, es un proceso relacionado con la producción de ácidos orgánicos (oxálico, málico, succínico, tartárico, cítrico, glucónico, láctico, etc.) y/o de H^+ al medio durante la asimilación del NH_4^+ (Bashan *et al.*, 2013), protones que liberan a la solución de suelo el fosfato que usualmente está inmovilizado con los cationes Ca^{2+} o Fe^{3+} y Al^{3+} (Figura 15). La solubilización de fósforo orgánico es un proceso dirigido por enzimas: fosfatasas que participan en la desfosforilación de los grupos fosfoéster unidos a la materia orgánica; fitasas, que catalizan el proceso de hidrólisis del ácido fítico liberando de forma secuencial hasta seis grupos ortofosfatos libres y; las fosfonatasas y C-P liasas, que participan en la ruptura del enlace carbono + fósforo de los organofosfonatos. El principal trabajo le corresponde a las fosfatasas ácidas y a las fitasas, debido a la presencia predominante de sus sustratos en el suelo (Fernández y Rodríguez, 2005). Dentro de los géneros de bacterias con potencial solubilizador de fosfato se encuentran las *Pseudomonas, Enterobacter, Bacillus, Proteus, Citrobacter, Klebsiella*, y *Serratia*, y entre los hongos filamentosos, *Aspergillus* y *Penicillium* (Bashan *et al.*, 2013; Fernández y Rodríguez, 2005).

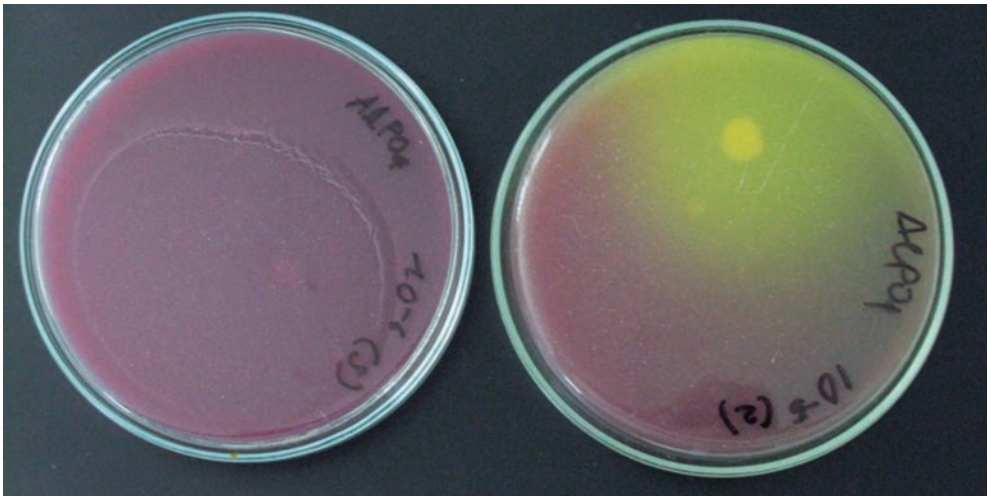


Figura 15. Medios de aislamiento SRS (Sundara Rao) de MSF. A la derecha, colonia que acidifica el medio (posiblemente con ácidos orgánicos) solubilizando el fosfato de aluminio insoluble. Fotos: Galindo, T. 2010.

Los MSF en la rizósfera de la palma de aceite

Una investigación previa realizada en Colombia con este grupo de microorganismos en el cultivo de palma de aceite, indican que la aplicación de productos a base de bacterias solubilizadoras de fosfatos aumenta la actividad de las enzimas fosfatasa

ácida, celulasas, y la concentración de MSF (Galindo y Romero, 2010). Y el más reciente estudio, de Acevedo *et al.* (2014), señala que aislamientos bacterianos, de hongos filamentosos y de levaduras se comportan como MSF en la rizósfera de *E. guineensis*, siendo los géneros Aspergillus, Penicillium, Klebsiella, Staphyloccoccus y Burkholderia los de mayor eficiencia solubilizadora, dada principalmente por la liberación de los ácidos orgánicos, cítrico, succínico, acético y glucónico. Sin embargo, la abundancia de estos MSF en la rizósfera es insuficiente y la cantidad de fósforo necesaria para garantizar el crecimiento óptimo de las palmas es elevada (Acevedo *et al.*, 2014), por lo que resulta indispensable la inoculación en altas concentraciones (con relación a las que normalmente se encuentran en el suelo) de los microorganismos seleccionados (MSF, HFMA, MSF + HFMA, etc.) para estimular así la productividad del cultivo y reducir el efecto adverso de los fertilizantes sobre el ambiente y la economía del sistema productivo de palma de aceite. Tal empleo de los MSF y/o los HFMA como biofertilizantes debe enmarcarse dentro de un manejo holístico de la microbiología del suelo en el agroecosistema de palma de aceite, ya que las comunidades microbianas en la rizósfera participan en el ciclaje de nutrientes y la transformación de materia orgánica (Figura 16):

- Los degradadores de materia orgánica pueden agilizar la liberación de nutrientes provenientes de los residuos del cultivo como tusa y hojas viejas.
- Los MSF hacen disponibles los fosfatos insolubilizados en el suelo.
- Los HFMA pueden traslocar rápidamente estos fosfatos solubles hacia la planta.
- El nitrógeno atmosférico que es incorporado a través de la fijación biológica de nitrógeno por parte de bacterias rizosféricas de vida libre (BFN) y simbióticas de leguminosas de cobertura (Rizobios) puede llegar a suplir una importante fracción de los requerimientos de la fertilización nitrogenada en el sistema (Galindo y Romero, 2010).

En general, el estado del arte sobre los MSF y su utilidad en palma de aceite es mucho más escaso que el relacionado con la simbiosis del cultivo y los HFMA, de manera que existe una ausencia de publicaciones tanto a nivel nacional como internacional. Sin embargo, el Laboratorio de Microbiología del Suelo de Cenipalma, como una aproximación inicial al estudio de este tipo de microorganismos, ha venido trabajando en la obtención de algunas cepas de MSF provenientes de suelos palmeros de la Zona Oriental, a fin de aislar y conservar aquellas que solubilicen más de 300 mg / ml de fosfato en medios líquidos, y que junto con el banco de HFMA constituyan, en el mediano o largo plazo, inoculantes eficientes del crecimiento y desarrollo de la palma de aceite.

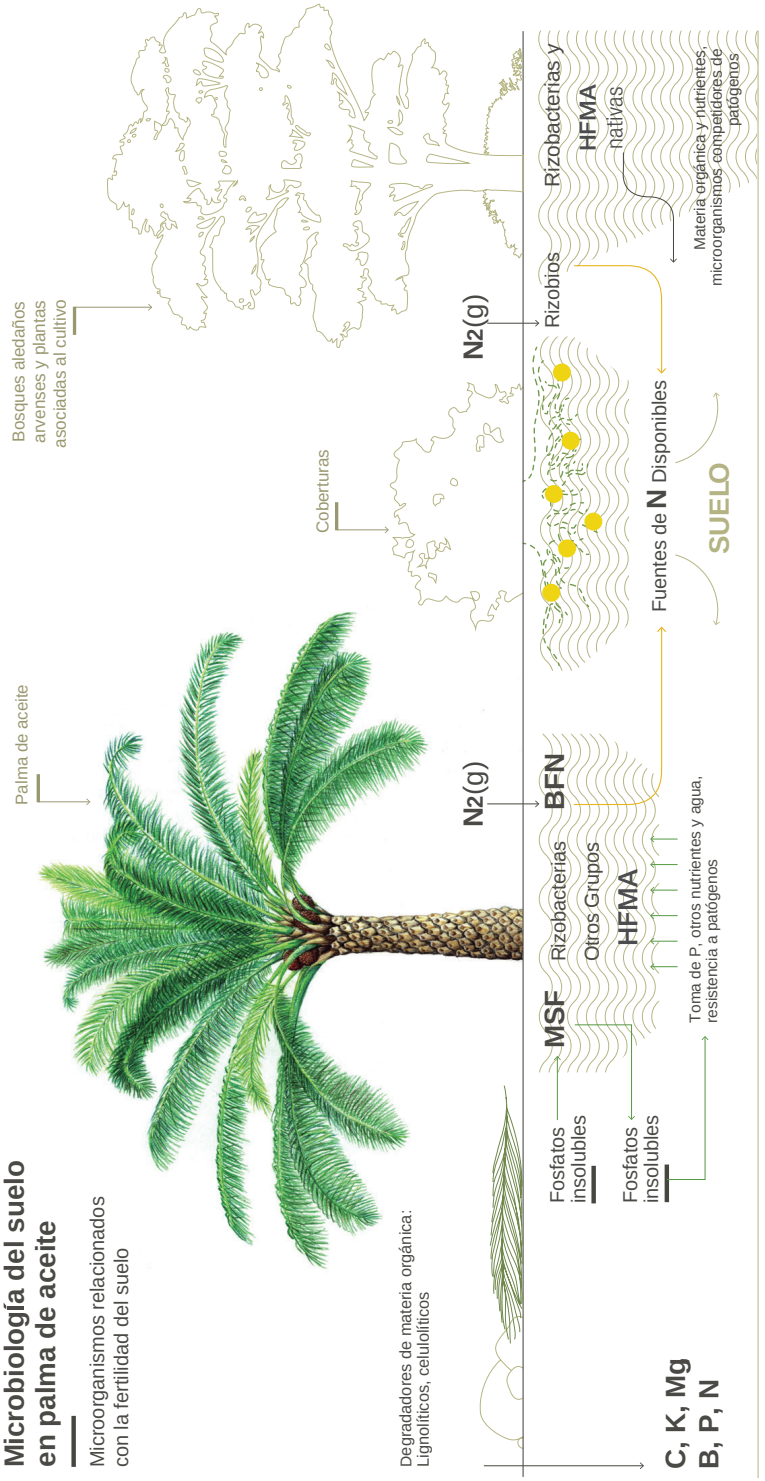


Figura 16. Microorganismos del suelo relacionados con la fertilidad en el agroecosistema de la palma de aceite (Tomado de Galindo y Romero, 2010).

Consideraciones Finales

- Los HFMA son organismos de importancia agrícola y ecológica para el cultivo de palma de aceite, ya que su inoculación en etapa de vivero es una alternativa para incrementar su crecimiento, desarrollo y sobrevivencia de las plántulas. En consecuencia, para que la inoculación tenga éxito es necesario conocer previamente las poblaciones nativas y/o el material inoculante de HFMA mediante pruebas biológicas y agronómicas específicas para las condiciones edafoclimáticas en los que se desarrollarán, y así optimizar el uso de estos microorganismos como biofertilizantes, ya que no existe una 'receta universal' en cuanto a dosis, especies o productos micorrizógenos que de manera general incremente la productividad y/o favorezca la recuperación de ambientes degradados.

- El Laboratorio de Microbiología del Suelo de Cenipalma, como parte del proceso de estandarización de los bioensayos de este proyecto, desarrolló los protocolos para la crioconservación de microorganismos, el análisis microbiológico de suelo y raíces de palma de aceite, la cuantificación del porcentaje de micorrización y el aislamiento de MSF en suelos palmeros, documentos que pueden ser consultados por las personas de plantaciones y/o instituciones interesadas. Asimismo, espera incrementar paulatinamente el banco de los HFMA y los MSF, y mediante herramientas moleculares, seleccionar los microorganismos reportados como promotores del crecimiento de la palma de aceite, a fin de generar el conocimiento técnico–científico y la infraestructura necesaria para que a futuro el gremio palmicultor haga uso efectivo y sostenible de estos microorganismos como biofertilizantes.

- Gracias a este proyecto se logró: (i) conocer la dinámica de la micorrización en plántulas palma de aceite, (ii) identificar las poblaciones de HFMA más efectivas para estimular el crecimiento y desarrollo de la palma y mejor adaptadas a las condiciones ambientales de este sistema productivo, (iii) estandarizar metodologías para el aislamiento, identificación, conservación e inoculación de HFMA en palma de aceite. Lo anterior, en sintonía con los avances a nivel de mejoramiento genético, suelos, aguas y sanidad obtenidos por Cenipalma para la producción de plántulas y mantenimiento de viveros, permitirá un aprovechamiento efectivo de la tecnología de las micorrizas en este campo, así como en el trasplante y la aclimatación de plántulas micropropagadas *in vitro* en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos ya que, cómo se señaló anteriormente, la experiencia es promisoria para el proceso de clonación (Schultz, 2001).

- La inoculación de microorganismos que solubilicen, absorban y pongan disponible el fósforo para la palma de aceite, constituye una ventaja para su uso como biofertilizante al mejorar no sólo las condiciones de crecimiento de las palmas, sino también al minimizar el efecto adverso sobre la canasta de costos y el ambiente que presentan los fertilizantes de síntesis química (en especial, los fosforados). Para ello, resulta imprescindible iniciar estudios que permitan conocer la interacción palma - HFMA - MSF, establecer las poblaciones de MSF más sinérgicas con la simbiosis y efectivas para la palma, y determinar el comportamiento de la asociación HFMA - MSF bajo las diferentes condiciones ambientales (suelo, clima, etc.) y/o agronómicos (riego, aplicación de fertilizantes, estado fitosanitario del cultivo, etc.) de este sistema productivo.

Agradecimientos

Esta investigación fue cofinanciada por el Fondo de Fomento Palmero, FFP, administrado por Fedepalma, y por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias. Los autores agradecen el apoyo a las personas y plantaciones que posibilitaron de alguna manera la ejecución de los experimentos.

Anexo

Foto: Toro, F. 2012.

Protocolo de laboratorio para clareo, blanqueo, tinción de raíces e identificación de estructuras de HFMA

Protocolo de laboratorio para clareo, blanqueo, tinción de raíces e identificación de estructuras de HFMA

- Método: clareo y blanqueo de tejidos radicales con KOH y HCl respectivamente, y tinción de raíces de palma de aceite con tinta Parker.

- Medidas de seguridad: (i) Manipular los reactivos bajo campana de extracción de gases utilizando guantes de nitrilo, gafas protectoras, bata y tapabocas. (ii) Evitar derrames de KOH, H_2O_2 alcalina y HCl ya que son corrosivos, y pueden ocasionar quemaduras en la piel, irritación en los ojos o en las membranas mucosas. (iii) La solución de H_2O_2 alcalina se debe preparar en cabina de extracción en el instante de utilizarla y no se debe almacenar. (iv) La solución Formol – Alcohol – Ácido acético (FAA) se debe manejar con mucho cuidado porque el formol es una sustancia cancerígena, tóxica e irritante.

- Fundamento: el clareo consiste en el tratamiento químico con KOH al 10 % de tejidos vegetales con el fin de extraer el contenido citoplasmático, dejando intactas las paredes celulares, y se verifica observando los tejidos completamente traslúcidos con el mínimo color amarillo, café o verde al microscopio óptico. Este es un paso muy variable, que puede modificarse según el contenido de lignina y otros polifenoles presentes en los tejidos, la edad de la planta, el tipo y tiempo de almacenamiento de la muestra, y el tipo de suelo de donde provienen las muestras. El blanqueo prepara el tejido radical para la observación microscópica de las estructuras desarrolladas por la simbiosis con HFMA, cuya identificación se logra finalmente por contraste con tinta Parker.

- Materiales y reactivos: raíces de plántulas o palma adulta; tamices de 500 µm, casetes de biopsia, matraces de 500 ml o de mayores volúmenes para grandes cantidades de muestras (más de 12 casetes), vasos de precipitados, cajas *Petri*, cuchillas y bisturíes # 20, láminas portaobjetos y cubre objetos, pinzas de punta fina, gotero, temporizador; autoclave, plancha de calentamiento, baño María, cabina de extracción; agua de botellón o proveniente de otra fuente libre de HFMA, agua acidificada con vinagre (50 ml de agua + 5 gotas de vinagre), solución de KOH al 10 % (p/v), solución de HCl 5 %, solución de tinta Parker y vinagre al 5 %, solución de H_2O_2 alcalina (587 ml de agua de botellón + 3 ml de NH_3 +10 ml de H_2O_2 al 30 %), solución de Polivinil lactoglicerol (PVLG),

solución de Formol – Alcohol - Ácido acético (FAA = 50 ml de alcohol 96 % + 35 ml de agua destilada + 10 ml de formol + 5 ml de ácido acético).

- Procedimiento: el procedimiento para clareo, blanqueo y tinción de raíces de palma de aceite se lleva a cabo de la siguiente manera, para ello es importante conocer el sistema radical de la palma de aceite a fin de no confundirlo con raíces de las especies que usualmente acompañan el cultivo como coberturas, arvenses o nectaríferas:
    - Seleccionar cuidadosamente las raíces jóvenes y blandas, cuyos diámetros sean inferiores a 2 mm (secundarias y terciarias en plántulas, y terciarias y cuaternarias en palma adulta), ya que ahí es donde se lleva a cabo la simbiosis de manera efectiva (No utilizar raíces lignificadas que no se pueden observar claramente y conducen a resultados imprecisos y muy variables). Para extraer las raíces se recomienda ablandar el suelo adherido, dejándolo en remojo entre 30 minutos y una hora.
    - Cortar fragmentos de 5–10 cm de raíces frescas y lavarlas sobre un tamiz de 500 µm. Si no es posible procesar inmediatamente las muestras, se deben almacenar a 4 ºC con una solución de alcohol al 60 % o FAA.
    - Disponer las raíces en casetes de biopsia, sellar bien las dos tapas y marcar cada uno con un marcador indeleble. Si los casetes están en FAA, se sacan de la solución, se depositan en un matraz, se lavan cinco veces con agua de botellón haciendo remolinos de agua mediante rotación manual.
    - Ubicar los casetes con las raíces en el fondo de un matraz de 500 ml (usualmente 6 casetes), adicionar una cantidad de la solución de KOH al 10 % que cubra las raíces por completo y que no vaya a rebasarse durante el procedimiento de autoclavado (200 ml aproximadamente). Cubrir la boca del matraz con un trozo de gasa sujetada con un caucho.
    - Dejar las raíces en la solución de KOH toda la noche y al día siguiente autoclavarlas durante una hora. Si no es posible manejar este tiempo, se pueden hacer dos ciclos de una hora.
    - Sacar los casetes del matraz con ayuda de una pinza metálica y lavarlos con abundante agua de botellón cinco veces seguidas (en cabina de extracción).
    - Sumergir los casetes en matraces que contengan HCl al 5 % durante 20 minutos (en cabina de extracción), y al cabo lavarlos una sola vez con abundante agua de botellón.

- Pasar los casetes a matraces con solución de H_2O_2 alcalina durante 40 minutos (en cabina de extracción), y al cabo lavarlos una sola vez con abundante agua de botellón.
- Adicionar nuevamente solución de HCl al 5 % durante 15 minutos, teniendo cuidado en cubrir todos los casetes (en cabina de extracción), y al cabo lavarlos una sola vez con abundante agua de botellón.
- Disponer los casetes en un recipiente de vidrio con la solución de tinta y vinagre al 5 %. Llevarlas al baño María durante 3 minutos.
- Sumergir los casetes en 50 ml de agua de botellón acidificada con 5 gotas de vinagre durante 20 minutos.
- Extraer las raíces en cajas *Petri* separadas según el tratamiento, cortando fragmentos de 1 cm aproximadamente y ubicándolos sobre láminas portaobjetos con ayuda de un pincel fino. Cubrir con una o dos gotas de solución de PVLG, cubrir con laminillas, y sellar con esmalte transparente.
- Observar las raíces al microscopio verificando la presencia de estructuras de HFMA como micelio, arbúsculos, vesículas, esporas.

Referencias

Acevedo E., Galindo T, Prada F, Navia M, Romero H. 2014. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. Appl. Soil Ecol. 80: 26-33.

Adesemoye A, Kloepper J. 2009. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85(1): 1-12.

Bakhtiar Y, Yahya S, Sumaryono W, Sinaga M, Budi S. 2013. Adaptation of oil palm seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhizal endosymbiotic bacteria *Bacillus subtilis* B10 towards biotic stress of pathogen *Ganoderma boninense* Pat. Microbiol. Indones. 6(4): 157-164.

Barrer S. 2009. El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. Facultad de Ciencias Agropecuarias 7(1): 123-33.

Bashan Y, Kamnev A, de-Bashan L. 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. Biol. Fertil Soils 49(4): 465-479.

Centro de Investigación en palma de aceite, Cenipalma. 1995. Evaluación de la asociación micorriza-palma de aceite. Ceniavances No 12. 2 p.

Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite, Cenipalma. Bogotá, 2014. Anuario Estadístico 2014: La agroindustria de la palma de aceite en Colombia y en el mundo 2008-2012. 176 p.

Fernández MT, Rodríguez H. 2005. El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos. ICIDCA 39(3): 27-34.

Gadkar V., Schwartz R., Kunik T., Kapulnik Y. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. Plant Physiol. 127: 1493–1499.

Galindo T, Romero H. 2010. Microbiología del suelo cultivado con palma de aceite en Colombia. Palmas 31(2): 49-60.

Galindo T, Romero H. 2013. Mycorrhization in oil palm (*Elaeis guineensis* and *E. oleifera* x *E. guineensis*) in the pre-nursery stage. Agron. Colombia. 31(1): 95-102.

Harris C, Esqueda M, Valenzuela E, Castellanos A. 2009. Tolerancia al estrés hídrico en la interacción Planta-Hongo Micorrízico Arbuscular: metabolismo energético y fisiología. Rev Fitotec Mex 32(4): 265-71.

Hashim. A. 2004. Ganoderma versus micorriza. Palmas 25 (4):75-83.

Howeler RH, Sieverding E, Saif S. 1987. Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pastures. Plant Soil 100: 249-283.

INVAM. 2013. International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi. En: http://invam.wvu.edu/. Consultada: Noviembre de 2013.

Morton J, Bentivenga S, Bever J.1995. Discovery, measurement and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). Can. J.Bot., 73: 25–32.

Motta D, Munévar F. 2005. Respuesta de plántulas de palma de aceite a la Micorrización. Palmas 26(3):11-20.

Munévar F. 1998. Problemática de los suelos cultivados con palma de aceite en Colombia. Palmas 19 (Número especial): 219-228.

Oehl F, Sieverding E, Palenzuela J, Ineichen K, Alves da Silva G. 2011. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. IMA Fungus 2(2):191-199.

Patiño, C. 2010. Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca: Estudio de biodiversidad y eficiencia. Trabajo de grado para optar el título de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, Palmira (Colombia). 133 p.

Phosri Ch, Rodríguez A, Sanders I, Jeffries P. 2010. The role of mycorrhizas in more sustainable oil palm cultivation. Agric.Ecosyst. Environ.135: 187-93.

Redecker D, Schussler A, Stockinger H, Sturmer S, Morton J, Walker C. 2013. An evidence based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Mycorrhiza 23(7): 515-517.

Rillig M, Mummey D. 2006. Mycorrhizas and soil structure. New Phytol 171: 41-53.

Rivera Y, Acevedo E, Romero HM. 2013. Efecto de la micorrización arbuscular sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de palma de aceite en etapa de previvero. Ceniavances No 175. 4 p.

Salas E, Blanco F. 2000. Selección de plantas hospederas y efecto del fósforo para la producción de inóculo de Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares por el método de cultivo en macetas. Agronomía Costarricense, 24(1): 19-28.

Schachtman D, Reid R, Ayling S. 1998. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. Plant Physiol. 116: 447–453.

Schultz C. 2001. Effect of (vesicular) arbuscular mycorrhiza on survival and post vitro development of micropropagated oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.). En: http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2002/schultz/schultz.pdf. Consultada: Febrero 10 de 2014.

Sieverding E. 1983. Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo arbuscular en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Proyecto micorriza. 356 p.

Sieverding E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Technical Cooperation - Federal Republic of Germany. Eschborn. 367 p.

Smith F, Smith S. 1997. Structural diversity in (vesicular) arbuscular mycorrhizal symbioses. New phytol. 137(3): 373-388.

Stevenson F, Cole MA. 1986. Cycles of soil: Carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. Ed. John Wiley & Sons. Segunda edición. New York, 490 p.

Centro de Investigación en Palma de Aceite
Calle 20A Nº 43A - 50 Piso 4 Bogotá D.C.
PBX: 208 6300 Fax: 244 4711
www.cenipalma.org