

**Efecto de la micorriza vesículo-arbuscular  
(VAM) en el daño de la sigatoka negra en  
banano y plátano**

**Mario René Menéndez Tejeda**

**ZAMORANO**

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Diciembre, 2004

**ZAMORANO**  
**CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCION AGROPECUARIA**

# **Efecto de la micorriza vesículo-arbuscular (VAM) en el daño de la sigatoka negra en banano y plátano.**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado  
Académico de Licenciatura.

Presentado por

**Mario René Menéndez Tejeda**

**Zamorano, Honduras**  
Diciembre, 2004

**El autor concede a Zamorano permiso  
para reproducir y distribuir copias de este  
trabajo para fines educativos. Para otras personas  
físicas o jurídicas se reserva el derecho de autor**

---

**Mario Menéndez**

**Zamorano, Honduras**  
Diciembre, 2004

## **Efecto de la micorriza vesículo-arbuscular (VAM) en el daño de la sigatoka negra en banano y plátano.**

Presentado por:

Mario René Menéndez Tejeda.

Aprobado:

---

Juan Carlos Rosas, Ph. D.  
Asesor Principal

---

Abelino Pitty, Ph. D.  
Coordinador de Area Temática  
Fitotecnia

---

Phil Amerson, Ph. D.  
Asesor

---

Jorge Iván Restrepo, MBA.  
Coordinador de la Carrera de  
Ciencia y Producción  
Agropecuaria

---

Gloria Arévalo, M. Sc.  
Asesor

---

Aurelio Revilla, M.S.A.  
Decano Académico Interino

---

Byron Reyes, Ing. Agr.  
Asesor

---

Kenneth L. Hoadley, Ph.D.  
Rector

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la fortaleza, guiarme y bendecirme siempre.

A mis padres por el ejemplo, amor, consejos y apoyo incondicional, que me ha brindado toda mi vida.

A mis hermana Carol por ser mi apoyo y estar conmigo cuando los necesito.

A toda familia por creer en mí, darme apoyo y ganas de seguir adelante.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre por ser mi apoyo en todo lo que he necesitado.

A mis hermanas por ayudarme a lograr esta meta.

A todo el personal del PIF

A todos mis amigos.

## **AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES**

A Dole-Standard Fruit Co. por su apoyo en la cooperación y donación para la realización de este proyecto

## RESUMEN

Menéndez Tejeda, Mario René. 2004. Efecto de la micorriza vesículo-arbuscular (VAM) en el daño de la sigatoka negra en banano y plátano. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 20 p.

En banano y plátano el principal problema agronómico es el manejo de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), que reduce el rendimiento y la calidad de la fruta. Una alternativa para reducir el daño de la sigatoka negra es la aplicación de micorrizas, que poseen un efecto beneficioso en la absorción de agua, nutriente y control fitosanitario. Se evaluó el efecto de la inoculación con Mycoral<sup>®</sup> (inoculante VAM), en la incidencia de sigatoka negra en los cultivos de plátano y banano, en vivero. Se realizaron tres ensayos independientes con cormos de la variedad Curaré Enano, meristemos y cormos de la variedad Gran Enano. Se evaluaron dos tratamientos con y sin Mycoral<sup>®</sup>, en un diseño de bloques completamente al azar, con cinco repeticiones. Las variables medidas fueron: incidencia y severidad de la enfermedad a los 30, 45 y 75 días después de inoculadas (DDI); altura y diámetro del pseudotallo al inicio y al final del estudio; porcentaje de mortalidad de plantas; y porcentaje de infección de micorrizas en la raíz. Los datos fueron analizados mediante un ANDEVA ( $P < 0.05$ ). En meristemos de banano Gran Enano, a los 45 DDI, en las plantas con Mycoral<sup>®</sup> se redujo 17% la incidencia y en un grado de severidad el daño, y aumentó 8% el crecimiento, comparado con plantas sin Mycoral<sup>®</sup>. En cormos de plátano de Gran Enano con Mycoral<sup>®</sup> se redujo 8% la incidencia y en un grado la severidad del daño e incrementó 7% el crecimiento comparado con plantas sin Mycoral<sup>®</sup>. Los mayores efectos benéficos del Mycoral<sup>®</sup> en la reducción de incidencia de *Mycosphaerella fijiensis*, fueron en meristemos de Gran Enano y el incremento en plantas en cormos y meristemos de Gran Enano, presentándose el Mycoral<sup>®</sup> como una alternativa en la reducción del daño de *Mycosphaerella fijiensis*. Sin embargo, realizar evaluaciones futuras en condiciones de campo para medir los efectos del Mycoral<sup>®</sup> en plantas infectadas con el patógeno.

**Palabras clave:** Infección, inóculo, Mycoral<sup>®</sup>, *Mycosphaerella fijiensis*, patógeno.

## TABLA DE CONTENIDO

|  |      |
|--|------|
| Portadilla.....  | i    |
| Autoría.....   | ii   |
| Página de firmas:.....   | iii  |
| Dedicatoria .....  | iv   |
| Agradecimiento .....   | v    |
| Agradecimiento a patrocinadores .....  | vi   |
| Resumen .....  | vii  |
| Tabla de contenido .....   | viii |
| Indice de cuadros.....   | x    |
| Indice de anexos .....   | xi   |
| INTRODUCCIÓN.....  | 1    |
| OBJETIVOS.....   | 2    |
| Objetivo General .....   | 2    |
| Objetivos Específicos.....   | 2    |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 3    |
| Localización .....   | 3    |
| Material de siembra e inoculación.....   | 3    |
| Recipientes para la siembra y medio de cultivo .....   | 3    |
| Adaptación del protocolo para el aislamiento, conservación e inoculación de<br>Mycosphaerella fijiensis..... | 3    |
| Aislamiento del patógeno.....  | 4    |
| Purificación e identificación.....   | 4    |
| Preparación del inóculo y prueba de patogenicidad.....   | 4    |
| Conservación del patógeno.....   | 5    |
| Inoculación de plantas con el patógeno.....  | 5    |
| Adaptación de escala de evaluación del daño por el patógeno. ....  | 5    |
| Establecimiento en vivero .....  | 6    |
| Preparación del vivero.....  | 6    |
| Selección y recolección de material de siembra.....  | 6    |
| Plantación e inoculación con Mycoral® .....  | 6    |
| Labores culturales.....  | 6    |
| Variables medidas .....  | 7    |
| Diseño experimental y análisis estadístico.....  | 7    |
| RESULTADOS Y DISCUSIONES.....  | 8    |

|  |    |
|--|----|
| Adaptación del protocolo para el aislamiento, conservación e inoculación de<br><i>Mycosphaerella fijiensis</i> ..... | 8  |
| Aislamiento del patógeno .....   | 8  |
| Inoculación de plantas .....   | 8  |
| Adaptación de la escala de evaluación del daño. ....   | 8  |
| Medición de Variables.....   | 9  |
| Cormos de plátano Curare Enano.....  | 9  |
| Meristemo de banano Gran Enano .....   | 9  |
| Cormos de banano Gran Enano.....   | 11 |
| CONCLUSIONES.....  | 14 |
| RECOMENDACIONES .....  | 15 |
| BIBLIOGRAFIA.....  | 16 |
| ANEXOS.....  | 17 |

## INDICE DE CUADROS

### Cuadr

o

|    |   |   |
|----|---|---|
| 1. | Severidad por inoculación (1 = sin daño, 6= daño severo) de <i>Mycosphaerella . fijiensis</i> en plantas de cormo de Curaré Enano con y sin Mycoral <sup>®</sup> , evaluadas 45 y 75 días después de inoculación con el patógeno en vivero. Zamorano, Honduras. 2004..... | 9 |
| 2. | Diámetro (mm) y altura (cm) de plantas de cormos de Curaré Enano con y sin Mycoral <sup>®</sup> , evaluadas al inicio y al final del estudio durante vivero. Zamorano, Honduras. 2004.....  | 9 |
| 3. | Severidad natural (grado) e incidencia (%) de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> en plantas de meristemos de banano Gran Enano, con y sin Mycoral <sup>®</sup> , 30 y 45 días después de inoculación durante vivero. Zamorano, Honduras. 2004.....                           | 1 |
| 4. | Diámetro y altura de plantas de meristemo de banano Gran Enano, con y sin Mycoral <sup>®</sup> , evaluadas al inicio de la inoculación con el patógeno y al final del estudio, durante vivero. Zamorano, Honduras. 2004.....  | 1 |
| 5. | Incidencia de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> en plantas de cormo de banano Gran Enano, con y sin Mycoral <sup>®</sup> a 30 y 45 días después de inoculación, durante vivero. Zamorano, Honduras. 2004.....   | 1 |
| 6. | Severidad natural y por inoculación (grado) de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> en plantas de cormo de Gran Enano con y sin Mycoral <sup>®</sup> a 30, 45 y 75 días después de inoculación durante vivero. Zamorano, Honduras.....   | 2 |
| 7. | Diámetro y altura de plantas de banano Gran Enano provenientes de cormos, tratadas con Mycoral <sup>®</sup> y sin Mycoral <sup>®</sup> , evaluadas al inicio de la inoculación y al final del estudio, durante vivero. Zamorano, Honduras.....                            | 2 |
| 8. | Promedios de infección (%) con VAM de la raíz, en cormos de plátano Curaré Enano, meristemos y cormos de banano Gran Enano, tratadas con y sin Mycoral <sup>®</sup> . Zamorano, Honduras.2004.....  | 3 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

### Cuadro

1. Medio Papa Dextrosa Agar (PDA), usado en el Laboratorio de Biotecnología, Zamorano 18
2. Medio de agar-agua usado en el Laboratorio de Biotecnología, Zamorano. 18
3. Estadios de desarrollo de una hoja de banano (Jones 2000). 18
4. Escala de evaluación del daño para determinar la severidad de la sigatoka negra, (Galan 1992)<sup>1</sup>, Zamorano, Honduras.2004. 19
5. Escala de evaluación para enfermedades, adaptado a *M. Fijiensis*, Zamorano, Honduras. 2004. 19
6. Método para clarificar y teñir muestras de raíces, usado en el Laboratorio c Biotecnología, Zamorano, Honduras. 2004. 20

## INTRODUCCIÓN

La sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) es una enfermedad difundida en las zonas plataneras, que ocasiona daños severos al follaje de la planta, inhibiendo su capacidad fotosintética, reduciendo con ello el rendimiento y la calidad de la fruta. Si el ataque se produce mayormente en hojas jóvenes de la planta, la pérdida de la producción puede ser total. La fruta que se obtiene de plantaciones atacadas por este mal, madura rápidamente en el trayecto a los mercados, con pérdidas para los agroexportadores (Suquilanda 2001).

En plantaciones de banano y plátano destinadas a la exportación, el control de la sigatoka negra se realiza haciendo aplicaciones frecuentes de fungicidas (práctica muy costosa), que incluye el uso de equipos e implementos de alto valor, manejo de agroquímicos y su efecto negativo en el ambiente y el alto precio de estos insumos. En total, se ha estimado que estos costos corresponden al 25% del precio final de la fruta en el mercado de los países importadores. Debido al alto costo de las medidas de control de la enfermedad, los pequeños agricultores no tienen acceso a ello, por lo que son los más afectados (Ploetz 1999).

En los últimos años se ha incrementado el estudio de alternativas para controlar la sigatoka negra y disminuir así la cantidad de químicos utilizados. Las micorrizas (hongos simbioses), en especial las micorrizas vesículo-arbuscular(VAM), tienen un efecto benéfico en las plantas en la absorción de agua y nutrimentos, y les permite mayor tolerancia a varios agentes que les causan estrés (Raddatz 2001).

En investigaciones realizadas con micorrizas en musáceas, se han encontrado efectos positivos en el desarrollo de las plantas. En la variedad de banano Gran Enano se encontró, que las plantas inoculadas desarrollaron mejor que las del testigo, a las 14 semanas después de la inoculación en vivero (Jaizme-Vega *et al.* 2002).

En plantas de plátano inoculadas con Mycoral<sup>®</sup> se obtuvo mejor desarrollo de las plantas en vivero, se incrementó la altura y se obtuvo plantas mejor adaptadas para el trasplante a campo y una reducción de 18 días para su trasplante (Solís 2003). En otros cultivos, se ha observado el efecto benéfico de las VAM en la tolerancia a enfermedades. En tabaco, se reportó la resistencia al ataque de pata prieta (*Phytophthora nicotianae var. nicotianae*) mediante la inhibición de la infección del hongo patógeno por una cepa de VAM, un 75 % de mortalidad en las plantas testigo y 0 % en las tratadas con VAM. (Hernández *et. al.* 1994).

Zamorano está incorporando el uso de Mycoral<sup>®</sup> en las prácticas agronómicas de banano y plátano, con el fin de medir su efecto en la incidencia de la sigatoka negra y analizar la posibilidad de minimizar el uso de fungicidas y mejorar la producción en las plantaciones. Este estudio estuvo orientado al control de la sigatoka negra mediante el uso de micorrizas en vivero, utilizando cormos y meristemas en banano y solo cormos en plátano.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar el efecto de la inoculación con micorriza vesículo-arbuscular, en el daño de la sigatoka negra en plátano y banano durante la fase de vivero.

### **Objetivos Específicos**

- Adaptar el protocolo de manejo de *M. fijiensis* en laboratorio, para asegurar la infección en vivero.
- Evaluar el efecto agronómico de VAM en y materiales de propagación (meristemas y cormos) de banano y plátano.
- Evaluar el efecto de VAM en la incidencia y severidad del daño causado por *M. fijiensis* en plantas de banano y plátano en vivero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización

El estudio se estableció en el vivero del Programa de Biotecnología en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicada a 800 msnm, con una precipitación promedio anual de 1,100 mm y una temperatura promedio anual de 22°C.

### Material de siembra e inoculación

Para la siembra en vivero se usaron 80 cormos de plátano “Curare Enano”, procedentes de Zamorano (Vega 7); 130 cormos y 130 meristemos de banano “Gran Enano” procedentes de La Ceiba (United Fruit Co), Honduras. Como inóculo VAMse utilizó Mycoral<sup>®</sup>, producto biológico que contiene tres especies de hongos micorrizógenos (*Glomus* sp., *Acaulospora* sp., y *Entrosposphora* sp.) en forma de esporas, hifas, y raicillas infectadas con hifas producido en Zamorano.

### Recipientes para la siembra y medio de cultivo

Los cormos y meristemos fueron sembrados en bolsas plásticas para vivero de 0.015 cm de espesor x 30 cm de diámetro x 30 cm de altura. Cada bolsa contuvo 0.02 m<sup>3</sup> de medio 4:2:1 (tierra, casulla de arroz y arena) no pasteurizado.

### Adaptación del protocolo para el aislamiento, conservación e inoculación de *Mycosphaerella fijiensis*

Se adaptó primero el protocolo para el aislamiento del patógeno y luego se realizaron tres ensayos independientes evaluándose cada ensayo en distintos materiales de siembra.

- a. Evaluación en cormos de plátano.
- b. Evaluación en meristemos de banano.
- c. Evaluación en cormos de banano.

Para evitar una confusión en los síntomas de *M. fijiensis* con síntomas de la *M. muscicola* en la recolección de las muestras de plantas, se adaptó el protocolo para *M. fijiensis*,

(Castaño-Zapata 1994) y se empleó la referencia de los síntomas descritos por Belalcazar (1991) y la descripción de Arnerson (2004)<sup>1</sup>.

### **Aislamiento del patógeno**

**Toma de muestras:** se colectaron muestras de plantas adultas y enfermas provenientes de la Vega 7 de Zamorano y la finca Dole-Standard Fruit Co. de San Pedro, Honduras; lesiones en diferentes estados de daño (4, 5 y 6 de severidad), las cuales presentaban síntomas característicos como el estriado y necrosamiento posterior de la lámina foliar. Las muestras se procesaron en el laboratorio de Biotecnología.

**Siembra:** Se cortaron segmentos de 3 cm<sup>2</sup> en las zonas de estriados de la superficie de la hoja. Se desinfectaron las muestras con una solución de cloro al 5 % (v/v) y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Se utilizó dos técnicas para aislar el patógeno:

a) Descargas de espora: se colocaron los segmentos desinfectados con cinta adhesiva en la parte superior de un plato petri, y se colocó la tapa sobre la parte inferior del plato, con medio agar-agua (anexo 1), se dejó a temperatura ambiente por 24 horas. Con un estereoscopio se identificó la presencia de esporas, y se dejó por siete días en la incubadora a 27°C. Luego se subcultivó en medio papa dextrosa agar (PDA) (Anexo 2).

b) Recolección de peritecios: se colocaron los segmentos desinfectados bajo un estereoscopio para observar y ubicar las estructuras reproductivas (peritecios) en la superficie de las hojas. Ubicados los peritecios (cápsulas que contienen ascas), se procedió a extraerlos con un alfiler montado sobre una aguja de dirección. Se sembraron 4 peritecios por plato petri con medio agar-agua más antibiótico, para impedir el crecimiento bacteriano. Al 7º día de crecimiento se subcultivó en medio PDA.

### **Purificación e identificación**

Semanalmente se observaron los platos petri para ver el crecimiento y evolución del hongo. Después de 45 días incubación se subcultivó el patógeno, sembrándolo en medio de cultivo PDA, con el fin de obtener un mayor crecimiento y formación de hifas para establecer las características macro y microscópicas del patógeno.

### **Preparación del inóculo y prueba de patogenicidad**

Una vez aislado el patógeno, se incrementó en PDA y se inocularon plantas de plátano “Cuaré Enano” para verificar su patogenicidad. Después se sembraron platos petri para inóculo madre, luego se realizaron subcultivos del plato madre para evitar el

---

<sup>1</sup> Arnerson, P. 2004. Adaptación del protocolo de *Mycosphaerella fijiensis*. Fitopatólogo. Zamorano, Honduras.(comunicación personal).

envejecimiento del cultivo y la pérdida de patogenezidad, 7 días antes de realizada las inoculaciones, incubándose a temperatura ambiente y manteniéndose a esa temperatura.

### **Conservación del patógeno.**

Se sembró *M. fijiensis* en tubos de ensayo con medio PDA inclinado más tetraciclina, y se incubó a temperatura ambiente por siete días para obtener un buen crecimiento. Luego se sellaron los tubos con aceite mineral y se almacenaron en la refrigeradora a 4 °C.

### **Inoculación de plantas con el patógeno.**

La inoculación de plantas se realizó a los dos meses de trasplante, para lo cual se colocó una pequeña porción (1 cm<sup>2</sup>) del inóculo incubado por siete días en medio PDA, en el envés de la hoja de las plantas de plátano y banano, sujetándolo con cinta adhesiva. Para ello, se seleccionó una hoja recién emergida (hoja candela o cigarro, en estados 3 - 4) (Anexo3). Para los cormos de plátano, se seleccionaron cuatro grupos de ocho plantas cada uno, y en el ensayo de cormos de banano cinco grupos de ocho plantas; tomando como criterio la emisión de la hoja cigarro. En el ensayo de meristemo de banano, se seleccionaron cinco grupos de trece plantas cada uno. En los tres ensayos se realizaron las inoculaciones el mismo día, para tener inoculación uniforme.

### **Adaptación de escala de evaluación del daño por el patógeno.<sup>2</sup>**

La enfermedad se presentó en dos formas: asexual y sexual, existiendo diferencias entre los síntomas de las plantas inoculadas y las plantas con infección natural por plantas dispersoras, producto de las infecciones primarias a partir de plantas con inoculación. Se formularon dos sistemas de evaluación de *M. fijiensis* en condiciones de vivero. En el primer sistema, usado para plantas inoculadas de manera localizada, se diseñó una escala de 1 a 7 (1 = ausencia daño, 7 = daño severo) determinando las distintas categorías de severidad de daño en la hoja (Anexo 4). En el segundo sistema, se diseñó una escala de 1 a 9 (1 = ausencia daño, 9 = daño severo), usado para plantas con infección natural por plantas dispersoras, se utilizó dos criterios: a) severidad de la enfermedad como la cantidad de tejido de la planta afectado por organismos causantes de la enfermedad expresado en porcentaje de la cantidad total de ese tejido, y b) la incidencia de la enfermedad como el número de hojas afectadas, expresando luego estas unidades como porcentaje de la población total de unidades escogidas (Anexo 5).

---

<sup>2</sup> Anderson, P. 2004. Aislamiento del patógeno de *Mycosphaerella fijiensis*. Zamorano, Honduras. (Comunicación personal).

## **Establecimiento en vivero**

### **Preparación del vivero**

Se llenó bolsas de polietileno (0.015 x 30 x 30 cm.) con medio de 4:2:1 (tierra, casulla de arroz y arena) y se separaron por tratamientos, realizando bloques dentro del vivero.

### **Selección y recolección de material de siembra**

- Cormos de banano y meristemas: donados por la Standard Fruit Co., para lo cual se realizó un viaje a la Ceiba.
- Cormos de plátano: se seleccionaron del lote Vega 7 del área de frutales de Zamorano, libres de plaga (picudo negro, principalmente) y sin daños. Luego se limpiaron y desinfectaron con Diazinon (insecticida, acaricida-órgano fosforado) con dosis de 0.0055%, dejándolos en reposo con agua por un día<sup>3</sup>.

### **Plantación e inoculación con Mycoral<sup>®</sup>.**

- Meristemo: En pilones de banano tratados con Mycoral<sup>®</sup>, se utilizó una dosis de 80 g por planta esparciendo el 50 % del producto en el fondo y el restante las en paredes del agujero y paredes del pilón.
- Cormos de banano y plátano: se inocularon con 300 g de Mycoral<sup>®</sup> por cormo esparciendo el 50% al fondo del agujero y el restante en el área baja del cormo.
- Independientemente de la fuente (cormo o meristemo), se inocularon con Mycoral<sup>®</sup> el 50% del material vegetal y el 50% se dejó como testigo no tratado.

### **Labores culturales**

La fertilización se realizó con base en las recomendaciones para el cultivo utilizando dosis de nitrógeno (80 g/plantas) anuales.

En las labores de limpieza se mantuvo libre de malezas el área del vivero, de acuerdo a la rapidez de crecimiento de las malezas.

Para el riego se utilizó una manguera con un aspersor adaptado para nebulizar, para favorecer un ambiente húmedo al patógeno. Se regaron las plantas dos veces al día en las horas de baja humedad relativa (7:00 am y 3:30 pm).

---

<sup>3</sup> Duarte, O. 2004. Recolección y desinfección de cormos de plátano y banano. Zamorano, Honduras (comunicación personal).

### **Variables medidas.**

Se evaluaron las siguientes variables:

- Incidencia de la enfermedad: se evaluaron a los 30 y 45 días después de inoculación (DDI), los ensayos de cormos de banano y meristemos de banano. En el segundo sistema de evaluación, debido a la presencia de infecciones por plantas dispersoras y en cormos de plátano se utilizó el primer sistema de evaluación.
- Severidad de la enfermedad: Se evaluó el daño causado por infección natural a los 30 y 45 DDI; y el daño causado por la inoculación a los 45 y 75 DDI de la siguiente manera:
  - a. Cormos de plátano con el primer sistema de evaluación (1 a 7).
  - b. Cormos y meristemos de banano con los dos sistemas de evaluación.(1 a 9)
- Diámetro del pseudotallo: en los tres ensayos se midió el diámetro al inicio y al final del ensayo, después de la inoculación con el patógeno, a una altura de 10 cm desde el suelo.
- Altura inicial y final del estudio: se hicieron mediciones, desde el suelo hasta la “v” formada por las dos primeras hojas funcionales, después de la inoculación con el patógeno (altura inicial).
- El porcentaje de mortalidad de plantas por causas ambientales, se tomó en cuenta al final del estudio.
- Porcentaje de infección con VAM en la raíz: se tomó una muestra por repetición, compuesta por cinco raíces de cada planta; cada una se evaluó al final de la etapa de vivero, empleando la metodología utilizada por el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de Zamorano (Anexo 6).

### **Diseño experimental y análisis estadístico.**

Se utilizó un diseño de Bloques Completamente al Azar (BCA), con dos tratamientos (con y sin Mycoral<sup>®</sup>), cinco repeticiones de ocho plantas de cormos y 13 plantas de meristemos de banano; y cuatro repeticiones de ocho plantas de cormos de plátano. La información fue analizada mediante el programa estadístico “Statiscal Analysis System” (SAS) versión 8. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y se hizo una separación de medias usando la prueba de “t”. El nivel de significancia utilizado fue de  $P < 0.05$ .

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **Adaptación del protocolo para el aislamiento, conservación e inoculación de *Mycosphaerella fijiensis***

El protocolo para aislar *M. fijiensis* se adaptó en condiciones de laboratorio con éxito, encontrándose que las hojas recolectadas en Zamorano presentaron síntomas característicos del patógeno

### **Aislamiento del patógeno**

La muestra que se recolectó en Zamorano tuvo menos contaminantes en la superficie de la hoja que la muestra de la finca Dole-Standar Fruit Co de San Pedro Sula, Honduras; facilitando el aislamiento puro del hongo. Se encontraron peritecios maduros en estado 5 de severidad con estructuras enteras, en hojas secas de por lo menos 1-2 días.

En la siembra del patógeno, no se implementó la técnica de descarga de esporas, debido a que se encontró que los contaminantes en la superficie de la hoja, caían sobre el medio de crecimiento, siendo un factor de contaminación muy agresivo que inhibió el crecimiento normal del patógeno.

La recolección de peritecios, se implementó con facilidad y seguridad en el crecimiento del patógeno libre de contaminación por otros agentes, que regularmente se encuentran en la superficie de la hoja.

### **Inoculación de plantas**

Se observó a 30 y 45 DDI, infección natural por plantas dispersoras en meristemo y cormos de Gran Enano y se encontraron síntomas de *M. fijiensis* a 45 y 75 DDI en cormos de Curaré Enano y Gran Enano, a causa de la inoculación. Esto debido a la agrupación de las plantas fue efectivo para favorecer el 100% de infección.

### **Adaptación de la escala de evaluación del daño.**

Los dos sistemas de evaluación se adaptaron al desarrollo de la enfermedad, permitiendo una evaluación efectiva de plantas infectadas localizadamente e infectadas naturalmente por plantas dispersoras.

## Medición de Variables

### Cormos de plátano Curare Enano

Severidad: no se presentaron síntomas de daño causados naturalmente por plantas dispersoras a los 30 DDI. Sin embargo, a los 45 y 75 DDI se evaluó el daño de la inoculación pero no se encontró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el grado de severidad del daño (Cuadro 1). Se observaron diferencias en la infección, estos cambios se debieron a bajas en la temperatura ( $< 21^{\circ}\text{C}$ ) y la falta de rocío durante la madrugada (2:00 am - 5:00am).

No se evaluó la incidencia en estas plantas por que no se presentó naturalmente, debido a que no hubo control en la diseminación de conidias y ascosporas que se diseminan por agua y viento, respectivamente.

**Cuadro 1.** Severidad por inoculación (1 = sin daño, 6= daño severo) de *Mycosphaerella fijiensis* en cormo de plátano Curaré Enano con y sin Mycoral<sup>®</sup>, (inoculante VAM) evaluadas 45 y 75 días después de inoculación con el patógeno en vivero. Zamorano, Honduras. 2004

| Tratamiento              | Días después de inoculación |    |
|--------------------------|-----------------------------|----|
|                          | 45                          | 75 |
| Con Mycoral <sup>®</sup> | 2                           | 4  |
| Sin Mycoral <sup>®</sup> | 2                           | 4  |
| Modelo ( $P < 0.05$ )    | ns <sup>b</sup>             | ns |

<sup>b</sup>ns: no significativo.

Diámetro del pseudotallo y altura: en ninguna de las dos variables se encontró diferencias significativas al inicio ni al final del estudio; lo que se puede atribuir a estrés ocasionado por bajas temperaturas presentadas ( $< 14^{\circ}\text{C}$ ) que afecta el crecimiento (cuadro 2).

**Cuadro 2.** Diámetro (mm) y altura (cm) de cormos cormos Curaré Enano con y sin Mycoral<sup>®</sup>, evaluadas al inicio y al final del estudio durante vivero. Zamorano, Honduras. 2004.

| Tratamiento              | Diámetro (mm)   |       |            | Altura (cm) |       |            |
|--------------------------|-----------------|-------|------------|-------------|-------|------------|
|                          | inicial         | final | diferencia | inicial     | final | diferencia |
| Con Mycoral <sup>®</sup> | 31              | 38    | 7          | 34          | 41    | 7          |
| Sin Mycoral <sup>®</sup> | 31              | 38    | 7          | 35          | 42    | 7          |
| DS                       | 4               | 5     | 5          | 4           | 5     | 4          |
| Modelo ( $P < 0.05$ )    | ns <sup>b</sup> | ns    | ns         | ns          | ns    | ns         |

<sup>b</sup>ns: no significativo.

### Meristemo de banano Gran Enano

Incidencia: hubo diferencias significativas a los 30 días DDI entre los tratamientos, donde las plantas con Mycoral<sup>®</sup> presentaron 7.89% menos de incidencia del patógeno que las plantas sin Mycoral<sup>®</sup>. En la segunda evaluación (45DDI), las plantas con Mycoral<sup>®</sup> presentaron casi el mismo daño que en la primera evaluación, mientras que a las plantas sin Mycoral<sup>®</sup> se observó un incremento de la incidencia de 9% (Cuadro3).

Severidad: se observó infección natural a los 30DDI, siendo menor en las plantas con Mycoral<sup>®</sup>. A los 45 DDI se observó un incremento en el grado de severidad, siendo menor en las plantas con Mycoral<sup>®</sup>. También se puede apreciar que el patógeno tuvo la capacidad de infectar a las plantas (incidencia) pero no fue muy patogénico, ya que el grado de severidad observado en todas las plantas no fue muy alto; aunque este siempre fue significativamente menor en las plantas con Mycoral<sup>®</sup> (Cuadro3).A los 45 DDI, en la inoculación del patógeno, no se presentaron síntomas de daño de *M. fijiensis*. El patógeno no fue muy patogénico ya que no hubo presencia en todas las plantas.

**Cuadro 3.** Severidad natural (1 = sin daño, 9= daño severo) e incidencia (%) de *Mycosphaerella fijiensis* en meristemas de banano Gran Enano, con y sin Mycoral<sup>®</sup> (inoculante VAM), 30 y 45 días después de inoculación durante vivero. Zamorano, Honduras. 2004.

| Tratamiento              | Severidad natural (1-9) <sup>†</sup> |    | Incidencia (%) |    |
|--------------------------|--------------------------------------|----|----------------|----|
|                          | Días después de inoculación          |    |                |    |
|                          | 45                                   | 75 | 45             | 75 |
| Con Mycoral <sup>®</sup> | 2                                    | 3  | 5              | 5  |
| Sin Mycoral <sup>®</sup> | 2                                    | 4  | 12             | 22 |
| DS                       | 2                                    | 1  | 13             | 13 |
| Modelo (P<0.05)          | ns <sup>‡</sup>                      | *  | *              | *  |

<sup>†</sup>:(1 = sin daño, 9 = daño severo).

<sup>‡</sup>ns: no significativo.

\*: significativo.

Diámetro del pseudotallo: no se encontró diferencias significativas ni al inicio ni al final del estudio; las medias de cada tratamiento fueron parecidas (Cuadro 4).

La altura inicial y final: al inicio del experimento (al realizar la inoculación) no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Al final del experimento se observó que las plantas con Mycoral<sup>®</sup> crecieron más que las testigos (8 %) (Cuadro 4). El incremento tan bajo de las plantas se debe a condiciones climáticas de la región que no son favorables para el banano (Solís 2003), el corto tiempo de evaluación. Es posible que se encuentren diferencias en fechas posteriores.

**Cuadro 4.** Diámetro (mm) y altura (cm) de meristemo de banano Gran Enano, con y sin

Mycoral<sup>®</sup>, evaluadas al inicio de la inoculación con el patógeno y al final del estudio, durante vivero. Zamorano, Honduras. 2004.

| Tratamiento              | Diámetro (mm)   |       |            | Altura (cm) |       |            |
|--------------------------|-----------------|-------|------------|-------------|-------|------------|
|                          | Inicial         | Final | Diferencia | Inicial     | Final | Diferencia |
| Con Mycoral <sup>®</sup> | 7               | 19    | 11         | 6           | 28    | 22         |
| Sin Mycoral <sup>®</sup> | 7               | 19    | 11         | 6           | 26    | 20         |
| DS                       | 1               | 3     | 3          | 2           | 3     | 2          |
| Modelo (P<0.05)          | ns <sup>b</sup> | ns    | ns         | ns          | *     | *          |

<sup>b</sup>ns: no significativo.

\*: significativo.

### Cormos de banano Gran Enano.

Incidenia: hubo diferencias significativas a los 30 días DDI entre los tratamientos. Las plantas con Mycoral<sup>®</sup> presentaron 3% menos de incidencia de *M. fijiensis* que sin Mycoral<sup>®</sup>. En la segunda evaluación (45DDI), en las plantas con Mycoral<sup>®</sup> se aumentó en el daño un 9% que en la primera evaluación, mientras que plantas sin Mycoral<sup>®</sup> se observó un incremento de 15% (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Incidencia de *Mycosphaerella fijiensis* en cormos de banano Gran Enano, con y sin Mycoral<sup>®</sup> a 30 y 45 días después de inoculación, durante vivero. Zamorano, Honduras. 2004.

| Tratamiento              | Días después de inoculación |    |
|--------------------------|-----------------------------|----|
|                          | 30                          | 45 |
| Con Mycoral <sup>®</sup> | 10                          | 19 |
| Sin Mycoral <sup>®</sup> | 13                          | 27 |
| DS                       | 10                          | 7  |
| Modelo (P<0.05)          | *                           | *  |

\*: significativo.

Severidad: Se evaluó la infección natural por plantas dispersoras a los 30 DDI. No se encontró diferencias significativas en plantas con y sin Mycoral<sup>®</sup> (Cuadro 6). En la segunda evaluación (45 DDI), se encontró diferencias significativas entre los tratamientos; se observó que las plantas con Mycoral<sup>®</sup> tuvieron menor severidad del daño con respecto a plantas sin Mycoral<sup>®</sup> (Cuadro 6). Además se evaluó el daño provocado por inoculación a los 45 y 75 DDI, no se encontró diferencias significativas entre plantas tratadas con y sin Mycoral<sup>®</sup>. (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Severidad natural y por inoculación (grado) de *Mycosphaerella fijiensis* en cormos de Gran Enano con y sin Mycoral® a 30, 45 y 75 días después de inoculación durante vivero. Zamorano, Honduras.

| Tratamiento     | Días después de infección            |    |  |    |
|-----------------|--------------------------------------|----|--|----|
|                 | 30                                   | 45 | 45   | 75 |
|                 | Severidad natural (1-9) <sup>†</sup> |    | Severidad por inoculación (1-6) <sup>‡</sup> |    |
| Con Mycoral®    | 2                                    | 3  | 1  | 4  |
| Sin Mycoral®    | 2                                    | 4  | 1  | 4  |
| DS              | 1                                    | 1  | 0  | 1  |
| Modelo (P<0.05) | ns <sup>§</sup>                      | *  | ns   | ns |

<sup>†</sup>: (1 = sin daño, 9 = daño severo).

<sup>‡</sup>: (1 = sin daño, 6 = daño severo).

<sup>§</sup>ns: no significativo.

\*:significativo.

Diámetro del pseudotallo: no se encontró diferencias significativas al inicio ni al final del estudio; lo que se puede atribuir a estrés ocasionado por temperaturas baja (< 14°C ) (cuadro 7).

Altura inicial y final: al inicio del experimento (al realizar la inoculación), no se encontró una diferencia significativa entre tratamientos debido a que se seleccionaron plantas homogéneas. Al final del estudio se encontró una diferencia significativa entre tratamientos, en donde plantas con Mycoral® aumentaron su crecimiento 14 % más que las plantas sin Mycoral® a los 5 meses de crecimiento bajo sistema de vivero (cuadro 7) El crecimiento durante el corto plazo del estudio no es significativo, por otro lado, plantas no crecieron adecuadamente debido a condiciones climáticas desfavorables (Solís 2003).

**Cuadro 7.** Diámetro y altura de cormos de banano Gran Enano, tratadas con Mycoral® y sin Mycoral®, evaluadas al inicio de la inoculación y al final del estudio, durante vivero. Zamorano, Honduras.

| Tratamiento     | Altura (cm)     |       |            | Diámetro (mm) |            |
|-----------------|-----------------|-------|------------|---------------|------------|
|                 | Inicial         | Final | Diferencia | Final         | Diferencia |
| Con Mycoral®    | 22              | 30    | 8          | 28            | 7          |
| Sin Mycoral®    | 22              | 29    | 7          | 27            | 7          |
| DS              | 2               | 2     | 1          | 1             | 0          |
| Modelo (P<0.05) | ns <sup>§</sup> | *     | *          | ns            | ns.        |

<sup>§</sup>ns: no significativo.

\*: significativo.

El porcentaje de mortalidad, afectó únicamente a meristemos de banano Gran Enano. Se encontró que las plantas con Mycoral® tuvieron una mortalidad del 4.62% y las plantas sin Mycoral® de 13.85%. La mortalidad fue causada por estrés de radiación solar en los primeros días de trasplante.

Porcentaje de infección de VAM de la raíz: Se encontró que la plantas tratadas con Mycoral<sup>®</sup> presentaron mayor porcentaje de infección de micorrizas y las plantas sin Mycoral<sup>®</sup> mostraron infección por micorrizas nativas. En cormos de plátano Curaré Enano tratadas con Mycoral<sup>®</sup> presentaron 27% mas infección que plantas Sin Mycoral<sup>®</sup>. En cormos de banano Gran Enano, tratadas con Mycoral<sup>®</sup> presentaron 61% mas infección que plantas sin Mycoral<sup>®</sup> y en meristemos de Gran Enano con Mycoral<sup>®</sup> se observo un aumento de 10% de infección de micorrizas que sin Mycoral<sup>®</sup> mostraron

**Cuadro 8.** Promedios de infección (%) con VAM de la raíz, en cormos de plátano Curaré Enano, meristemos y cormos de banano Gran Enano, tratadas con y sin Mycoral<sup>®</sup>. Zamorano, Honduras.2004.

| Material                       | Tratamiento              | Infección (%) |
|--------------------------------|--------------------------|---------------|
| Cormo de plátano Curaré Enano  | Con Mycoral <sup>®</sup> | 67            |
|                                | Sin Mycoral <sup>®</sup> | 40            |
| Cormo de banano Gran Enano     | Con Mycoral <sup>®</sup> | 86            |
|                                | Sin Mycoral <sup>®</sup> | 25            |
| Meristemo de banano Gran Enano | Con Mycoral <sup>®</sup> | 82            |
|                                | Sin Mycoral <sup>®</sup> | 72            |

## CONCLUSIONES

La inoculación de plantas en vivero con Mycoral<sup>®</sup> representó un efecto significativo en el cultivo de banano, pero no plátano.

Se adaptó con éxito el protocolo de aislamiento, conservación e inoculación de *M. fijiensis* en laboratorio en condiciones de Zamorano, lográndose 100 % de infección en las plantas de corno de banano y plátano exceptuando las plantas de meristemo de banano.

El uso de Mycoral<sup>®</sup> fue efectivo en plantas de banano de cormos y meristemas, incrementando la altura hasta un 8% en meristemas de banano Gran Enano y 7% en cormos de banano Gran Enano a los 45 DDI.

El uso de Mycoral<sup>®</sup> redujo hasta 17.% la incidencia y un grado de severidad del daño de *M fijiensis* en meristemas de banano Gran Enano y un 8 % y un grado de severidad en cormos de banano Gran Enano.

## RECOMENDACIONES

Usar Mycoral<sup>®</sup> en plantas de meristemas y cormos de banano en vivero.

Realizar aislamientos de *M fijiensis* de zonas de producción de banano (costa norte) y realizar comparaciones de comportamiento con el patógeno aislado de Zamorano.

Evaluar los efectos de Mycoral<sup>®</sup> en banano y plátano en vivero y campo, bajo condiciones climáticas adecuadas para el desarrollo del cultivo y el patógeno.

Pausterizar el medio para comparar el efecto de plantas inoculadas con y sin micorrizas, determinando los efectos benéficos de la micorriza VAM en la incidencia de sigatoka negra en banano y plátano.

Evaluar el efecto del Mycoral<sup>®</sup> mensualmente mediante variables agronómicas, para observar su potencial productivo.

## BIBLIOGRAFIA

Belalcazar, S. 1991. El cultivo del plátano en el trópico. INIBAP.ICA. Cali, Colombia.376p.

Castaño-Zapata, J. 1994. Principios Básicos de Fitopatología.2ed.Honduras. CERED, Zamorano. 517 p.

Hernández, A; Fernández, E; García, M; Herrera, R. 1994. Perspectivas del Uso de las Micorrizas Vesiculo-Arbusculares (MVA) Como Control Biológico. Programa de resúmenes, XXVII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, 17-21 de octubre 1994, La Habana, Cuba.

Jaizme-Vega, J.; Delamo, E; Tenoury, D; Rodríguez, R. 2002. Efectos de la micorrización sobre el desarrollo de dos cultivares de platanera micro propagada (en línea). INFOMUSA Vol.11 No 1.Consultado el 3 de agosto de 2004. Disponible en: <http://www.inibap.org/publications/infomusa/INFO11.1-SP.pdf>

Ploetz R. 1999. La más importante enfermedad de la fruta más importante. Saninet (en línea). Consultado el 23 de enero de 2004. Disponible en: <http://www.icasaninet.net/pub/sanveg/html/aps/banano/sigatokanegra.html>

Raddatz, E. 2001. VAM y la resistencia de las plantas contra causantes de daños. Cali, Colombia (en línea). Consultado el 10 de agosto de 2004. Disponible en: [www.mycoral.de](http://www.mycoral.de)

Solís, J. 2003. Efecto de la micorriza vesículo-arbuscular, Mycoral<sup>®</sup>, en vitroplantas de banano y plátano en vivero. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo. El Zamorano. Honduras. 16 p.

Suquilanda, M. 2001. Manejos Alternativos de Sigatoka Negra (en línea). Proyecto SICA Consultado el 3 de septiembre de 2004. Disponible en: [http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/organicos/organicos\\_ecuador/sigatoka\\_organico.htm](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/organicos/organicos_ecuador/sigatoka_organico.htm)

## ANEXOS

**Anexo 1.** Medio Papa Dextrosa Agar (PDA), usado en el Laboratorio de Biotecnología, Zamorano

Materiales 35 g de PDA, 1 litro de agua destilada.

Procedimiento:

1. Agregar 35 g de PDA en un Erlenmeyer con un litro de agua destilada y mezclar hasta disolver el PDA (utilizar el agitador).
2. Colocar el medio en el autoclave por 20 minutos a 121° C.  
Dejar enfriar la solución hasta que la mano soporte el calor y agregar tetraciclina para evitar contaminación bacteriana.

**Anexo 2.** Medio de agar-agua usado en el Laboratorio de Biotecnología, Zamorano.

Materiales 20 g de agar, 1 litro de agua destilada

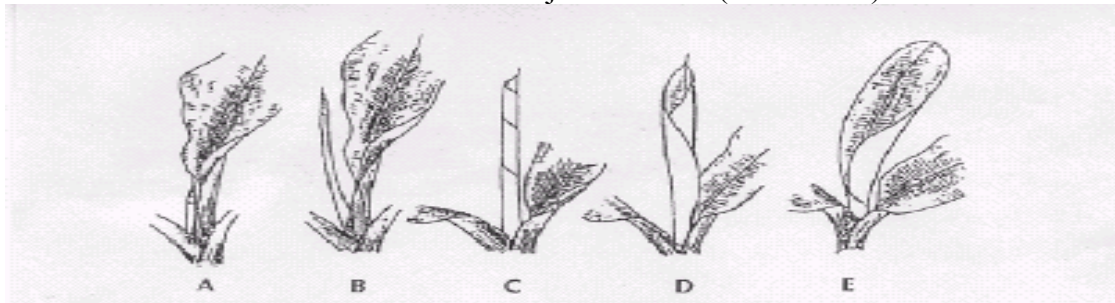
Procedimiento:

1. Agregar 20 g de agar en un Erlenmeyer con 1 litro de agua destilada y mezclarlo manualmente hasta disolver el agar.
2. Colocar el medio al autoclave, esterilizándolo por 20 minutos a 121 ° C.
3. Agregar tetraciclina.

NOTA:

- Se deberá agregar tetraciclina a los medios a razón de 0.13 g / 300 ml de medio.
- Empacar, rotular y guardar los platos petri con medio a 4° C en el refrigerador.

**Anexo 3.** Estadios de desarrollo de una hoja de banano (Jones 2000).



Fuente: Jones, D. 2000. Diseases of Banana Abacá and Enset. CAB International, New York, USA. 544p.

**Estadio A:** La hoja 'candela', de aproximadamente 10 cm, todavía se encuentra unida a la hoja anterior.

**Estadio B:** La hoja 'candela' más grande, pero aún no ha alcanzado su tamaño.

**Estadio C:** La hoja 'candela' está completamente libre. Alcanza su tamaño total y el diámetro de su ápice ha aumentado considerablemente después de soltarse del espiral.

**Estadio D:** El lado izquierdo ya está abierto y su apertura ocurre en el extremo del ápice.

**Estadio E:** La parte de arriba de la hoja se abre y la base tiene la forma de una corneta abierta.

**Anexo 4.** Escala de evaluación del daño para determinar la severidad de la sigatoka negra, (Galan 1992)<sup>1</sup>, Zamorano, Honduras.2004.

| Estado | Síntomas   |
|--------|--|
| 1      | no hay presencia de enfermedad   |
| 2      | Aparición de puntos muy pequeños, ligeramente amarillos de menos de 1 mm de largo, no muy visibles   |
| 3      | Los puntos se han convertido en estrías de 3 - 4 mm de largo por 1 mm de ancho de color amarillo verdoso a amarillo  |
| 4      | Las estrías aumentan de tamaño, los bordes no están definidos y se confunden con el color normal de las hojas. El color cambia a marrón o rojo oxidado   |
| 5      | La mancha tiene un borde definido con un centro marrón y un halo amarillo a ligeramente marrón algunas veces con un borde acuoso.  |
| 6      | El centro oscuro de la mancha se hunde y el halo acuoso se vuelve marrón oscuro  |
| 7      | la mancha se ha desarrollado totalmente. El área central, hundida, se vuelve gris y se ve rodeada por un borde negro o marrón oscuro a veces con un halo amarillo entre el borde y el verde normal de la hoja. |

<sup>1</sup>Fuente: Galan, V. 1992. Los frutales tropicales en los subtropicos. Madrid, España.172 p

**Anexo 5.** Escala de evaluación para enfermedades, adaptado a *M. Fijiensis*, Zamorano, Honduras. 2004.

| <b>Clasificación</b> | <b>Severidad</b> | <b>Categoría</b> | <b>Descripción</b>                                   | <b>Incidencia (%)</b> |
|----------------------|------------------|------------------|--|-----------------------|
| 1                    | Ausente          |                  | Sintomas no visibles                                 | 0                     |
| 2                    | Dudoso           | Resistente       | o muy leves  | 1 a 10                |
| 3                    | Débiles          |                  |  | 11 a 25               |
| 4                    | Moderados        |                  | Sintomas visibles y conspicuos que solo ocasionan un | 26 a 40               |
| 5                    | Intermedios      | Intermedio       | daño económico limitado                              | 41 a 60               |
| 6                    | Generales        |                  |  | 61 a 75               |
| 7                    | Intensos         |                  | Sintomas severos a muy severos que causan            | 76 a 90               |
| 8                    | Severos          | Suceptible       | perdidas considerables en el rendimiento             | 91 a 99               |
| 9                    | Muerte           |                  |  | 100                   |
|                      |                  |                  | o en la muerte de la planta                          |                       |

**Anexo 6.** Método para clarificar y teñir muestras de raíces, usado en el Laboratorio de Biotecnología, Zamorano, Honduras. 2004.

#### Sugerencias

- A. Utilizar equipo apropiado para mayor seguridad y protección personal (anteojos, guantes y delantal).
- B. Utilizar “cassettes” plásticos (denso polymer tissue “cassettes” de Fisher Scientific) para retener las muestras de raíces.
- C. Todas las etapas que incluyan calentamiento de químicos deben ser manejadas y supervisadas cuidadosamente.
- D. Lea cuidadosamente todas las instrucciones antes de empezar el proceso

#### Procedimiento de clarificación:

1. Prepare los “cassettes” con muestras de raíces y manténgalos en agua hasta que todo esté listo para iniciar el proceso.
2. En un “beaker”, vierta una solución de KOH al 10% de modo que cubra todos los cassettes.
3. Caliente el KOH hasta 80 °C de temperatura.
4. Coloque los cassettes en el KOH caliente durante:
  - 15 minutos para cebolla y otras raíces tiernas,
  - 30 minutos para la mayoría de raíces (p.e. maíz, gramíneas)

5. Lave con agua cinco veces.

Nota: Si las muestras de raíces tienen pigmentos oscuros (p.e. cafés, negros, morados) después de clarificarlas con KOH, coloque los cassettes en un beaker con 30% de agua oxigenada a temperatura ambiente (10 minutos a  $\leq 50$  °C) hasta que las muestras se aclaren. Revíselas constantemente para evitar daños en las estructuras de las raíces. Enjuague cinco veces con agua y proceda. En caso de no tener agua oxigenada, cubra los cassettes con HCl (5.0 ml) y agua (200 ml). Mezcle y desagüe. Repítalo otra vez (no enjuague los cassettes con agua).

#### Procedimiento de tinción

1. En un beaker, vierta suficiente cantidad de Azul de Tripano (0.05%) para cubrir los cassettes.
2. Caliente el tinte azul sin los cassettes hasta 80 °C de temperatura.
3. Coloque los cassettes en el tinte caliente y mantenga la temperatura en 80 °C. Después de 30 minutos, deje enfriar hasta que la temperatura sea menor de 50 °C; luego filtre el tinte para remover pedazos de raíces y almacénelo bajo refrigeración en un frasco. Enjuague los cassettes una sola vez con agua.
4. En una placa, monte varias raíces para su observación y cúbralas con el cubreobjetos presionando levemente. Las raíces se deben manipular con pinzas y guantes ya que el tinte es cancerígeno. En caso de no visualizar claramente las estructuras del hongo, coloque las raíces en un plato de petri con agua para enjuagarlas y luego observe.
5. Si no se van a analizar las muestras el mismo día, colóquelas en el refrigerador en una bolsa plástica etiquetada.

#### Preparación del tinte azul de tripano (0.05%)

En un frasco, añada y mezcle constantemente los ingredientes en el siguiente orden:

- 1) 800 ml glicerina
- 2) 800 ml ácido láctico
- 3) 800 ml agua destilada
- 4) 1.2 g del tinte Azul de Tripano

#### Cuidados:

- Entre cada muestra, lave los tamices con agua a presión para evitar contaminación. En caso de ser necesario, use jabón.
- Las esporas pueden ser contadas fácilmente en un plato de petri dividido en cuadrículas.
- Recupere las raíces recolectadas en el tamiz más grande para observar los propágulos del hongo y/o el grado de colonización.
- Normalmente se usa el tamiz de 425 micrones para recolectar esporas de tamaños desconocidos provenientes de muestras del campo.
- El KOH y el Azul de Tripano pueden ser reutilizados.