

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA**

**“INOCULACIÓN COMBINADA DE HONGOS
MICORRÍFICO-ARBUSCULARES Y *Azospirillum spp.* EN
PLÁNTULAS DE BANANO (*Musa paradisiaca*)
MICROPROPAGADAS: EFECTOS SOBRE EL
DESARROLLO Y CRECIMIENTO DURANTE LA FASE
DE ACLIMATACIÓN”**

Previo a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

TANIA CARINA VILLARREAL VILLARREAL

SANGOLQUÍ, mayo de 2012

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Srta. Tania Carina Villarreal Villarreal

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Tatiana Páez

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Carlos Orozco Bravo, MSc.

Sangolquí, mayo de 2012

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. TANIA CARINA VILLARREAL VILLARREAL como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Fecha

Dra. María Emilia Medina Ph.D.
DIRECTORA

Dr. Santiago Ulloa C. Ph.D.
CODIRECTOR

DECLARACION DE RESPONSABILIDAD

Tania Carina Villarreal Villarreal

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “INOCULACIÓN COMBINADA DE HONGOS MICORRÍCICO-ARBUSCULARES Y *Azospirillum spp.* EN PLÁNTULAS DE BANANO (*Musa paradisiaca*) MICROPROPAGADAS: EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO Y CRECIMIENTO DURANTE LA FASE DE ACLIMATACIÓN” ,ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, mayo de 2012

Tania Carina Villarreal Villarreal

AUTORIZACIÓN

Yo, Tania Carina Villarreal Villarreal

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “INOCULACIÓN COMBINADA DE HONGOS MICORRÍFICOS ARBUSCULARES Y *Azospirillum spp.* EN PLÁNTULAS DE BANANO (*Musa paradisiaca*) MICROPROPAGADAS: EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO Y CRECIMIENTO DURANTE LA FASE DE ACLIMATACIÓN” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, mayo de 2012

Tania Carina Villarreal Villarreal

DEDICATORIA

Con todo mi amor dedico este trabajo

A mis padres Patricio y Miriam, por enseñarme a luchar incansablemente por mis sueños, por ser mi ejemplo a seguir y mi refugio incondicional.

A mis hermanos Daniel y Valeria, porque más que hermanos han sido siempre amigos incondicionales.

A mis abuelitos Alicia, Carlos, Piedacita y Demetrito[†]; porque han dejado una huella imborrable de amor en mi corazón.

A Daniel, por su interminable amor, apoyo y ternura.

A todos quienes luchan por construir un futuro mejor para nuestra gente.

Tania Carina Villarreal Villarreal

AGRADECIMIENTO

Te agradezco Dios mío porque en el camino para lograr esta meta siempre sostuviste mi mano y nunca me abandonaste, porque a través de ti aprendí a valorar mis logros, a meditar mis decisiones y a aceptar mis errores. Gracias por el amor de los míos y por este maravilloso sueño que he cumplido.

Agradezco a la Dra. María Emilia Medina por haberme abierto las puertas del laboratorio, por darme la oportunidad de trabajar con ella y por confiar en mis capacidades. Al Dr. Santiago Ulloa por su buena disposición para co-dirigir este trabajo de investigación y por siempre estar presto a ayudarme.

Gracias a mis padres Patricio y Miriam por su incansable esfuerzo para formarme no solo como profesional sino también como ser humano, por enseñarme que el éxito se logra en base al trabajo, honestidad, humildad y paciencia.

Gracias a mis hermanos Daniel y Valeria porque hemos caminado juntos gran parte de nuestras vidas, por sus cuidados y amor, y porque sin importar el rumbo que tomemos en esta vida, siempre nos tendremos el uno al otro.

Agradezco a mis abuelitos Alicia, Piedacita, Carlos y Demetrito porque han sido los pilares sobre los que se ha formado nuestra familia y porque gracias a su ejemplo y amor, siempre permaneceremos juntos.

Gracias a mis tíos y primos por su cariño y aliento, por haber aportado con su granito de arena para que este sueño se haga realidad.

Agradezco a mis amigas incondicionales Paty y Elsita por enseñarme a dar lo mejor de mí. A tí Patita porque a pesar de no vernos constantemente, siempre me has dado la seguridad de contar con tu amistad. Y a ti mi Elsita porque has estado conmigo a lo largo de este camino, por comprenderme y apoyarme siempre.

A mi Daniel, por acercarme a Dios, por tener las palabras justas para darme ánimo, por los halones de oreja que necesitaba y por tu infinito amor.

A Pauli por todas las palabras de aliento y las oraciones para que este día al fin llegara.

A la Dra. Soledad Benítez por su asesoría en el inicio de esta tesis. A la Dra. Alma Koch por su generosa ayuda en temas metodológicos y su buena disposición a apoyar los trabajos

de investigación. A los profesionales del Programa de Maíz del INIAP, por abrirme las puertas para enriquecerme con su valioso conocimiento.

A los chicos del labo Estefi, Chabe, Silvi, Caro, Daniel, Ibeth y Elisa por tantos momentos maravillosos de trabajo pero también de alegría y complicidad.

Y a todas las personas que de una u otra manera han contribuido a que este sueño hoy se convierta en realidad.

Tania Carina Villarreal Villarreal

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	ix
LISTADO DE TABLAS	xii
LISTADO DE FIGURAS	xiv
LISTADO DE ANEXOS	xvi
NOMENCLATURA	xvii
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xx
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	4
1.3 Objetivos de la investigación	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos	6
1.4 Marco teórico	7
1.4.1 Características generales del cultivo de banano	7
1.4.2 Requerimientos nutricionales del cultivo.....	8
1.4.3 Consideraciones finales.....	11
1.4.4 Componentes microbianos del suelo.....	11
1.4.5 Interacciones <i>Azospirillum</i> -HMA.....	28
1.4.6 Ventajas de la inoculación de HMA y PGPR sobre plantas micropropagadas.....	29
1.5 Hipótesis	30
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1 Participantes.....	31
2.2 Zona de estudio	31
2.3 Período de investigación.....	31
2.4 Selección del material vegetal y microbiológico.....	31

2.5	Procesamiento de muestras, extracción y conteo de esporas	32
2.6	Tinción de raíces	34
2.7	Determinación del porcentaje de colonización	35
2.8	Propagación de esporas de HMA nativas del cultivo de banano.....	35
2.9	Preparación del inóculo micorrícico.....	36
2.10	Esterilización y preparación de sustrato	37
2.11	Adecuación de cámara de crecimiento	38
2.12	Diseño Experimental	38
2.13	Trasplante de plántulas de banano.....	40
2.14	Riego y control de condiciones ambientales.....	41
2.15	Aislamiento de <i>Azospirillum spp.</i>	42
2.15.1	Aislamiento de bacterias diazótroficas a partir de suelo.....	42
2.15.2	Aislamiento de bacterias diazótroficas a partir de raíz	43
2.16	Determinación del número más probable (NMP) de bacterias diazótroficas	44
2.17	Confirmación del género.....	44
2.18	Purificación.....	45
2.19	Pruebas de identificación.....	45
2.19.1	Pruebas fenotípicas	45
2.19.2	Pruebas bioquímicas	47
2.20	Selección de la cepa inóculo de acuerdo a su capacidad de producción de ácido 3-indol acético AIA	48
2.20.1	Curva patrón de ácido-3-indol acético (AIA).....	48
2.20.2	Determinación de la concentración de AIA en cultivos de <i>Azospirillum</i>	50
2.21	Desarrollo del inóculo bacteriano.....	51
2.22	Inoculación en plantas de banano.....	52
2.23	Monitoreo y Evaluación final.....	52
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....		54
3.1	Propagación de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) nativos del cultivo de banano (<i>Musa paradisiaca</i>).....	54
3.2	Densidad poblacional de bacterias diazótroficas en muestras de suelo y raíces de banano ...	55
3.3	Aislamiento e identificación de <i>Azospirillum spp.</i>	56
3.3.1	<i>Identificación fenotípica</i>	56
3.3.2	<i>Identificación bioquímica</i>	58
3.4	Selección de la cepa de <i>Azospirillum</i> para la preparación del inóculo bacteriano	58

3.5	Evaluación del efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el crecimiento de plántulas de banano micropropagadas	60
3.5.1	<i>Altura</i>	61
3.5.2	<i>Perímetro</i>	66
3.5.3	<i>Área foliar</i>	72
3.5.4	<i>Biomasa aérea</i>	77
3.5.5	<i>Biomasa radical</i>	81
3.5.6	<i>Contenido de nutrientes</i>	86
3.5.7	<i>Población de esporas de HMA</i>	94
3.5.8	<i>Porcentaje de colonización micorrícica</i>	96
3.5.9	<i>Población final de Azospirillum en suelo y raíces</i>	99
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN		101
4.1	Propagación de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) nativos del cultivo de banano (<i>Musa paradisiaca</i>).....	101
4.2	Densidad poblacional de bacterias diazótroficas en muestras de suelo y raíces de banano ..	102
4.3	Aislamiento e identificación de <i>Azospirillum spp.</i>	103
4.3.1	<i>Aislamiento</i>	103
4.3.2	<i>Identificación fenotípica</i>	103
4.3.3	<i>Identificación bioquímica</i>	104
4.4	Selección de la cepa de <i>Azospirillum</i> para la preparación del inóculo bacteriano	105
4.5	Evaluación del efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el crecimiento de plántulas de banano micropropagadas	105
4.5.1	Efectos sobre el crecimiento y desarrollo vegetal.....	105
4.5.2	Efectos sobre el contenido de nutrientes en suelo y tejido foliar.....	110
4.5.3	Efectos sobre la simbiosis micorrícica y crecimiento bacteriano	115
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES		118
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....		120
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA		121
ANEXOS		138

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Tratamientos aplicados en las plántulas de banano.....	39
Tabla 2.2. Proporciones de inóculo y sustrato para cada tratamiento.....	40
Tabla 2.3 Soluciones de AIA para la curva patrón.....	48
Tabla 3.1 Localización geográfica de los puntos de muestreo de suelo y raíces para el aislamiento de <i>Azospirillum</i>	55
Tabla 3.2 Densidad poblacional de bacterias diazótrofes en suelo y raíces.....	56
Tabla 3.3 Características morfológicas de las cepas de <i>Azospirillum</i> aisladas de suelo y raíces del cultivo de banano.....	57
Tabla 3.4 Características bioquímicas de las cepas del género <i>Azospirillum</i> aisladas de suelo y raíces del cultivo de banano.....	58
Tabla 3.5 Efecto de la inoculación de HMA sobre el incremento de altura para el período 0-70 días.....	62
Tabla 3.6 Prueba de hipótesis para la comparación de alturas promedio para el período 70-150 días.....	62
Tabla 3.7 Efecto de la inoculación de HMA sobre el incremento de altura para el período 70-150 días.....	63
Tabla 3.8 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el incremento de altura para el período 70-150 días.....	63
Tabla 3.9 Efecto de la inoculación de HMA sobre el incremento de perímetro para el período 0-70 días.....	67
Tabla 3.10 Efecto de la inoculación de HMA sobre el incremento de perímetro para el período 70-150 días.....	67
Tabla 3.11 Prueba de hipótesis para la comparación de medias (perímetro) para el período 70-150 días.....	68
Tabla 3.12 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el incremento de perímetro para el período 70-150 días.....	69
Tabla 3.13 Prueba de hipótesis para la comparación de medias (área foliar) para el período 70-150 días.....	73

Tabla 3.14 Efecto de la inoculación de HMA sobre el incremento de área foliar para el período 70-150 días.....	73
Tabla 3.15 Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum</i> sobre el incremento de área foliar para el período 70-150 días.....	73
Tabla 3.16 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el incremento de área foliar para el período 70-150 días.....	74
Tabla 3.17 Prueba de hipótesis para la comparación de medias (biomasa aérea)...	77
Tabla 3.18 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre la biomasa aérea.....	78
Tabla 3.19 Prueba de hipótesis para la comparación de medias (biomasa radical)	81
Tabla 3.20 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre la biomasa radical.....	82
Tabla 3.21 Prueba de hipótesis para la comparación de medias de la población de esporas de HMA.....	94
Tabla 3.22 Efecto de la inoculación de HMA sobre la población final de esporas de HMA.....	94
Tabla 3.23 Efecto de la inoculación con <i>Azospirillum</i> sobre la población final de esporas de HMA.....	95
Tabla 3.24 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el incremento la población final de esporas de HMA.....	96
Tabla 3.25 Prueba de hipótesis para la comparación de medias del porcentaje de colonización micorrícica.....	97
Tabla 3.26 Efecto de la inoculación de HMA el porcentaje de colonización micorrícica.....	98
Tabla 3.27 Efecto de la inoculación con <i>Azospirillum</i> sobre el porcentaje de colonización micorrícica.....	98
Tabla 3.28 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el porcentaje de colonización micorrícica.....	99
Tabla 3.29 Población final de <i>Azospirillum</i> en suelo y raíces de banano.....	100

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Clasificación de las Micorrizas de acuerdo a su estructura, morfología y modo de infección.....	13
Figura 1.2 Ciclo de vida de HMA y sus fases: asimbiótica, presimbiótica y simbiótica.....	15
Figura 1.3 Esquema del arbusculo de HMA.....	17
Figura 1.4 Vías de síntesis de AIA de <i>Azospirillum</i>	25
Figura 2.1 Elaboración de cultivo trampa para propagación de esporas de HMA	36
Figura 2.2 Preparación de inóculo micorrícico.....	37
Figura 2.3 Preparación del sustrato.....	38
Figura 2.4 Aplicación de tratamientos y trasplante.....	41
Figura 2.5 Reacción colorimétrica generada a partir de soluciones patrón de AIA.	49
Figura 2.6 Evaluación final.....	53
Figura 3.1 Conteo poblacional de esporas de HMA nativas del cultivo de banano..	54
Figura 3.2 Incremento de la densidad poblacional de esporas de HMA en cultivo trampa de avena.....	55
Figura 3.3 Curva patrón de ácido indól acético.....	59
Figura 3.4 Concentración de AIA producido por las cepas de <i>Azospirillum</i>	60
Figura 3.5 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el incremento de altura para el período 70-150 días.....	64
Figura 3.6 Curvas de regresión para la variable altura a los 0, 70, 98 y 150 días....	65
Figura 3.7 Comparación de la altura de individuos sometidos a las diferentes dosis de micorrizas en ausencia de <i>Azospirillum</i>	66
Figura 3.8 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el incremento de perímetro para el período 70-150 días.....	70
Figura 3.9 Curvas de regresión para la variable perímetro a los 0, 70, 98 y 150 días.....	71
Figura 3.10 Comparación de la altura de individuos sometidos a las diferentes dosis de micorrizas en ausencia de <i>Azospirillum</i>	72

Figura 3.11 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el incremento del área foliar para el período 70-150 días.....	75
Figura 3.12 Curvas de regresión para la variable área foliar en relación a la interacción HMA- <i>Azospirillum</i>	76
Figura 3.13 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre la biomasa aérea de plantas de banano.....	79
Figura 3.14 Curvas de regresión para la variable biomasa aérea en relación a la interacción HMA- <i>Azospirillum</i>	80
Figura 3.15 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre la biomasa radical de plantas de banano.....	83
Figura 3.16 Comparación de la densidad radical entre individuos del grupo control e inoculados con HMA y/ó <i>Azospirillum</i>	84
Figura 3.17 Curvas de regresión para la variable biomasa radical en relación a la interacción HMA- <i>Azospirillum</i>	85
Figura 3.18 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el contenido de Nitrógeno en tejido foliar.....	87
Figura 3.19 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el contenido de fósforo en tejido foliar.....	88
Figura 3.20 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el contenido de potasio en tejido foliar.....	89
Figura 3.21 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el contenido de nitrógeno en suelo.....	91
Figura 3.22 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el contenido de fósforo en suelo.....	92
Figura 3.23 Efecto de la inoculación de HMA y <i>Azospirillum</i> sobre el contenido de potasio en suelo.....	93
Figura 3.24 Estructuras de HMA encontradas en el interior de las raíces de banano.....	97

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A. SOLUCIÓN NUTRITIVA DE HEWITT.....	138
ANEXO B. MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE <i>Azospirillum spp.</i>	139
ANEXO C. TABLA DE MC CRADY PARA LA DETERMINACIÓN DEL NMP..	141
ANEXO D. TINCIÓN GRAM MODIFICADA POR HUCKER.....	142
ANEXO E. REACTIVO DE SALKOWSKI PARA LA DETECCIÓN DE AIA.....	143
ANEXO F. CONTENIDO DE MICRONUTRIENTES EN TEJIDO FOLIAR DE PLÁNTULAS DE BANANO.....	144
ANEXO G. CONTENIDO DE MICRONUTRIENTES EN SUELO DE PLÁNTULAS DE BANANO.....	145
ANEXO H. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y METABÓLICAS DEL GÉNERO <i>Azospirillum</i>	146

NOMENCLATURA

AIA:	ácido indol acético
Ca:	calcio
cm:	centímetro
Cu:	cobre
Fe:	hierro
g:	gramo(s)
h:	hora(s)
H ₂ O ₂ :	peróxido de hidrógeno
HCl:	ácido clorhídrico
HMA:	hongo(s) micorrícicos arbuscular(es)
HR:	humedad relativa
K:	potasio
KOH:	hidróxido de potasio
L:	litro(s)
lb:	libra(s)
m:	metro
meq:	miliequivalentes
Mg:	magnesio
MHB:	<i>Mycorrhiza helper bacteria</i>
ml:	mililitro(s)
mm:	milímetro (s)
Mn:	manganeso
Mo:	molibdeno
N:	normal
N ₂ :	nitrógeno atmosférico
NFb:	nitrogen fixation biological

NH ₄ :	amonio
nl:	nanolitros
nm:	nanómetros
NMP:	número más probable
°C:	grados Celsius
P:	fósforo
PGPR:	<i>Plant growth promoting rhizobacteria</i>
pH:	potencial de hidrógeno
PHB:	poli-β-hidroxibutirato
ppm:	partes por millón
rpm:	revoluciones por minuto
S:	azufre
Trp:	triptófano
TSB:	caldo tripticasa de soya
UFC:	unidades formadoras de colonias
W:	watts
Zn:	zinc
μg:	microgramo(s)
μl:	microlitro(s)
μm:	micrómetro

RESUMEN

El Ecuador es uno de los principales países productores de banano en el mundo con una superficie de cultivo de 230.000 hectáreas (32% de la producción mundial), ubicadas principalmente en las provincias de El Oro, Guayas y Los Ríos. En la región, la actividad bananera es de gran importancia para la economía, por lo que resulta imprescindible analizar y reformar el sistema clásico de producción, mediante la aplicación de alternativas orgánicas que tiendan a reducir el uso de agroquímicos y permitan el desarrollo de una producción agrícola sostenible.

En este contexto en la presente investigación se analizó el efecto tanto de hongos micorrícicos arbusculares como de *Azospirillum* sobre el desarrollo y crecimiento de plántulas de banano micropropagadas, durante su fase de aclimatación. En primera instancia se aislaron y propagaron esporas de HMA nativas de cultivo de banano, posteriormente se llevó a cabo el aislamiento de *Azospirillum* de suelos y raíces de banana y se seleccionó la cepa bacteriana con mayor capacidad de producción de ácido indol acético. (G4b 6,33 ug/ml). Se realizó la aplicación del inóculo micorrícico en diferentes dosis (0, 50, 100 y 200 g conteniendo 10 esporas/g) en el momento del trasplante de las plántulas de banano, al cabo de 70 días se realizó una primera inoculación de 20 ml del inóculo de *Azospirillum* (0, $1,5E^6$ UFC/ml, $1,5E^7$ UFC/ml y $1,5E^8$ UFC/ml) y a los 98 días se inoculó una segunda dosis de 40 ml de *Azospirillum* en las concentraciones señaladas. Transcurridos cinco meses, la evaluación del ensayo mostró en forma general que las plantas de banano co-inoculadas con 200 g de HMA y $1,5E^8$ UFC/ml de *Azospirillum* presentaban mayor desarrollo, mostrando un incremento de 7 veces la altura, 4 veces el perímetro, 16 veces el área foliar, 12 veces la biomasa aérea y 8 veces la biomasa radical. De igual forma, estas plantas mostraron una mejor absorción de fósforo y nitrógeno en relación a aquellas tratadas con la inoculación simple y el grupo control.

ABSTRACT

Ecuador is one of the major banana producing countries in the world with an acreage of 230,000 hectares (32% of world production), located mainly in the provinces of El Oro, Guayas and Los Rios. In the region, the banana crops are of big importance to the economy, so it is essential to analyze and reform the traditional system of production, through the use of organic alternatives that tend to reduce the use of agrochemicals and enable the development of a sustainable agriculture.

In this context the present research analyzed the effect of both, arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* on the development and growth of micropropagated banana plantlets during their acclimatization phase. In the first AMF spores from banana soils were isolated and propagated, subsequently *Azospirillum* from soil and roots of banana were isolated and bacterial strain that had the highest production capacity of indole acetic acid (G4B 6.33 ug/ml) was selected. The application of mycorrhizal inoculum at different doses (0, 50, 100 and 200 g containing 10 spores / g) at the time of transplantation banana plantlets was performed, after 70 days the first inoculation of *Azospirillum* (0, $1.5E^6$ CFU / ml, $1.5 E^7$ CFU / ml and $1.5 E^8$ CFU / ml) was applied and 98 days afterwards the start of the test it was inoculated a second dose of *Azospirillum* at the concentrations indicated above. After five months, the evaluation of the trial showed in general that banana plants co-inoculated with 200 g of AMF and $1.5E^8$ CFU / ml of *Azospirillum* experienced greater development, an increase of 7 times the height, 4 times the perimeter, 16 times the leaf area, 12 times aerial biomass and 8 times the root biomass. Also, these plants showed a better absorption of phosphorus and nitrogen relative to those treated with single inoculation and the control group.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El banano es un cultivo perenne de rápido crecimiento, que puede ser cosechado durante todo el año. La superficie cultivada a nivel mundial para el 2004 fue de aproximadamente 100 millones de hectáreas, con una producción estimada de 100 millones de toneladas (Arias *et al.*, 2004). América Latina lidera la economía mundial del banano. El Ecuador es uno de los principales países productores de esta fruta; con una superficie de cultivo de 230.000 hectáreas (32% de la producción mundial), ubicadas principalmente en las provincias de El Oro, Guayas y Los Ríos (AEBE, 2010).

Desde la década de los cincuenta el sector bananero ha constituido un pilar fundamental en el desarrollo económico de América Latina. Norteamérica y la Unión Europea captan más del 60% de la producción mundial, respaldando así una rápida expansión de esta industria. No obstante, este monocultivo se ha establecido en zonas donde anteriormente se encontraba el bosque primario. La eliminación de la cobertura forestal protectora, provoca una disminución rápida de la fertilidad del suelo y es por ello que los productores de banano emplean en forma extensiva fertilizantes y biocidas, lo que se traduce en problemas ambientales a largo plazo (WRM, 2004).

Siendo la actividad bananera de gran importancia para la economía de la región, resulta imprescindible analizar y reformar el sistema clásico de producción, mediante la aplicación de alternativas orgánicas que tiendan a reducir el uso de agroquímicos y permitan el desarrollo de una producción agrícola sostenible. Para lograr este tipo de manejo, se ha prestado especial interés en el uso de microorganismos del suelo que a través del desarrollo de relaciones simbióticas con el cultivo, mejoran la nutrición, permiten soportar condiciones de estrés y proveen

mecanismos de defensa contra patógenos (Alarcón & Ferrera-Cerrato, 2000). En este contexto tanto los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Azospirillum* han sido ampliamente estudiadas debido a que presentan gran adaptabilidad a las condiciones ambientales y edáficas de las plantaciones bananeras (Loredo et al, 2004).

Las micorrizas (*mikes*: hongo, *rhiza*: raíz) se definen como la asociación mutualista entre un hongo y las raíces de la planta, donde ambos individuos se benefician y participan en forma activa en la captación y translocación de nutrientes (Bolan, 1991; Maldonado & Ramírez, 1997; Miyasaka & Habte, 2003). En esta asociación, el hongo coloniza la corteza de la raíz sin dañar a la planta, constituyéndose fisiológica y morfológicamente parte integral de ésta. En este escenario la planta provee al hongo tanto de compuestos carbonados que provienen del proceso de fotosíntesis como de un hábitat ecológico seguro (Bolan, 1991).

Las micorrizas arbusculares se encuentran ampliamente distribuidas en todo el planeta y se estima que aproximadamente el 85-95% de las especies vegetales sobre la Tierra viven en simbiosis con este tipo de hongos (Infante, 2003). Esta simbiosis se inicia con la activación del micelio debido a la germinación de la espora fúngica, el micelio activo es el encargado de colonizar los tejidos de la raíz y su zona cortical, donde el hongo desarrolla ramificaciones denominadas arbusculos, a través de las cuales se lleva a cabo el intercambio de metabolitos entre el hongo y la planta. Además, las hifas del hongo se extienden desde la raíz hacia el suelo, formando una red tridimensional que actúa como puente y que atraviesa la zona de “agotamiento” de la rizósfera y se expande dentro de la matriz del suelo, por lo que su función principal es crítica para la captación de nutrientes que se encuentran poco disponibles para la planta como: fósforo, nitrógeno y micronutrientes (Maldonado & Ramírez, 1997).

Entre los beneficios que produce la asociación simbiótica con los HMA, se encuentran: mejor captación de nutrientes y agua, mayor desarrollo y crecimiento de

la planta, tolerancia a condiciones de estrés y resistencia frente a patógenos. Todos estos beneficios permiten a la planta mejorar su capacidad de adaptación a las condiciones cambiantes del medio lo que le confiere una ventaja competitiva frente a plantas no micorrizadas y finalmente su mayor desarrollo se traduce en mayor productividad (Maldonado & Ramírez, 1997; Sánchez, 1999).

Por su parte, el género *Azospirillum* incluye bacterias de vida libre (Okon & Labandera, 1994) que se encuentran distribuidas en regiones templadas y tropicales, presentando mayor ocurrencia en estas últimas (Döbereiner *et al.*, 1976; Patriquin *et al.*, 1983). Su importancia radica en su gran potencial de colonizar las zonas de elongación celular de las raíces presentes en la base de los pelos radicales (Bashan & Holguin, 1997a), su capacidad de fijación biológica de nitrógeno y en la producción de hormonas reguladoras de crecimiento como el ácido indol acético, que es el responsable de estimular la formación de raíces laterales y pelos absorbentes.

Bashan y Holguin (1997b) determinaron que la inoculación de *Azospirillum* es más exitosa y provechosa cuando otros microorganismos son co-inoculados. Particularmente la co-inoculación con HMA exhibe una relación sinérgica donde ambos microorganismos crecen a la par debido a que participan en la provisión de nutrientes, remueven productos inhibitorios y en este proceso facilitan el desarrollo de la planta.

Finalmente, en relación al cultivo de banano, se ha reportado que la micorrización temprana durante la fase *ex vitro* de la planta, optimiza el enraizamiento y desarrollo (Jaizme & Azcón, 1995; Jaizme & Rodríguez, 2002; Rodríguez, 2003). Esto permite concluir que el carácter micotrófico de esta especie le permite beneficiarse de la simbiosis desde las primeras fases de desarrollo, permaneciendo su efecto después del trasplante a campo (Declerck *et al.*, 1995; Jaizme *et al.*, 2004).

Existen pocas referencias sobre el uso de *Azospirillum* para potenciar el crecimiento del banano y en relación a la interacción de estas bacterias y HMA sobre este cultivo no existen reportes concluyentes, no obstante, se espera que estos dos organismos se vean obligados a interactuar durante los procesos de colonización radical puesto que comparten hábitats comunes (Barea, 1997).

1.2 Justificación del problema

Las excelentes condiciones de orden climático y ecológico que posee el Ecuador, lo han convertido en uno de los mayores productores y exportadores de banano a nivel mundial. No obstante, al igual que en la mayor parte de países donde se cultiva esta fruta, la aplicación de fertilizantes químicos en grandes proporciones para suplir la altísima demanda de nutrientes que requiere la planta, no ha cambiado a lo largo de la historia. Este hecho supone un problema ambiental grave a largo plazo debido a que los compuestos sintéticos aplicados que contienen principalmente nitrógeno, son una fuente importante de contaminación de suelos y aguas subterráneas; hecho que se ve exacerbado debido a la baja eficiencia que presentan las raíces del banano para absorber estas sustancias.

Por ello es imperativo y sumamente necesario, mejorar el manejo de cultivos de gran importancia que ocupan grandes extensiones, no solo para disminuir el impacto de la agricultura sobre el medioambiente, sino también para mejorar la productividad de los cultivos mediante su manejo sostenible; utilizando fertilizantes basados en microorganismos propios del suelo, capaces de promover el crecimiento, la productividad de la planta durante todas las fases de su desarrollo y manteniendo la fertilidad del suelo.

Es importante señalar, que además de depurar el sistema clásico de manejo del cultivo de banano, los biofertilizantes basados en microorganismos del suelo como: hongos micorrícicos arbusculares y bacterias promotoras del crecimiento

vegetal, proveen un importante soporte a las plantas de banano durante la fase ex vitro, permitiendo sobrellevar el estrés que sufren los individuos debido al trasplante y la alta tasa de mortalidad registrada; contribuyendo de esta manera al máximo aprovechamiento de los beneficios que suponen las plántulas micropropagadas en términos de sanidad vegetal y producción.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Analizar el efecto de la inoculación combinada de Hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y *Azospirillum sp.*, sobre el desarrollo y crecimiento de plántulas de banano (*Musa paradisiaca*) micropropagadas durante la fase de aclimatación.

1.3.2 Objetivos específicos

- Aislar y propagar *Azospirillum sp.* y esporas de HMA nativas del cultivo de banano.
- Inocular y determinar el efecto de diferentes dosis de HMA y *Azospirillum sp.* así como su interacción, sobre las variables de crecimiento de la planta: perímetro de pseudotallo, altura de planta, área foliar, biomasa aérea, biomasa radical y contenido de macro y micronutrientes en el tejido foliar.
- Determinar el contenido final de macro y micronutrientes del sustrato empleado para la aclimatación de las plántulas de banano.
- Evaluar el porcentaje de colonización y la población final de esporas en plántulas de banano micropropagadas durante la fase de aclimatación.
- Determinar la población final de *Azospirillum sp.* presente en el sustrato y en raíces de las plantas de banano.
- Determinar la dosis de HMA y la dosis de *Azospirillum sp.* que permitan obtener los mejores resultados respecto a las variables evaluadas.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Características generales del cultivo de banano

El cultivo del banano se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Sus frutos tienen gran aceptación en los mercados internacionales, y constituyen una fuente importante de alimentación; siendo el Ecuador uno de los principales productores de la fruta con un aporte del 32% de la producción total (Arias *et al.*, 2004; AEBE, 2010).

El banano pertenece al género *Musa*, familia de las Musaceas. Es una hierba perenne de gran tamaño con vainas foliares que forma un falso tallo similar a un tronco, denominado pseudotallo. La planta posee de 8 a 12 hojas con una longitud aproximada de 270 cm y 60 cm de ancho. El desarrollo de la raíz puede ser extenso en suelos disgregados, en algunos casos de hasta 9 m. La altura de la planta, el tamaño de los racimos y otras características dependen de la variedad (HAIFA, s/a).

El banano se desarrolla favorablemente en zonas tropicales, húmedas y cálidas. La temperatura óptima promedio para su desarrollo es de 25°C (con mínimas no menores a 18°C y máximas no mayores a 35°C) las bajas temperaturas pueden retrasar el crecimiento de la planta y a temperaturas altas se pueden producir anomalía. La constitución débil y superficial de las raíces hace que sea necesario un adecuado aporte de agua de entre 160 a 180 mm por mes; además requiere de un pH óptimo del suelo entre 6 a 7.5 sin exceder estos límites, pues puede disminuir la absorción de nitrógeno y potasio; nutrientes fundamentales para el desarrollo de la planta y el fruto (Cortés, 1994; IICA, 1989).

1.4.2 Requerimientos nutricionales del cultivo

De acuerdo a la Guía Nutricional del Cultivo de Banano de HAIFA, s/a; la planta de banano posee requerimientos tanto de nutrientes primarios como de nutrientes secundarios, así:

- **Nutrientes primarios**
 - *Fósforo (P)*: es absorbido por la planta como ión ortofosfato (H_2PO_4^-) y constituye un componente importante de ácidos nucleicos, coenzimas, vitaminas, entre otros. Juega un papel primordial en reacciones que involucran al ATP, es decir, participa en procesos fundamentales para la planta como: fotosíntesis, metabolismo de azúcares y transferencia de energía. Así, el fósforo suministra energía a la planta para el desarrollo de un sistema radical fuerte, acelera la madurez y provee un alto nivel de resistencia al estrés. Su deficiencia se traduce en retraso del llenado y elongación del fruto, necrosis marginal de hojas, reducción de la emisión foliar y en casos severos, muerte prematura del individuo.
 - *Nitrógeno (N)*: este elemento es absorbido por las raíces de la planta como ión nitrato (NO_3^-). Forma parte esencial de diversas moléculas como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. y es en consecuencia importante para que la planta logre una división celular óptima que se traduzca en crecimiento vegetativo del pseudotallo y hojas; y lleve a cabo un proceso de respiración adecuado. Su deficiencia provoca retraso en el crecimiento del individuo y por lo tanto, tasas de producción más bajas.
 - *Potasio (K)*: debido a los altos requerimientos de potasio que exhiben tanto la planta de banano como el fruto, este es considerado el nutriente más importante para el desarrollo del individuo. Constituye un cofactor de más de 40 enzimas y a pesar de que no tiene un rol directo en cuanto a estructura celular, cataliza reacciones importantes como: formación de

clorofila, fotosíntesis, respiración, regulación del equilibrio interno del agua, transporte y acumulación de azúcares (particularmente importante en el proceso de llenado del fruto), entre otros. Su deficiencia se presenta como doblado y necrosis de hojas, deformación del racimo, pobre llenado de frutos y crecimiento lento de la planta.

- **Nutrientes secundarios:**

- *Azufre (S)*: componente de los aminoácidos como cisteína, metionina y cistina. Forma parte de la molécula de clorofila. Su deficiencia provoca hojas blanco-amarillentas, venas engrosadas y racimos pequeños.
- *Calcio (Ca)*: absorbido en forma de Ca^{2+} . Es un componente importante de la lámina media de la pared celular, cofactor de enzimas involucradas en la hidrólisis de ATP y fosfolípidos. Permite el desarrollo radical adecuado. Su deficiencia produce clorosis intervenal cerca del borde de la hoja, pudrición del cormo, curvado y reducción del peso del fruto.
- *Cobre (Cu)*: es un importante componente de enzimas que participan en la respiración, fotosíntesis, lignificación, metabolismo anaerobio, mecanismos de defensa celular y metabolismo hormonal. Su deficiencia provoca el doblado de la hoja hacia atrás en forma de paraguas y coloración bronce amarillo.
- *Hierro (Fe)*: el 80% es absorbido durante la primera mitad de la vida de la planta. Forma parte de los citocromos y participa en la fotosíntesis y fijación de nitrógeno. Su deficiencia retarda el

crecimiento de la planta, produce racimos pequeños y clorosis general.

- *Magnesio (Mg)*: macronutriente absorbido en forma de Mg^{2+} . Forma parte de la molécula de clorofila y por tanto se encuentra involucrado en el proceso de fotosíntesis, participa en el metabolismo y movimiento de carbohidratos, síntesis de ácidos nucleicos, además, estimula la absorción y transporte de P. Su deficiencia provoca bordes amarillos en las hojas, manchas azuladas en los pecíolos y separación de las vainas foliares del pseudotallo.

- *Manganeso (Mn)*: absorbido como Mn^{2+} . Participa en la evolución fotosintética del oxígeno, en la formación de aminoácidos y proteínas. Su deficiencia se expresa como clorosis en forma de peine en las hojas. No obstante, la toxicidad por exceso de este mineral es más común, sobre todo en suelos ácidos, produciendo reducción de la absorción de calcio en un 30%, de manganeso en 40% y zinc en 20%.

- *Zinc (Zn)*: componente esencial de enzimas involucradas en la regulación del dióxido de carbono y metabolismo proteico. La deficiencia de este elemento es muy común en todas las zonas de cultivo de banano, produciendo hojas angostas con puntas cloróticas, racimos con frutos pequeños y curvados, retraso del crecimiento y atrofia de la planta.

1.4.3 Consideraciones finales

En la actualidad, las plantas de banano son comúnmente propagadas mediante técnicas *in vitro*. A pesar de los numerosos beneficios que supone dicho procedimiento, existe una etapa sumamente crítica que corresponde a la aclimatación en condiciones *ex vitro*, donde se han reportado altos índices de mortalidad de los individuos, pobre desarrollo de órganos vegetales y retrasos de crecimiento. La metodología tradicional de aclimatación no consigue sobrellevar los inconvenientes citados por lo que se requiere la aplicación de una tecnología que provea soporte suficiente a la planta durante este importante periodo.

En este contexto, una alternativa prometedora son los bioinoculantes como coadyuvantes microbianos para la estabilización y supervivencia de las plántulas micropropagadas, aprovechando la alta afinidad que presenta esta especie vegetal para una gran diversidad de organismos propios del suelo como los hongos micorrícicos arbusculares y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Azcón & Barea, 1997).

1.4.4 Componentes microbianos del suelo

El suelo es uno de los ambientes donde un conjunto de innumerables microorganismos compiten entre sí para obtener nutrientes y energía. Al mismo tiempo, los productos de su metabolismo alteran la composición química del suelo (Carrillo, 2003).

Los microorganismos del suelo juegan un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos del suelo, siendo los responsables de mantener la calidad de este. La actividad microbiana a nivel de rizósfera constituye un factor clave en el control y disponibilidad de nutrientes para las plantas, lo que

tiene un impacto significativo sobre la estabilidad y productividad (Jeffries *et al.*, 2003).

Dentro de los microorganismos presentes en la rizósfera, existen tres grupos benéficos fundamentales para el correcto funcionamiento de los ecosistemas terrestres: bacterias fijadoras de nitrógeno, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos formadores de micorrizas (Alexander, 1980).

En el presente trabajo se estudiará el efecto de los HMA y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Azospirillum*.

1.4.4.1 Micorrizas

Se denomina micorriza a la asociación simbiótica y mutualista que se desarrolla entre las raíces de plantas superiores y ciertos grupos de hongos del suelo. En esta asociación, el hongo provee a la planta incalculables beneficios incluyendo: captación de nutrientes del suelo (especialmente fósforo), resistencia a situaciones de estrés (sequía, salinidad o variaciones de pH), mejoramiento de la agregación del suelo y resistencia a plagas, entre otros. En contraparte la planta le proporciona al hongo carbono, energía y un nicho ecológico seguro (Bethlenfalvay & Linderman 1992).

Las micorrizas se han clasificado en función de su estructura, morfología y modo de infección en tres grupos: ectomicorrizas, ectendomicorrizas y endomicorrizas, con sus respectivas subdivisiones, como se detalla en la Figura 1.1.

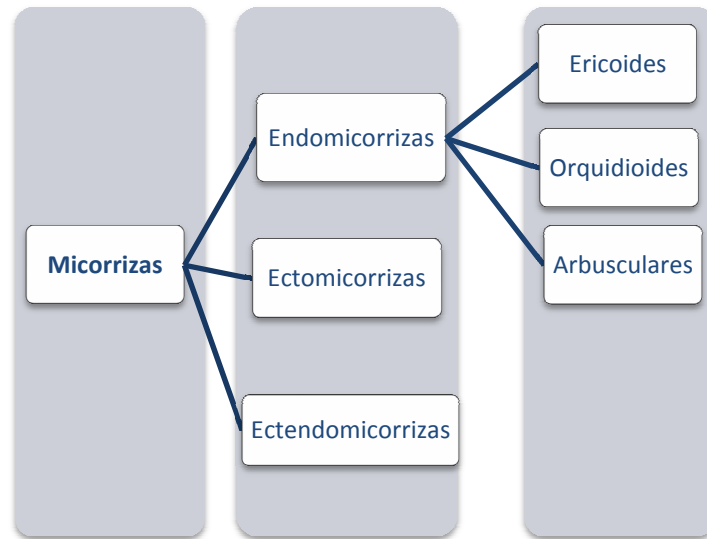


Figura 1.1 Clasificación de las Micorrizas de acuerdo a su estructura, morfología y modo de infección (Smith & Read, 1997).

- ***Ectomicorrizas:*** la asociación se desarrolla predominantemente sobre las puntas de las raíces secundarias del hospedante, distribuyéndose irregularmente a través del perfil del suelo, formando una extensa red de hifas denominadas red de Hartig. Este tipo de micorriza se produce principalmente sobre especies forestales y leñosas (Brundrett *et al*, 1996).
- ***Endomicorrizas:*** el hongo no forma manto sobre la raíz, por el contrario las hifas penetran en el interior de las células de la corteza formando estructuras especializadas en absorción y almacenamiento de nutrientes denominadas vesículas y arbusculos (Varma & Kharkwal, 2009).
- ***Ectendomicorrizas:*** esta simbiosis se desarrolla con miembros del género Pinacea y presenta características intermedias entre las ectomicorrizas y las endomicorrizas, debido a que exhiben un manto externo o red de Hartig como las ectomicorrizas, pero también penetran

en el interior de las células, como las endomicorrizas sin formar vesículas ni arbusculos (Varma & Kharkwal, 2009).

Dentro de este extenso grupo de micorrizas y para los fines propuestos en el presente trabajo de investigación se abordarán a continuación a los hongos micorrícico-arbusculares (HMA) pertenecientes al grupo de las endomicorrizas.

1.4.4.1.1 Hongos micorrícico-arbusculares (HMA)

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) son microorganismos del suelo que forman simbiosis con más del 80% de las plantas terrestres (Giovannetti & Sbrana, 1998; Vierheilig, 2004), desarrollando arbusculos, vesículas (en algunas especies) e hifas, dentro de las células corticales de las plantas que colonizan (Douds & Millner, 1999).

Estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en todo tipo de ecosistema y suelo, por lo que su disposición puede llegar a ser muy heterogénea en un mismo sitio, lo que permite a la planta obtener el máximo beneficio de la asociación con el hongo. Esta simbiosis entre el hongo y la planta actúa principalmente como un complemento de la raíz en cuanto a la toma y aprovechamiento de nutrientes, así como coadyuvante para la supervivencia durante situaciones de estrés, defensa contra patógenos, etc (Sieverding, 1991).

Aparentemente, las especies de HMA no presentan una visible especificidad en cuanto a hospederos (Smith & Read, 1997). Sin embargo, se ha observado que los efectos de estos hongos difieren según cada especie vegetal huésped, lo que indica que la planta responde en

mayor proporción a determinadas especies de HMA (Van der Heijden *et al.*, 1998).

a) Ciclo de vida y desarrollo de la simbiosis

Los HMA son simbioses obligados que se encuentran presentes en el suelo a manera de esporas multinucleadas rodeadas por paredes celulares gruesas. Bajo condiciones favorables de humedad y temperatura, estas germinan y atraviesan una serie de etapas basadas en morfogénesis estructurales, las cuales han sido caracterizadas como: fase asimbiótica, fase presimbiótica y fase simbiótica como se muestra en la Figura 1.2 (Bagó & Bécard, 2002).

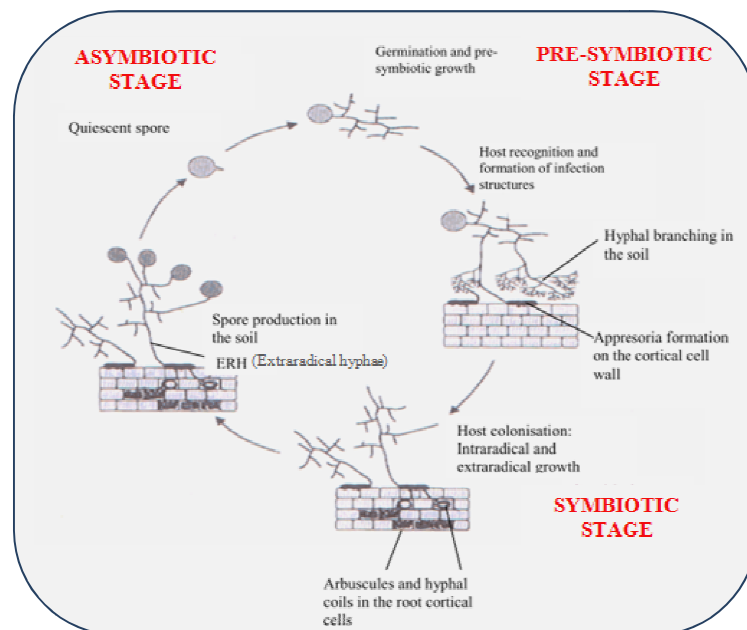


Figura 1.2 Ciclo de vida de HMA y sus fases: asimbiótica, presimbiótica y simbiótica (Giovannetti, 2000).

- ***Fase asimbiótica***

Las esporas de HMA son producidas naturalmente por el micelio extrarradical luego de atravesar por la asociación simbiótica con el hospedero (Bagó & Bécard, 2002). La fase asimbiótica es un estado de reposo dentro del ciclo de vida de los HMA. Diversos factores como: condiciones de extrema humedad o sequía inhiben la germinación de la espora, además, pH neutros usualmente promueven su activación, mientras que una alta acidez tienen efectos inhibitorios; finalmente temperaturas dentro del rango de 20-30°C son óptimas para la activación de los propágulos, valores superiores o inferiores las inactivan.

Las esporas inactivas pueden sobrevivir en el suelo de 1 a 2 años, mientras que los periodos de latencia varían de acuerdo a la especie, ya que en cada una de ellas difieren los mecanismos celulares que afectan al metabolismo del hongo (Fitter & Garbaye, 1994; Giovannetti, 2000). Cuando no existe la presencia de un hospedero, la germinación de la espora cesa rápidamente y los nutrientes que se encuentran en forma de azúcares y gotas de lípidos, son almacenados en el citoplasma como sustancias de reserva que podrá ser utilizada para la supervivencia del hongo durante la fase asimbiótica y durante la germinación de los propágulos con el fin de sostener la elongación inicial del tubo germinal (Smith & Read, 1997; Bagó & Bécard, 2002).

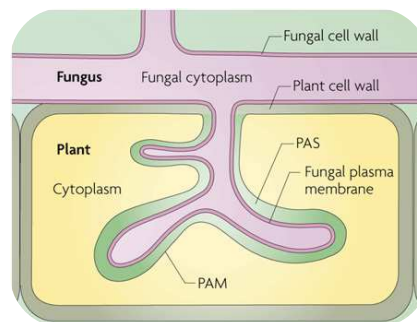
- ***Fase presimbiótica***

En la etapa presimbiótica, las esporas germinan y producen hifas que se ramifican hacia la raíz del hospedero. Este proceso precede a la formación de estructuras denominadas apresorios sobre la pared celular de las raíces del hospedero. El término apresorio se utiliza para describir la elongación de la punta de la hifa, que se adhiere a la superficie radical del huésped (Nagahashi & Douds, 2000). Esta etapa se denomina

presimbiótica debido a que no se requiere el contacto entre la raíz y el hongo para estimular la ramificación de las hifas. Este evento es estimulado por exudados radicales como fitohormonas, ácidos orgánicos, aminoácidos, carbohidratos, fenoles y compuestos volátiles (Jones *et al.*, 2004).

- **Fase simbiótica**

Esta fase se refiere a la penetración y desarrollo del micelio intrarradical, y la formación de arbusculos en el cortex de las raíces. En una primera etapa, a partir del apresorio, una o más hifas infectivas, penetran las células de la raíz mediante acción mecánica y enzimática. Una vez que han ingresado, el micelio intrarradical se ramifica dentro de los espacios intercelulares de la epidermis y del parénquima cortical, formando una estructura similar a un árbol, denominado arbusculo. Aún cuando el hongo ingresa en las células de la planta, este no penetra el citoplasma de las mismas, ya que paralelamente al desarrollo del arbusculo, se produce una reorganización drástica de las células corticales. A medida que la hifa penetra los espacios intercelulares, la membrana plasmática de la planta no se rompe, sino que se invagina y extiende alrededor del arbusculo para formar una membrana periarbuscular (Barea & Azcón-Aguilar, 2002); estableciéndose una extensa interfase, donde se produce la transferencia de fosfato y carbono entre la planta y el hongo (Douds *et al.*, 2000).



PAS: espacio periarbuscular *PAM*: membrana periarbuscular

Figura 1.3 Esquema del arbusculo de HMA (Parniske, 2008).

Tras la formación del arbusculo, se produce una etapa de desarrollo del micelio extrarradical caracterizada por la liberación de esporas fúngicas en el suelo y la extensión de hifas en dicho sustrato que permiten una mejor absorción de nutrientes y agua. Además, ciertos compuestos lipídicos sintetizados en las hifas internas son transportados hacia el micelio externo, donde se utilizan como sustancias de reserva para el desarrollo de nuevas esporas (Bagó *et al.*, 2000; Douuds *et al.*, 2000).

b) Efectos sobre la planta

Los mayores beneficios que recibe la planta de su simbiosis con los hongos micorrícicos arbusculares pueden resumirse en: mejor absorción de nutrientes, resistencia a condiciones de estrés hídrico, resistencia a fitopatógenos y agregación del suelo.

- ***Absorción de nutrientes***

Toda planta posee requerimientos específicos tanto de macro como de micronutrientes para su desarrollo. Los iones más móviles presentes en el suelo son fácilmente absorbidos por las raíces de las plantas que aquellos que presentan baja movilidad como el fósforo (P), zinc (Zn), cobre (Cu), Molibdeno y en menor grado potasio (K) y azufre (S) (Sieverding, 1991). La absorción de estos elementos poco disponibles para la planta depende en gran medida del volumen de suelo que es capaz de explorar el sistema radical de la planta. En este punto, los HMA proveen una importante ventaja a las plantas colonizadas con respecto a las que no han sido micorrizadas, debido a que el micelio externo del hongo es capaz de extenderse a mayor distancia que el sistema de raíces absorbentes. Se ha estimado que 1 cm de raíz colonizada presenta entre 800 y 3000 cm de micelio extrarradical (Finlay & Söderström, 1992).

Desde el punto de vista nutricional, el beneficio más notable que reciben las plantas de su simbiosis con los HMA es una mejor absorción de P inorgánico, cuando este se encuentra en concentraciones limitadas en el suelo. Esta situación es particularmente importante en suelos tropicales, debido a que en general estos presentan baja disponibilidad de P para las plantas (como es el caso de aquellos utilizados para la producción de banano). Feng *et al.* (2003) describieron que la habilidad de los HMA para mejorar la absorción de P hacia la planta es mayor cuando la fuente de este elemento es orgánica debido a que contribuyen a la mineralización del P en el suelo (transformándolo de fósforo orgánico a inorgánico) y de esta manera proveen de formas asimilables del mineral. Se ha observado que altos niveles de P inorgánico en el suelo pueden llegar a inhibir la simbiosis micorrícica, debido a que afecta directamente al hongo produciendo reducción de la germinación de esporas y del crecimiento de las hifas, además de que la micorrización se vuelve innecesaria para la planta debido a que el suelo posee suficiente fósforo asimilable para su nutrición (Nagahashi *et al.*, 1996).

Por otro lado, se ha demostrado que las micorrizas arbusculares influyen en forma directa o indirecta en absorción otros iones minerales como N, K, calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), manganeso (Mn), entre otros (Johansen *et al.*, 1994).

- ***Resistencia a estrés hídrico***

La sequía es uno de los principales problemas que limitan el crecimiento de las plantas. Se ha observado que aquellos individuos que han establecido asociaciones con HMA, se vuelven tolerantes al estrés hídrico. Esta particularidad se atribuye en parte, a ciertas alteraciones inducidas por el hongo durante la simbiosis que están relacionadas con la regulación estomatal, incremento de la conductividad hidráulica de las raíces, ajustes osmóticos, mantenimiento de la presión celular y cambios

en la elasticidad de la pared celular (Augé, 2001). No obstante, el principal mecanismo asociado al incremento en la eficiencia de absorción de agua es la capacidad del micelio externo de extenderse y alcanzar fuentes de agua que no se encontrarían fácilmente disponibles para el sistema radical de la planta (Marulanda et al., 2003). Allen (1991) estimó que la tasa de transporte de agua a través del micelio extrarradical es de 100 nl.h^{-1} por cada punto de infección, lo cual se considera suficiente para alterar positivamente la relación hídrica dentro de la planta.

- ***Resistencia a fitopatógenos***

La colonización radical de la planta por HMA ha demostrado incrementar la tolerancia de estas a patógenos, actuando como un agente de biocontrol (Azcón & Barea, 1996). Se sugiere que varios mecanismos e incluso ciertas interacciones de estos, son los responsables de la protección que proveen las micorrizas a la planta colonizada. Smith (1988) propuso que la capacidad de los HMA para incrementar el nivel nutricional de la planta es el principal mecanismo de control biológico ya que provee a la planta de los elementos necesarios para su crecimiento, incrementando su vigor y haciéndola capaz de resistir al ataque de patógenos. Además, durante el desarrollo de la simbiosis, el hongo altera los exudados radicales de la planta, incrementa el crecimiento de la raíz y actúa como competidor por los sitios de infección; lo que contribuye al control de patógenos en la zona de la rizósfera.

- ***Agregación del suelo***

La estructura del suelo mejora en presencia de HMA debido a que producen una sustancia proteinácea, hidrosoluble y termoestable a través de su micelio, denominada: glomalina (Steinberg & Rilling, 2003). Este exudado, mejora la agregación del suelo actuando como un ligante

de partículas, alterando su porosidad, lo que promueve la aireación y el transporte de agua; factores esenciales para el crecimiento radical y la actividad microbiana (Amaranthus, 1999).

1.4.4.2 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPR (siglas en inglés de *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) son un grupo de microorganismos capaces de colonizar activamente las raíces de las plantas y estimular directamente su crecimiento, a través de diversos mecanismos (Wu *et al.*, 2005) como: aporte de nitrógeno por el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Döbereiner *et al.*, 1995), producción de fitohormonas (Arshad y Frankenberger, 1998), solubilización de minerales (Crowley *et al.*, 1991), inducción de resistencia sistémica a patógenos (Van Peer *et al.*, 1991).

Las PGPR pueden ser de vida libre o asociativas, aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas (Rodríguez, 1995). Dichas bacterias, se encuentran distribuidas en la rizósfera, que es el ambiente que está bajo la influencia de las raíces de las plantas, donde las raíces vierten una serie de exudados como producto del proceso de fotosíntesis, los mismos que permiten el desarrollo de una variedad de interacciones entre la planta y los microorganismos circundantes (Barea y Azcón-Aguilar, 1982).

Por su gran capacidad para promover el crecimiento de una amplia gama de especies vegetales, se ha propuesto la utilización de inoculantes bacterianos en calidad de fertilizantes o estimuladores del crecimiento vegetal, con el fin de sustituir a largo plazo el uso de agroquímicos. Dentro del grupo de PGPR, los microorganismos más estudiados para dicho fin han sido: *Rhizobium*, *Azospirillum* y *Azotobacter* (Viñals & Villar, 1999; Okon

& Labandera, 1994; Herridge, 2002), siendo las bacterias asociadas a plantas que han merecido mayor interés en los últimos tiempos, las pertenecientes al género *Azospirillum*, pues si bien este microorganismo no posee gran capacidad de fijación de nitrógeno, presenta otros mecanismos que le permiten estimular el crecimiento de la planta a la que se encuentra asociada (Bashan & Holguin, 1997b). Es por ello que en la presente investigación se analizará su efecto sobre las plántulas de banano micropropagadas. A continuación se describen las principales características del género.

1.4.4.2.1 El género *Azospirillum*

a) Historia

La primera descripción del género fue realizada por Willem Beijerinck en 1925, posteriormente quedó en el olvido durante varias décadas, hasta que en 1973, las observaciones de Peña-Cabrales y Döbereiner continuaron con otra etapa en el estudio de este microorganismo (Caballero-Mellado, 2001).

En la actualidad, se reconocen seis especies dentro de este género, las dos primeras en ser descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Tarrand *et al.*, 1978), seguidas por *A. amazonense* (Magalhães *et al.*, 1983), *A. halopraeferans* (Reinhold *et al.*, 1987), *A. irakense* (Khammas, *et al.*, 1989) y *A. largimobile* (Ben Dekhil, 1997), siendo *A. brasilense* la más ampliamente estudiada.

b) Descripción del género

El género *Azospirillum* pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias, dentro de la familia *Rhodospirillaceae*, siendo *A.*

lipoferum la especie tipo. Este género presenta eubacterias Gram negativas que poseen forma bacilar con longitud de 1- 1.5 μm y diámetro de 2.1-3.8 μm . Además posee un flagelo polar único que le provee movilidad característica en forma de espiral. El crecimiento óptimo se produce a 30°C y a pH de 6-7. Son bacterias químio-organotróficas y pueden utilizar como fuente de carbono azúcares, alcoholes, sales de ácidos orgánicos y como fuente de nitrógeno: nitrato, sales de amonio y ciertos aminoácidos. Presentan gránulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB) en proporción 25-50% de su peso seco, los cuales son empleados por la bacteria como fuente de carbono y energía durante periodos de carencia de nutrientes (Brenner *et al.*, 2005).

c) **Interacción con la planta**

Azospirillum puede colonizar tanto la parte interna como externa de la raíz. En el primer caso, las células bacterianas pueden invadir las raíces penetrando a través de los espacios intercelulares, siendo las zonas preferenciales para dicho fin, las zonas de elongación radical (Patriquin & Döbereiner, 1978). Los mecanismos relacionados con la penetración celular no se han determinado con exactitud, sin embargo se han desarrollado algunas teorías con respecto a este tipo de colonización:

- Invasión bacteriana a través de tejidos corticales destruidos, donde las ramificaciones de las raíces laterales emergen a partir de las raíces principales (Patriquin & Döbereiner, 1978; Umali *et al.*, 1980);
- Invasión a través de pelos radicales lisados o heridas mecánicas causadas durante el crecimiento de la planta y
- Penetración directa mediante la producción de pectinasas que degradan componentes de la pared celular de raíces (Umali *et al.*, 1980).

La colonización interna por *Azospirillum* no se produce en todas las especies vegetales por igual, no obstante, la adhesión, es decir, la colonización externa de la superficie radical ha mostrado ser el mecanismo más frecuente de colonización a nivel del género y se describirá a continuación.

d) Mecanismos fisiológicos asociados a la adhesión radical

La adhesión de *Azospirillum* a la superficie radical es un proceso que comprende dos pasos principales: adsorción y anclaje.

La fase primaria de adsorción comprende un proceso rápido que se produce dentro de las 2 horas posteriores a la exposición de las bacterias a las raíces. Esta adhesión es débil, reversible y probablemente se encuentra dirigida por compuestos proteínicos de origen bacteriano.

Por otro lado, la fase de anclaje consiste en una adhesión fuerte, irreversible y que tarda varias horas en desarrollarse. Este proceso se basa en la acción de una serie de polisacáridos extracelulares producidos por las bacterias que forman una red de material fibrilar que conecta permanentemente las bacterias con la superficie radical, asegurando una asociación persistente entre los dos organismos y permitiendo el transporte vertical de las bacterias sobre la superficie (Bashan & Holguin, 1997a; Egorenkova *et al.*, 2000).

e) Posibles mecanismos de promoción de crecimiento

Varios mecanismos han sido sugeridos como posibles causas para explicar la capacidad de *Azospirillum* para incrementar el crecimiento vegetal, sin embargo, no se ha determinado con exactitud

estos mecanismos. A continuación se describen las posibles causas por las que *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal.

- **Producción de fitohormonas**

Se ha descrito que las bacterias del género *Azospirillum* tienen la capacidad de producir hormonas reguladoras del crecimiento vegetal, en respuesta a la producción de sustancias por parte de la planta, particularmente triptófano que es liberado hacia la rizósfera. A partir de este aminoácido y a través de tres vías metabólicas bacterianas (Figura 1.3): 3 indol piruvato (transaminación), triptamina (descarboxilación) y 3 indol acetamida (oxigenación) *Azospirillum* es capaz de producir ácido indol acético (AIA) (Lee *et al.*, 1988):

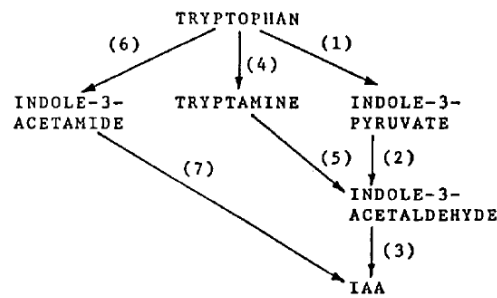


Fig. 2. IAA synthetic pathway in microorganisms
 (1) tryptophan aminotransferase
 (2) indole pyruvate decarboxylase
 (3) indole acetaldehyde dehydrogenase
 (4) tryptophan decarboxylase
 (5) tryptamine oxidase
 (6) tryptophan-2-monooxygenase
 (7) indole acetamide hydrolase

Figura 1.4 Vías de síntesis de AIA de *Azospirillum* (Lee *et al.*, 1988)

Arshad y Frankenberger (1998) presentaron un modelo hipotético sobre la relación entre bacterias promotoras de crecimiento como *Azospirillum* y las plantas. En este modelo, el AIA sintetizado por la bacteria que está adherida a la superficie radical, es captado por la planta y junto con el ácido indol acético endógeno, estimulan la división de células radicales, provocando modificaciones en su morfología, que incrementa significativamente la formación de pelos radicales

(Dobbelaere *et al.*, 1999). Esta alteración del sistema radical, favorece la permeabilidad de la raíz a ciertos iones, mejorando así la absorción de agua y nutrientes (Chalk, 1991).

- ***Fijación biológica de nitrógeno***

Se ha observado que todas las cepas silvestres de *Azospirillum* fijan nitrógeno atmosférico, ya sea como bacterias libres o en asociación con plantas, participan en varias transformaciones relacionadas con el ciclo del nitrógeno (Heulin *et al.*, 1989).

La fijación biológica de nitrógeno se refiere a la reducción enzimática de nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4). Este proceso es exclusivo de las bacterias denominadas diazotróficas, como *Azospirillum* (Evans & Burris, 1992). Para llevar a cabo esta transformación, *Azospirillum* posee un complejo enzimático nitrogenasa, el cual consta de dos metaloenzimas denominadas dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa. Ambas proteínas poseen hierro en su estructura, mientras que la primera contiene además molibdeno (Madigan *et al.*, 1999).

La eficiencia de la fijación de nitrógeno es influenciada por tres factores principales: oxígeno, molibdeno y nitrato, obteniéndose una fijación biológica de nitrógeno óptima, bajo condiciones microaerobias con: 5% de oxígeno, un mínimo de nitrato de 2 g/L y máximo 0.5 g/L de molibdeno (Furina *et al.*, 1999).

La contribución de la fijación de nitrógeno bacteriana al balance de nitrógeno de las plantas se basa en el hecho de que la actividad de la nitrogenasa en raíces se incrementa significativamente en presencia de

Azospirillum (Patnaik *et al.*, 1994). Si todo el nitrógeno fijado por la actividad bacteriana (el cual se expresa en términos de concentración de nitrógeno total) fuese incorporado a la planta, se incrementaría notablemente su rendimiento. Aunque la bacteria no puede suplir todo el requerimiento de nitrógeno de la planta, contribuye con cantidades significativas del mismo (Mertens y Hess, 1984).

- **Otros mecanismos**

Se han sugerido una serie de mecanismos adicionales por los cuales *Azospirillum* puede promover el crecimiento vegetal. Deubel *et al.* (2000) han propuesto que las bacterias de este género, pueden mejorar la absorción de minerales mediante la solubilización de ciertos componentes del suelo como el fósforo, acidificar el suelo por exudados de ácidos orgánicos y mejorar aspectos relacionados con el agua y la conductividad hídrica, observándose que la extracción total de humedad del suelo por parte de plantas inoculadas, es mayor que en plantas no inoculadas y el agua puede extraerse de capas más profundas del suelo (Sarig *et al.*, 1992).

La evidencia presentada en párrafos anteriores, permite sugerir que el modo de acción de *Azospirillum* se encuentra probablemente compuesto por múltiples mecanismos, siendo los más importantes la fijación biológica de nitrógeno y la producción de fitohormonas. En este contexto se debe tomar en cuenta que ya que la rizósfera es un hábitat donde coexisten innumerables microorganismos, es importante conocer los efectos que pueden tener las interacciones entre *Azospirillum* y el resto de habitantes del mismo nicho ecológico. Es por eso que a continuación, se describirá brevemente la interacción entre los microorganismos de interés del presente estudio; HMA y *Azospirillum*.

1.4.5 Interacciones *Azospirillum*-HMA

Las poblaciones microbianas en la rizósfera pueden beneficiar o interferir en el establecimiento de la simbiosis micorrícica. Un efecto benéfico típico se produce gracias a lo que se denomina *Mycorrhiza Helper Bacteria* (MHB), término que hace referencia a bacterias que promueven el establecimiento de la simbiosis micorrícica (Duponnois & Garbaye, 1991). En forma general, se conoce que algunas rizobacterias como *Azospirillum*, pueden influir positivamente en el establecimiento y funcionalidad de la simbiosis micorrícica mediante mecanismos de diferente índole, lo que finalmente permitirá que la co-inoculación de HMA y *Azospirillum* sea más provechosa y beneficiosa para la planta. Dentro de los mecanismos que presentan las MHB se encuentran:

- Promoción de la simbiosis por estimulación de crecimiento de micelio: tanto la germinación de la espora como la elongación del micelio externo son mejorados por la producción de exudados bacterianos que son utilizados como nutrientes por el hongo (Azcón-Aguilar & Barea, 1997).
- Mejora de la micorrización: la producción de fitohormonas como AIA que incrementan la densidad de pelos radicales en la zona de la rizósfera, permite que exista mayor probabilidad de contacto entre el hongo y la raíz, así como zonas libres para la adhesión bacteriana. Además, aumenta la permeabilidad de la membrana de las células de la raíz, incrementando la tasa de eliminación de exudados radicales, que sirven como señales químicas para que el hongo ingrese a la zona cortical de la raíz a través de la hifa infectiva (Azcón-Aguilar & Barea, 1997).

Por otro lado, se ha observado que los HMA presentan también ciertos mecanismos que facilitan la colonización bacteriana de las raíces, siendo los principales los siguientes:

- Proveen de nutrientes a las bacterias a través de los exudados radicales que producen posteriormente al establecimiento de la simbiosis HMA-planta (Azcón-Aguilar & Bagó, 1994).
- Proveen de un soporte (micelios y esporas) sobre el cual las bacterias pueden adherirse y moverse hasta tomar contacto con la raíz de la planta (Boddey *et al.*, 1991).

1.4.6 Ventajas de la inoculación de HMA y PGPR sobre plantas micropropagadas

En los últimos años se ha extendido la micropropagación de plantas de interés comercial a partir de meristemas, mediante la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* (Angulo, 2003). Este procedimiento, además de permitir la propagación masiva de clones, ofrece individuos uniformes y libres de patógenos (Jaizme-Vega, 1999).

A pesar de los múltiples beneficios que ofrece este sistema, existen una serie de condiciones que limitan su uso extensivo, principalmente durante la fase *ex vitro*, punto crítico donde se producen generalmente altas tasas de mortalidad de los individuos (50-90%) (Sutter, 1985). Este hecho se ha observado como consecuencia de la falta de desarrollo de la cutícula vegetal, disfuncionalidad de estomas y un sistema radical débil (Alarcón & Ferrera-Cerato, 2000).

No obstante, a pesar de las desventajas mencionadas, se ha observado que especies como piña, manzana, uva y banano, presentan alta dependencia micorrícica (Nemec, 1986); según lo cual, al inocular plántulas micropropagadas de estas especies, se obtiene un crecimiento óptimo de los individuos (Gianinazzi *et al.*, 1990).

Adicionalmente, debido a la relación positiva que presentan las HMA con ciertas PGPR, se ha descrito que la inoculación combinada de estas dos clases de microorganismos; particularmente en banano, aportan beneficios significativos en relación a la adaptación, desarrollo y resistencia de la planta a condiciones bióticas adversas (Jaizme-Vega *et al*, 2004). Esto sugiere que la integración de ambas biotecnologías (micropropagación y el uso de microorganismos de suelo) permiten mejorar la técnica que las plantas micropropagadas suponen, gracias a que los microorganismos del suelo fortalecen a las plantas durante fases críticas de su desarrollo.

1.5 Hipótesis

La co-inoculación de HMA y *Azospirillum spp.* mejoran el crecimiento (altura, perímetro del tallo, área foliar, biomasa aérea, biomasa radical y contenido de nutrientes) de las plántulas de banano micropropagadas durante la fase de aclimatación.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

El presente ensayo contó con el financiamiento de la empresa HoldingDine S.A. y la Escuela Politécnica del Ejército. Además de la colaboración del personal del Programa de Maíz del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador INIAP. La tesis fue dirigida por la Dra. María Emilia Medina y co-dirigida por el Dr. Santiago Ulloa.

2.2 Zona de estudio

La toma de muestras de suelo y raíces se llevó a cabo en la Hacienda Central de HDINEAGROS S.A. ubicada en la provincia de El Oro, parroquia El Cambio. El establecimiento y evaluación del ensayo se desarrollaron en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología del Suelo del Centro de Investigaciones Científicas de la Escuela Politécnica del Ejército, en Sangolquí-Ecuador.

2.3 Período de investigación

La investigación se desarrolló en el periodo de un año, iniciando en octubre de 2010 y finalizando en octubre de 2011.

2.4 Selección del material vegetal y microbiológico

El material vegetal que se empleó estuvo constituido por plántulas de banano de la variedad Williams, micropropagadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Politécnica del Ejército.

Para la propagación de esporas nativas de HMA, se realizó un muestreo de suelo en las haciendas: Brigada, Central, Pagua, Juana Fernández, Rosario, Herrera y Bolívar; pertenecientes a HDineAgros, donde se determinó la zona con mayor población de esporas, de la que se obtuvo la muestra de suelo para desarrollar el inóculo micorrícico.

Para el aislamiento de *Azospirillum*, se tomaron muestras de suelo y raíces de la hacienda seleccionada (Hacienda Central).

Las muestras de suelo se extrajeron en forma aleatoria y se tomaron de la zona cercana a la raíz, a 30 cm de profundidad hasta obtener 1 kg de suelo; mientras que las muestras de raíces se colectaron a 20 cm de distancia de la planta, hasta obtener aproximadamente 15 g de raíces.

2.5 Procesamiento de muestras, extracción y conteo de esporas

El procesamiento de muestras de suelo se realizó de acuerdo a la técnica de tamizado húmedo y decantación propuesta por Genderman y Nicholson, 1963, modificada por Herrera *et al.*, 2004:

El suelo húmedo proveniente del muestreo se secó a temperatura ambiente durante 3-4 días, tras lo que se tomaron 100 g de suelo seco, que fueron cubiertos con una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 1% y se dejó reposar durante una hora. Transcurrido el tiempo señalado, la mezcla de suelo y peróxido se vertió sobre una columna de tamices de 500 μ m 150 μ m y 45 μ m y se lavó con agua corriente, generándose tres fracciones (una en cada tamiz).

Se tomó la fracción A (correspondiente al tamiz de 500 μ m) y se secó al vacío sobre papel filtro para eliminar la mayor cantidad de agua posible.

Posteriormente se realizó una desagregación física de la fracción B (correspondiente al tamiz de 150 μm) en licuadora a 6500 rpm durante 30 segundos, y se pasó la mezcla por los dos tamices restantes. El suelo retenido en el segundo tamiz se secó al vacío sobre papel filtro para eliminar la mayor cantidad de agua posible. Finalmente se desagregó físicamente la fracción C (correspondiente al tamiz de 45 μm) en la licuadora a 10000 rpm durante 1 minuto, Posteriormente se hizo pasar esta mezcla por el último tamiz y se secó la fracción final al vacío sobre papel filtro.

Una vez que las fracciones se secaron a temperatura ambiente durante 3-4 días, se pesaron y se procedió a la extracción de esporas.

Para la extracción de esporas de HMA se pesaron alícuotas correspondientes al 10% y 5% de las fracciones B y C respectivamente y se colocaron en tubos Falcon de 50 ml, a cada uno de ellos se adicionó agua destilada hasta alcanzar un volumen de 25 ml.

Posteriormente se colocó en cada tubo una solución de sacarosa al 45% hasta llegar a un volumen de 35 ml y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. Con esta metodología se consiguió que las esporas permanezcan en el sobrenadante.

El sobrenadante generado de la fracción B se vertió en el tamiz de 150 μm y el correspondiente a la fracción C sobre el de 45 μm . Se procedió a lavar con abundante agua para eliminar el exceso de sacarosa y finalmente se recogieron las muestras en cajas Petri cuadradas.

El conteo de esporas se lo realizó en cajas de Petri cuadradas bajo el estereomicroscopio, para lo cual se procedió a contabilizar las esporas presentes en cada sección (cuadro) de la placa.

Para determinar la población total de esporas, el número de esporas encontrado en la fracción B se multiplicó por 10 y el número de esporas de la fracción C por 20. Finalmente se sumaron estos valores para tener el número de esporas en 100 g de suelo.

2.6 Tinción de raíces

La tinción de raíces se realizó de acuerdo al protocolo de clarificación y tinción descrito por Philips y Hayman (1970), modificado para raíces de banano debido a que presentaban paredes gruesas, materia orgánica adherida y gran cantidad de taninos.

Se cortaron las raíces en segmentos de aproximadamente 1 cm, se lavaron con agua corriente y se colocaron dentro de cassettes de tinción. Solamente los tratamientos T1 al T4 se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno al 1% durante 2.5 minutos, tras lo cual se enjuagaron con abundante agua. A continuación se introdujeron en una solución de hidróxido de potasio KOH al 10% y se sometieron a baño María (90°C), los tratamientos T1 al T4 (Tabla 2.1) durante 26 minutos y desde el T5 al T16 (Tabla 2.1) por 12 minutos, a fin de producir la digestión parcial de las paredes y cubiertas celulares. Posteriormente, se lavaron con agua corriente y se sumergieron todos los tratamientos durante 6 minutos en solución de ácido clorhídrico HCl 1N ya que neutraliza y actúa como mordiente para el siguiente paso. Finalmente se eliminó el ácido (sin realizar enjuague) se adicionó azul de tripano al 0.05% en lacto glicerol y se sometieron todos los tratamientos a baño María (90°C) durante 30 minutos. El colorante azul tripano tiñe las estructuras que contienen quitina, que es el principal componente de las paredes

celulares de algunos hongos. Transcurrido el tiempo, se eliminó el colorante y los cassettes se cubrieron con lactoglicerol durante 24 horas.

2.7 Determinación del porcentaje de colonización

Una vez teñidas las raíces, se montaron sobre un portaobjetos a razón de 20 fragmentos sobre cada placa. Se analizaron al microscopio óptico la presencia de estructuras micorrícicas en cada segmento observado con el fin de determinar el porcentaje de colonización micorrícica, así:

$$\% \text{ colonización} = \frac{NSC}{NTSO} \times 100$$

Donde:

NSC: N° de segmentos colonizados

NTSO: N° total de segmentos observados

2.8 Propagación de esporas de HMA nativas del cultivo de banano

La propagación de esporas nativas de HMA se realizó mediante cultivo trampa en plantas de avena *Avena sativa*. Para ello se mezcló 200 g de suelo proveniente de la zona seleccionada (que poseía mayor población de HMA) con 600 g de un sustrato estéril que consistió en una mezcla de suelo y arena en proporción 1:1. Esta mezcla se colocó en macetas de 1000 g a las que se les adicionaron entre 30 a 40 semillas de avena previamente desinfectadas en alcohol 70% (durante 5 minutos) e hidratadas con agua destilada.

Los cultivos se mantuvieron durante 5 meses y se monitoreó la población de esporas de HMA a los 3 y 5 meses.



Figura 2.1 Elaboración de cultivo trampa para propagación de esporas de HMA

a) Desinfección y lavado de semillas, b) Llenado de macetas con sustrato, c) Siembra de semillas de avena, d) Riego con agua destilada, d) Mantenimiento de cultivos trampa.

2.9 Preparación del inóculo micorrízico

Transcurrido el tiempo de propagación de esporas, se desarrolló el inóculo de HMA de la siguiente manera:

- a) Se podó la biomasa aérea de las plantas de avena,
- b) El contenido de las macetas se vertió dentro de un recipiente plástico profundo,
- c) Se procedió a homogenizar con una pala, a fin de obtener un inóculo uniforme.

El inóculo preparado contenía suelo, raíces y una población media de 10 esporas/g de suelo.

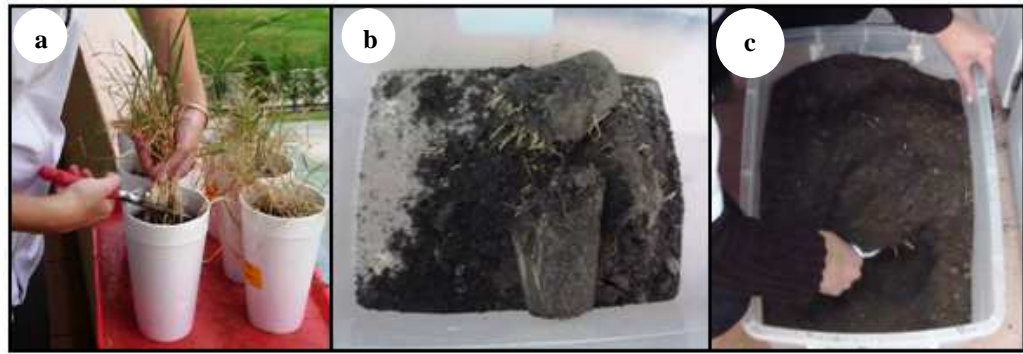


Figura 2.2 Preparación de inóculo micorrícico. a) Corte de biomasa aérea, b) Recolección de inóculo en recipiente, c) Homogenización de inóculo.

2.10 Esterilización y preparación de sustrato

El sustrato que se empleó para el trasplante de las plántulas de banano consistió en una mezcla: 30% arena 10% turba negra y 60% suelo negro.

Previa a la esterilización de la arena, esta se lavó con abundante agua corriente hasta eliminar todas las impurezas posibles y a continuación se acidificó con ácido clorhídrico HCl 1N hasta alcanzar un pH igual a 6.

A continuación se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lb durante 2 horas, luego de lo cual se secó en estufa a 80°C durante 24h. El procedimiento de esterilización se llevó a cabo de la misma manera para el suelo negro, mientras que la turba adquirida PROMIX PGX, se encontraba empacada en forma estéril desde la fábrica.

Una vez que los componentes del sustrato se encontraron secos, se procedió a homogenizar.

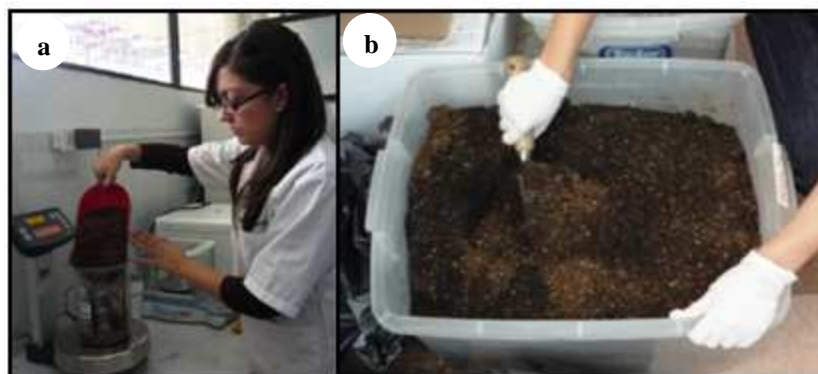


Figura 2.3 Preparación del sustrato. a) Pesaje de cada componente, b) Homogenización de la mezcla arena, turba y suelo negro.

2.11 Adecuación de cámara de crecimiento

Se realizó el aislamiento térmico de una estantería metálica de 1,74 m x 2,09m x 0,66 m, en la que se instalaron láminas de policarbonato blanco de 0.5 cm de espesor y planchas de poliestireno de 1 cm de espesor. Para abastecer de iluminación a la cámara, se instalaron 4 lámparas fluorescentes de 40 W en cada uno de los tres niveles, así como focos rojos de 100 W (para aumentar la temperatura de la cámara). Finalmente se instalaron termohigrómetros digitales en cada división a fin de controlar las condiciones ambientales dentro del recinto.

2.12 Diseño Experimental

En el presente trabajo de investigación, se estableció un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial 4X4. Se tomaron en cuenta dos factores, cuya interacción dio origen a los tratamientos que se aplicaron (Tabla 2.1).

Factor I: dosis de HMA expresadas gramos (g) de inóculo

- M0 control: 0 g de inóculo conteniendo
- M1 dosis baja: 50 g de inóculo conteniendo (total: 500 E ó 0,77E/g).
- M2 dosis media: 100 g de inóculo conteniendo (total: 1000 E ó 1,66 E/g).
- M3 dosis alta: 150 g de inóculo conteniendo (total: 1500 E ó 2,72 E/g)

Factor 2: dosis de *Azospirillum* en UFC/ml

- B0 control: (0 UFC/ml)
- B1 concentración baja: (10^6 UFC/ml)
- B2 concentración media: (10^7 UFC/ml)
- B3 concentración recomendada: (10^8 UFC/ml)

Tabla 2.1 Tratamientos aplicados en las plántulas de banano.

Dosis HMA	Concentración de <i>Azospirillum sp.</i>			
	B ₀ (control)	B ₁ (10^6 UFC/ml)	B ₂ (10^7 UFC/ml)	B ₃ (10^8 UFC/ml)
M ₀ (0 g inóculo)	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
M ₁ (50 g inóculo)	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈
M ₂ (100 g inóculo)	T ₉	T ₁₀	T ₁₁	T ₁₂
M ₃ (200 g inóculo)	T ₁₃	T ₁₄	T ₁₅	T ₁₆

Se realizaron 9 repeticiones por cada uno de los tratamientos y la unidad experimental estuvo constituida por 1 plántula de banano, con un total de 144 plantas para el ensayo.

Variables evaluadas para cada uno de los tratamientos:

- Altura de la planta: desde la base de la planta hasta la base del pecíolo de la última hoja emitida.
- Perímetro del pseudotallo: por encima de la corona del pseudotallo.
- Área foliar: mediante malla de puntos sobre la hoja crítica.
- Contenido foliar de nutrientes
- Contenido de nutrientes del suelo

Los datos obtenidos de la evaluación de las variables descritas se analizaron mediante el programa estadístico InfoStat de la siguiente manera:

- Modelos Lineales Generales y Mixtos de cada variable tomada tanto para los factores en estudio como para su interacción.
- Prueba LSD Fisher al 5% para cada uno de los factores y para la interacción.

- Regresión de las dosis de micorrizas y la interacción HMA-*Azospirillum* con las diferentes variables en estudio. En estas regresiones se utilizaron diferentes modelos matemáticos hasta encontrar el que mejor se ajustó a los datos reportados.

2.13 Trasplante de plántulas de banano

El sustrato y el inóculo, se colocaron en macetas de poliestireno de 32 oz previamente rotuladas, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 2.2. Proporciones de inóculo y sustrato para cada tratamiento

Tratamientos	Cantidad inóculo (g)	Cantidad sustrato (g)
T1, T2, T3, T4	0	700
T5, T6, T7, T8	50	650
T9, T10, T11, T12	100	600
T13, T14, T15, T16	200	500

A continuación se realizó un agujero de 8 cm de profundidad en el centro del sustrato, donde se colocó la proporción de inóculo correspondiente. Posteriormente se extrajeron las plántulas de banano de los frascos de vidrio y se enjuagaron suavemente las raicillas con agua destilada a fin de eliminar todo el resto de medio de cultivo. Luego, se distribuyó una plántula por maceta, se cubrieron las raicillas con sustrato y se regaron con una solución nutritiva de Hewitt (Anexo A), a razón de 40 ml por planta.

Una vez establecidas las plántulas, se tomaron las variables iniciales de crecimiento: altura y número de hojas y se situaron dentro de la cámara de crecimiento en forma aleatoria.



Figura 2.4 Aplicación de tratamientos y transplante. a) Fraccionamiento de inóculo por tratamiento, b) Llenado de macetas con sustrato, c) Aplicación de tratamientos, d) Trasplante de plántulas de banano, e) Riego con solución nutritiva, f) Ubicación de macetas en cámara de crecimiento.

2.14 Riego y control de condiciones ambientales

Las plántulas de banano fueron regadas con 30 - 50 ml de solución nutritiva de Hewitt, tres veces por semana, durante seis semanas. Luego del tiempo señalado se sustituyó la solución de nutrientes por agua destilada con igual periodicidad, en volumen de 50 ml, hasta concluir el ensayo.

Para mantener la humedad relativa de la cámara alrededor del 80%, se procedió a rociar suficiente agua destilada en cada nivel, dos veces al día, durante los siete días de la semana, por el tiempo que duró el ensayo.

2.15 Aislamiento de *Azospirillum spp.*

2.15.1 Aislamiento de bacterias diazótrofes a partir de suelo

1. Tamizado de muestras

Las muestras de suelo previamente recolectadas, se pasaron a través de un tamiz con una porosidad de 2 mm a fin de eliminar raíces, rocas y otras partículas presentes en el mismo.

2. Diluciones seriadas

- a) Se tomó una alícuota de 50 g, se colocó en un Erlenmeyer conteniendo 450 ml de agua destilada estéril y se mantuvo en agitación durante 30 minutos hasta obtener una solución homogénea de suelo. Esta mezcla constituyó la dilución 10^{-1} .
- b) Posteriormente, se procedió a realizar diluciones seriadas de la solución anteriormente preparada. Para ello se tomó 1 ml de la dilución 10^{-1} , se colocó en un tubo con 9 ml de agua destilada estéril y se agitó hasta homogenizar con lo que se consiguió la dilución 10^{-2} . El proceso se repitió sucesivamente hasta obtener la dilución 10^{-7} .

3. Siembra de diluciones en tubo

- a) Una vez que se prepararon las diluciones de suelo, se procedió a la siembra de las mismas en medio de cultivo Nitrogen Fixation Biological (NFb) semisólido (Anexo B). Se colocaron 300 μ L de la dilución respectiva en un tubo (100 x 13 mm) que contenía 6 ml de medio de

cultivo. Este procedimiento se realizó por triplicado, es decir, cada dilución fue sembrada tres veces.

- b) Finalmente los tubos inoculados se incubaron a 30°C durante 14 días.
- c) Transcurrido el tiempo señalado, se consideraron como tubos con crecimiento bacteriano positivo a aquellos que presentaron una película blanquecina de 2 a 3 mm bajo la superficie y cuyo medio de cultivo cambió su color de verde a azul, reacción que se produce por la alcalinización del medio, debido a productos que se forman a partir de la hidrólisis de la fuente de carbono (ácido málico).

2.15.2 Aislamiento de bacterias diazótrofes a partir de raíz

Con una pinza metálica tomaron las raíces de las recolectadas, se colocaron sobre un tamiz de 2 mm y se procedió a lavarlas con agua corriente durante 5 minutos.

Las raíces se colocaron sobre papel absorbente y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, estas se cortaron en secciones de 0,3 cm y se pesó 1 g de las mismas.

La alícuota de raíces se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril y se agitó vigorosamente a fin de homogenizar la solución obteniendo de esta manera la dilución 10^{-1} .

Posteriormente, se realizaron con las diluciones seriadas y la siembra en medio Nfb semisólido como se describió en la sección anterior.

2.16 Determinación del número más probable (NMP) de bacterias diazótrofes

Se estableció el NMP de bacterias fijadoras de nitrógeno por gramo de suelo o raíces, utilizando la tabla de Mc Crady (1915). Ver Anexo C; para ello se determinó el número característico de tres cifras, así:

La primera cifra del número característico corresponde al nivel de dilución menos concentrado en el que todos los tubos sean positivos y las dos restantes se forman con las diluciones precedentes. Este número se buscó en la tabla de Mc Crady (1917) y para determinar el NMP se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{NMP}{g} = \frac{N^{\circ} \text{ característico} \cdot V}{D}$$

Donde:

D: dilución correspondiente a la primera cifra

V: volumen de siembra en tubo

2.17 Confirmación del género

Para verificar la presencia del género de interés, a partir de los tubos considerados como positivos, se sembraron por estriado compuesto en cajas Petri conteniendo medio de enriquecimiento para *Azospirillum* (Anexo B). Estas se incubaron a 30°C durante 7 días.

Posteriormente, se seleccionaron como placas con crecimiento positivo a aquellas que presentaban colonias circulares, secas y de color blanco-traslúcido con centros verdosos.

2.18 Purificación

A partir de cultivos puros en medio de enriquecimiento, se estriaron colonias aisladas sobre medio Ácido Málico-Rojo Congo sólido (Anexo B) y se incubaron a 30°C durante 7 días.

Transcurrido el tiempo señalado, las colonias de *Azospirillum* se presentaron con una coloración típica de color rojo escarlata intenso. A continuación se realizaron pruebas fenotípicas y bioquímicas para la verificación de las cepas.

2.19 Pruebas de identificación

2.19.1 Pruebas fenotípicas

a) Tinción Gram modificada por Hucker

Para realizar la tinción Gram modificada por Hucker (1921), se utilizaron los reactivos señalados en el Anexo D y se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

En un portaobjetos se colocó una gota de agua destilada con el asa de siembra (previamente esterilizada a la llama), se colocó una pequeña cantidad de suspensión de bacterias, se extendió y mezcló la gota y las bacterias sobre el porta. A continuación se fijaron a la llama del mechero hasta que se secó.

Pasos para realizar la coloración:

1. Se cubrió el frotis con cristal violeta durante 1 minuto (colorante inicial que penetra en todas las células bacterianas, tanto Gram positivas como Gram negativas; a través de la pared bacteriana),
2. A continuación se realizó un enjuague con agua corriente,
3. Se adicionó unas gotas de Lugol durante 1 minuto (mordiente que refuerza la unión del colorante)
4. Se cubrió con alcohol cetona por 1 minuto (decolorante que elimina el cristal violeta-lugol de las células bacterianas Gram negativas por disolución de su pared celular)
5. Se realizó un enjuague con agua corriente,
6. Se cubrió con safranina por 1 minuto (colorante de contraste que pone de manifiesto las células Gram negativas)
7. Se realizó un enjuague con agua corriente,
8. Se secó suavemente y sin frotar

Finalmente se observaron las placas en el microscopio óptico a partir del aumento 10x hasta llegar a 40x

b) Tinción de gránulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB)

Para esta prueba se utilizaron cultivos de 24 y 48 horas incubados a 35 °C en NFb semisólido. La tinción de gránulos de PHB se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por Bradshaw (1976), el cual se describe a continuación:

1. Se preparó un frotis del velo bacteriano en un portaobjetos limpio. Se secó al aire y se fijó a la llama.
2. Se cubrió el portaobjetos con negro Sudán B y se dejó reaccionar durante 10 minutos.

3. Se eliminó el exceso de colorante y se secó colocando una tira de papel secante sobre el frotis hasta que todo el colorante se absorbió; evitando mover o restregar el papel al levantarlo.
4. Se lavó el frotis con unas gotas de xileno para eliminar el exceso de colorante y se volvió a secar con papel secante.
5. Se tiñó con safranina acuosa al 5% m/v durante 10 a 15 segundos. Se lavó inmediatamente con agua corriente y se dejó secar al aire.
6. En el microscopio y con el objetivo de inmersión se examinó la preparación para detectar las partículas, las cuales aparecieron de color azul o negro en contraste con el rojo del citoplasma.

2.19.2 Pruebas bioquímicas

Se llevó a cabo las siguientes pruebas bioquímicas, de acuerdo a lo señalado en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (2005) para el género en estudio:

Pruebas universalmente positivas para el género Azospirillum

1. Oxidasa
2. Ureasa
3. Hidrólisis de esculina
4. Catalasa (reacción varía de casi indetectable a fuerte)
5. Movilidad (si bien no es una prueba bioquímica, esta se ensayará junto con la producción de indól utilizando medio SIM)

Pruebas universalmente negativas para el género Azospirillum

1. Hidrólisis de gelatina
2. Producción de indol

Pruebas variables para el género Azospirillum

1. Reducción de nitratos
2. Asimilación de sustratos (manitol , glucosa)

Adicionalmente se confirmaron los resultados obtenidos mediante una batería de pruebas API 20NE.

2.20 Selección de la cepa inóculo de acuerdo a su capacidad de producción de ácido 3-indol acético AIA

2.20.1 Curva patrón de ácido-3-indól acético (AIA)

La curva estándar de AIA se determinó mediante soluciones patrón de AIA de concentraciones conocidas como se muestra en la tabla 2.3, preparadas a partir de una solución madre de concentración 100 µg/ml:

Tabla 2.3 Soluciones de AIA para la curva patrón

Concentración (µg/ml)	Volumen de solución madre (µL)	Volumen de agua destilada (µL)
0	0	10000
2	200	9800
4	400	9600
6	600	9400
8	800	9200
10	1000	9000
15	1500	8500
20	2000	8000
30	3000	7000
40	4000	6000
50	5000	5000
60	6000	4000

Por otro lado, se preparó el reactivo de Salkowski (Anexo E) a través del cual se llevó a cabo la reacción colorimétrica (Figura 2.5) para la curva patrón (directamente proporcional a la cantidad de AIA), la cual se produce gracias a una reacción oxidativa causada por el ácido y una transaminación que

provoca la sustitución del grupo amino por el cloro del FeCl_3 presente en el reactivo de Salkowski (modificado por Bric *et al.*, 1991).

Una vez preparadas las soluciones patrón de AIA, se transfirió 1 ml de cada una de ellas a tubos de ensayo de vidrio y se adicionaron 4 ml del reactivo de Salkowski, se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos (Bric *et al.*, 1991). A continuación, se leyeron por triplicado las absorbancias generadas por cada solución a una longitud de onda de 530 nm en un espectrofotómetro Jenway 6305, utilizando como blanco, agua destilada sin la adición de AIA.



Figura 2.5 Reacción colorimétrica generada a partir de soluciones patrón de AIA.

A partir de los resultados obtenidos y mediante el uso del programa Microsoft Excel 2007, se construyó una gráfica de Absorbancia vs. Concentración a través de la que se determinó la ecuación de la recta y el valor de r^2 .

2.20.2 Determinación de la concentración de AIA en cultivos de *Azospirillum*

A partir de cultivos de 48 horas en agar nutriente, se sembraron tres asadas de bacterias en frascos de vidrio ámbar conteniendo 50 ml de caldo tripticasa soya (TSB) suplementado con 0,01 g/L de triptófano (Trp), estos se incubaron a temperatura ambiente durante 48 h a 120 rpm.

Se midió la turbidez del medio de cultivo a una longitud de onda de 530 nm hasta obtener una absorbancia de 0,2, que corresponde a una densidad celular aproximada de 10^8 células/ml. A partir de esta suspensión se realizó una dilución 1/10 con el fin de obtener una concentración de 10^7 células/ml.

Se transfirieron 6 ml de esta a 54 ml de caldo TSB-Trp y se incubaron a temperatura ambiente y agitación 120 rpm.

A partir de esta suspensión se realizaron mediciones de concentración de AIA a las 16, 20, 24 y 48 horas de incubación, como se describe a continuación.

Se tomaron 2 ml de las suspensiones bacterianas de cada uno de los aislados y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. Se llevaron 2 ml del sobrenadante a tubos estériles y se añadió 4 ml de reactivo de Salkowski, se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Finalmente, se determinó por triplicado la absorbancia de cada una de las suspensiones en un espectrofotómetro Jenway 6305 a una longitud de onda de 530 nm. A partir de los datos obtenidos y mediante la ecuación de la recta derivada de la curva patrón, se estableció la concentración de AIA para cada aislado a diferentes tiempos de incubación. Una vez realizadas todas las mediciones y los cálculos correspondientes, se seleccionó aquella cepa de *Azospirillum* capaz de producir mayor cantidad de AIA en el tiempo.

2.21 Desarrollo del inóculo bacteriano

Para desarrollar el inóculo bacteriano, se tomaron frascos ámbar de 100 ml conteniendo 50 ml de caldo nutritivo estéril. Se sembraron cuatro asadas de bacterias a partir de un cultivo de 48 h en agar tripticasa soya y se incubaron en agitación a 120 rpm a 30°C, durante 48 horas.

Transcurrido el tiempo señalado se midió la absorbancia de la suspensión bacteriana a 540 nm y se ajustó la densidad óptica de acuerdo a la escala 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), una vez realizado el ajuste, se procedió a realizar una dilución 1/10 para obtener una solución bacteriana con concentración aproximada de 10^7 UFC/ml y finalmente se preparó el inóculo bacteriano de la siguiente manera:

Volumen de inóculo por planta: 20 ml

Concentraciones:

- 10^8 : para preparar el inóculo con la concentración recomendada, se realizó una dilución 1/10 de la suspensión bacteriana ajustada (10^7 UFC/ml). Se tomaron 72 ml de la misma y se dispensaron sobre 648 ml de solución salina 0,85%.
- 10^7 : para preparar el inóculo con la concentración media, se realizó una dilución 1/100 de la suspensión bacteriana ajustada. Se tomaron 72 ml de la misma y se dispensaron sobre 648 ml de solución salina 0,85%.
- 10^6 : para preparar el inóculo con la concentración baja de bacterias, se realizó una dilución 1/1000 de la suspensión bacteriana ajustada. Se tomaron 72 ml de la misma y se dispensaron sobre 648 ml de solución salina 0,85%.
- 0: para la concentración cero o control se prepararon 720 ml de solución salina 0,85%.

Nota: para cada una de las diluciones, se realizó la medición y registro de la absorbancia de la suspensión a 540 nm.

Volumen de inóculo por planta: 40 ml

Concentraciones:

- 10^8 : para preparar el inóculo con la concentración recomendada, se realizó una dilución 1/10 de la suspensión bacteriana ajustada. Se tomaron 144 ml de la misma y se dispensaron sobre 1296 ml de solución salina 0,85%.
- 10^7 : para preparar el inóculo con la concentración media, se realizó una dilución 1/100 de la suspensión bacteriana ajustada. Se tomaron 144 ml de la misma y se dispensaron sobre 1296 ml de solución salina 0,85%.
- 10^6 : para preparar el inóculo con la concentración baja de bacterias, se realizó una dilución 1/1000 de la suspensión bacteriana ajustada. Se tomaron 144 ml de la misma y se dispensaron sobre 1296 ml de solución salina 0,85%.
- 0: para la concentración cero o control se prepararon 1440 ml de solución salina 0,85%.

2.22 Inoculación en plantas de banano

Transcurrido dos meses y medio, a partir del trasplante de las plántulas de banano con su respectiva aplicación de HMA, se preparó un inóculo bacteriano (de acuerdo a las concentraciones planteadas en el diseño experimental) y se procedió a aplicar la primera dosis correspondiente de 20 ml del inóculo en cada planta. Después de 2 meses, de la primera inoculación bacteriana, se realizó una segunda aplicación del inóculo bacteriano (en un volumen de 40 ml por planta).

2.23 Monitoreo y Evaluación final

Se realizaron monitoreos de las variables de crecimiento: altura, perímetro de pseudotallo y área foliar a los 70 y 98 días, mientras que la evaluación final se llevó a cabo cinco meses después del establecimiento del ensayo. Para ello se midieron las siguientes variables: crecimiento: altura,

perímetro del pseudotallo, área foliar, índice plastocrónico, biomasa aérea y radical, contenido de nutrientes en suelo y en tejido foliar; así como la determinación de la población de esporas en suelo, porcentaje de colonización y determinación de población bacteriana en suelo y raíces.

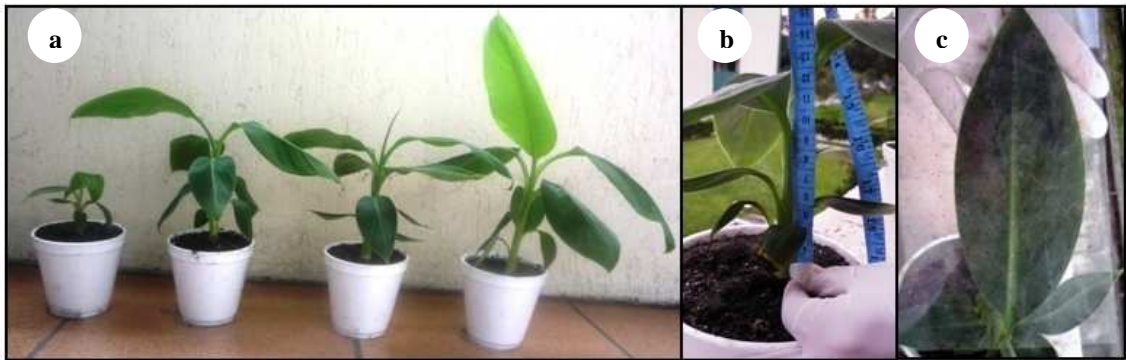


Figura 2.6 Evaluación final. a) Clasificación de plantas por tratamiento, b) Medición de altura, c) Medición de área foliar

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Propagación de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) nativos del cultivo de banano (*Musa paradisiaca*)

El conteo de esporas de HMA extraídas de muestras de suelo de las siete haciendas de HDINEAGROS S.A, mostró que las poblaciones de estos propágulos eran en general muy bajos en todos los sitios muestreados, no obstante, se seleccionó la zona con mayor número de esporas y correspondiente a la Hacienda Central con 1,07 esporas/ g de suelo (Figura 3.1).

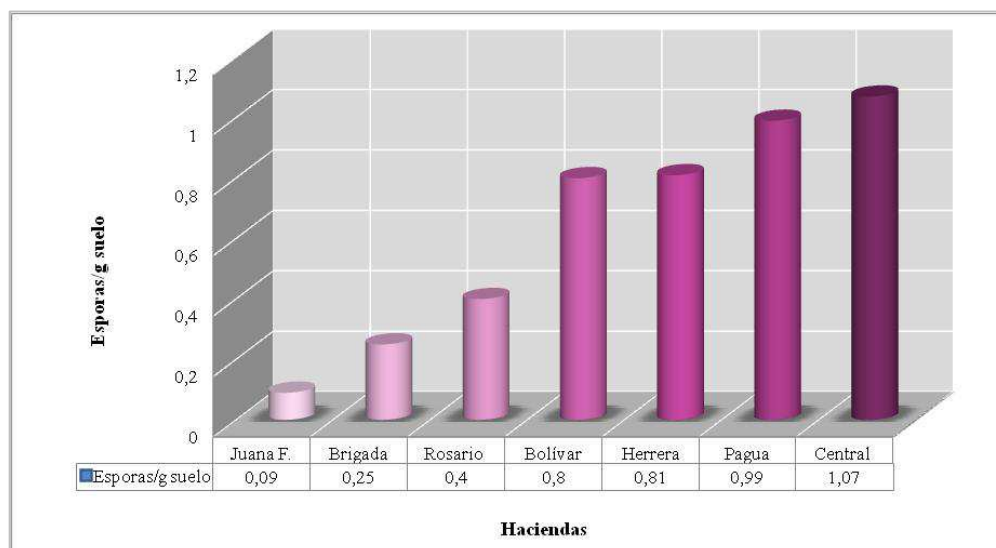


Figura 3.1 Conteo poblacional de esporas de HMA nativas del cultivo de banano.

Para la propagación de las esporas de HMA, se llevó a cabo un cultivo trampa en plantas de avena, utilizando el sustrato descrito en la sección 2.8. Transcurridos cinco meses a partir del establecimiento del cultivo, se obtuvo una población de 10 esporas/g (Figura 3.2).

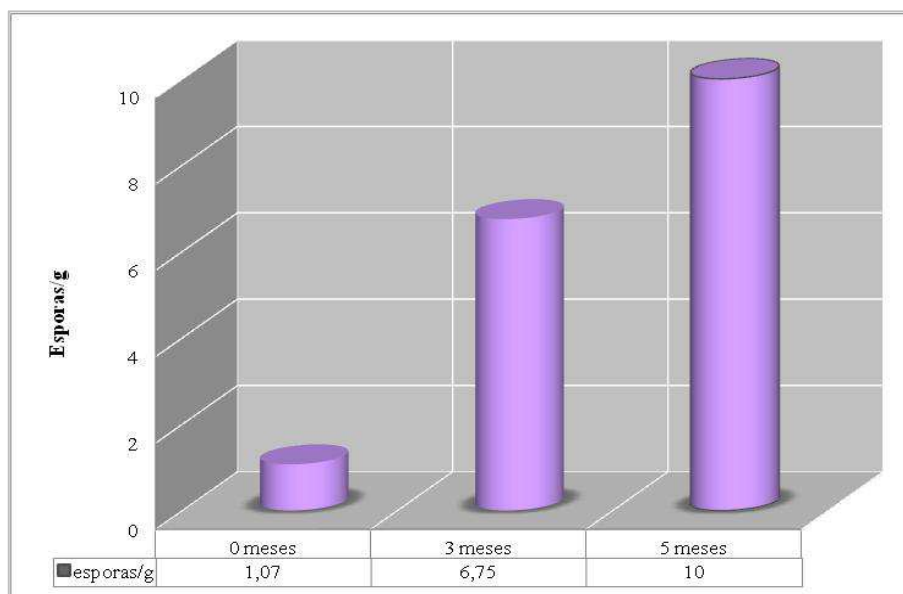


Figura 3.2 Incremento de la densidad poblacional de esporas de HMA en cultivo trampa de avena.

3.2 Densidad poblacional de bacterias diazótrofes en muestras de suelo y raíces de banano

Se realizaron muestreos de suelo y raíces del cultivo de banano en cuatro puntos de la Hacienda Central (Tabla 3.1), a partir de los cuales se llevó a cabo el aislamiento de bacterias diazótrofes en medio de cultivo NFb (Nitrogen Fixation Biological) semisólido y se estimó la densidad poblacional de cada aislamiento, que se encontró en el rango de 10^6 a 10^8 microorganismos/g de raíces y 10^5 a 10^6 microorganismos/g de suelo (Tabla 3.2).

Tabla 3.1 Localización geográfica de los puntos de muestreo de suelo y raíces para el aislamiento de *Azospirillum*

Punto de Muestreo	Latitud	Longitud	Altitud
G1	S03°17'90,1''	W079°53'60,0''	15 msnm
G2	S03°17'89,0''	W079°53'62,4''	15 msnm
G3	S03°17'88,8''	W070°53'62,8''	15 msnm
G4	S03°17'88,5''	W079°53'63,1''	15 msnm

En la tabla 3.2 se observa que la densidad poblacional bacteriana en raíces supera a la población en suelo, evidenciando la existencia de microorganismos fuertemente adheridos a las raíces de banano muestreadas.

Tabla 3.2 Densidad poblacional de bacterias diazótrofes en suelo y raíces.

Muestra	Punto	Densidad poblacional (microorganismos/g)
Suelo	G1	2,5E ⁰⁵
	G2	1,4E ⁰⁶
	G3	1,4E ⁰⁶
	G4	3,0E ⁰⁵
Raíces	G1r	7,5E ⁰⁶
	G2r	1,4E ⁰⁷
	G3r	1,4E ⁰⁸
	G4r	1,4E ⁰⁸

3.3 Aislamiento e identificación de *Azospirillum* spp.

Luego de realizar el aislamiento de bacterias diazótrofes del suelo y de raíces, los aislados obtenidos se sembraron en medio Ácido Málico-Rojo Congo sólido, donde las colonias pertenecientes al género *Azospirillum* toman una coloración característica que permiten su identificación, como se describe a continuación.

3.3.1 Identificación fenotípica

Para la identificación fenotípica del género *Azospirillum* se tomaron en cuenta tres criterios, según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (2005):

- a) Coloración y morfología de las colonias en medio Ácido Málico-Rojo Congo
- b) Tinción Gram modificada por Hucker
- c) Presencia de gránulos de poli-β hidroxibutirato

Las cepas obtenidas de acuerdo a estos criterios se muestran en la Tabla 3.3

Tabla 3.3 Características morfológicas de las cepas de *Azospirillum* aisladas de suelo y raíces del cultivo de banano.

Cepa	Morfología de la colonia	Tinción Gram	Gránulos PHB
G1r	Colonias elevadas, borde liso translúcido, centro rojo opaco	Bacilos Gram (-)	+
G2r	Colonias elevadas, borde irregular, color rojo escarlata	Bacilos Gram (-)	+
G3ra	Colonias elevadas, borde liso, color rojo brillante	Bacilos Gram (-)	+
G3rb	Colonias planas, borde liso, color rojo opaco con centro más claro	Bacilos Gram (-)	+
G4r	Colonias elevadas, borde irregular, color rojo opaco	Bacilos Gram (-)	+
G2	Colonias planas, borde liso, color rojo brillante	Bacilos Gram (-)	+
G4a	Colonias elevadas, borde liso translúcido, centro rojo claro opaco	Bacilos Gram (-)	+
G4b	Colonias elevadas, borde liso, rojo escarlata brillante	Bacilos Gram (-)	+

El símbolo “+” representa presencia de la característica en estudio

Las cepas provenientes de los cultivos en medio NFb fueron identificadas con el código del sitio de muestreo y se agregó la letra r cuando provenían de raíces. Como se observa en la Tabla 3.3, de los aislamientos obtenidos a partir de suelo, solamente los de la zona G2 y G4 contenían bacterias del género *Azospirillum* presentándose en esta última dos tipos de colonias, G4a y G4b. Por el contrario, todos los aislados provenientes de raíces, contenían bacterias del género de interés, encontrándose en las raíces de la zona de muestreo G3 dos tipos de colonias, G3ra y G3rb.

3.3.2 Identificación bioquímica

Se llevó a cabo la identificación bioquímica del género *Azospirillum* de acuerdo a lo señalado en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (2005), cuyos resultados esperados constan en la sección 2.5.2. La Tabla 3.4 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 3.4 Características bioquímicas de las cepas del género *Azospirillum* aisladas de suelo y raíces del cultivo de banano

Cepa	OX	CAT	UREASA	ESC	MOV	IND	GEL	NIT	MAN	GLU
G1r	+	+	+	+	+E	-	-	+	+	+
G2r	+	+	+	+	+E	-	-	+	+	+
G3ra	+	+	+	+	+E	-	-	-	-	-
G3rb	+	+	+	+	+E	-	-	+	-	-
G4r	+	+	+	+	+E	-	-	+	+	+
G2	+	+	+	+	+E	-	-	+	+	+
G4a	+	+	+	+	+E	-	-	-	-	-
G4b	+	+	+	+	+E	-	-	-	+	+

OX: oxidasa, **CAT:** catalasa, **ESC:** hidrólisis de esculina, **MOV:** movilidad (+E: movilidad en espiral), **IND:** producción de indol, **GEL:** hidrólisis de gelatina, **NIT:** reducción de nitratos, **MAN:** asimilación de manitol, **GLU:** asimilación de glucosa.

3.4 Selección de la cepa de *Azospirillum* para la preparación del inóculo bacteriano

Una vez que se realizó la identificación fenotípica y bioquímica del género, se llevó a cabo la selección de la cepa inóculo en base a su capacidad de producción de ácido indól acético. Para ello se generó una curva estándar de AIA (Figura 3.3) cuya ecuación se utilizó para estimar la producción de esta fitohormona para cada una de las cepas (Figura 3.4).

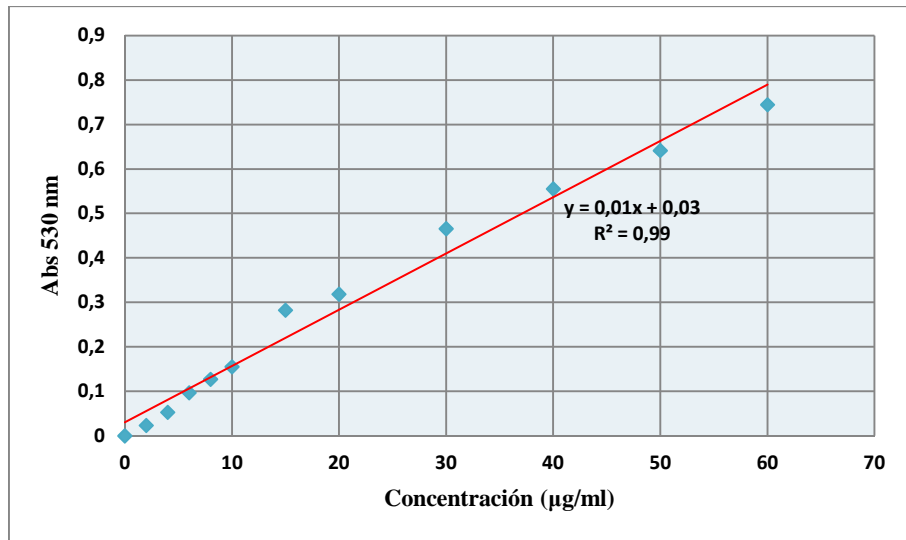


Figura 3.3 Curva patrón de ácido indól acético

La ecuación generada en la Figura 3.3 y que permite estimar la cantidad de fitohormona producida por las cepas de *Azospirillum* es la siguiente:

$$AIA [\mu g/ml] = \frac{Abs_{530nm} - 0,03}{0,01}$$

La Figura 3.4 muestra que la producción de AIA por parte de todas las cepas es constante y en ascenso durante las primeras 20 horas, sin embargo, a partir de este tiempo la síntesis de la fitohormona decrece sistemáticamente. A pesar de que la tendencia en relación a la producción de AIA es similar en todos los aislados, la cepa que produce mayor cantidad de esta sustancia es G4b con una concentración máxima de 6,33 µg/ml. Por tal razón esta constituyó la cepa inóculo.

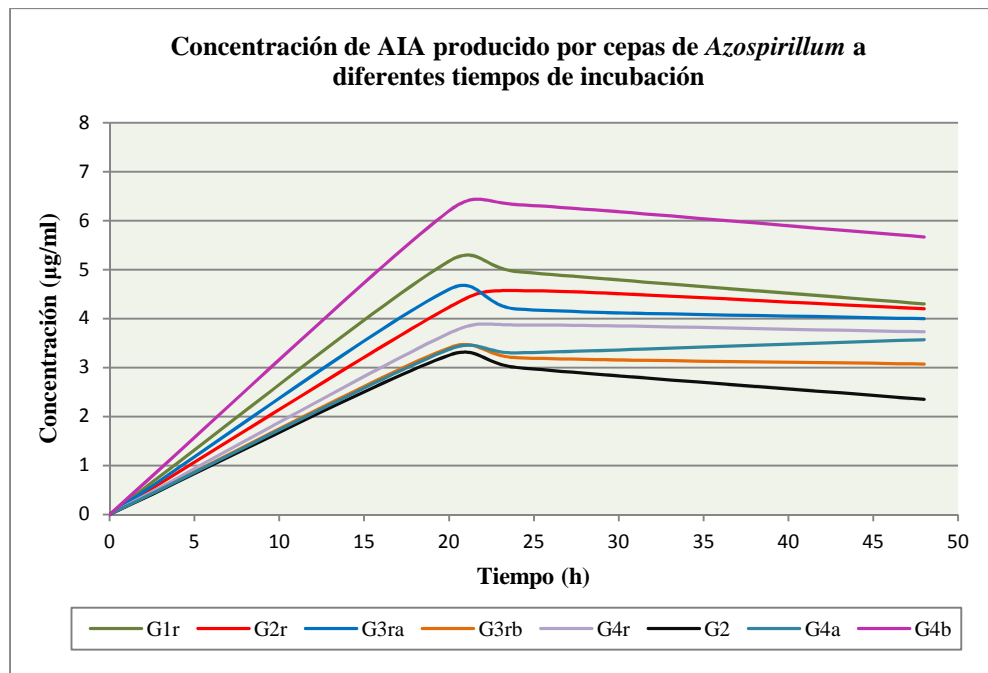


Figura 3.4 Concentración de AIA producido por las cepas de *Azospirillum*

3.5 Evaluación del efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el crecimiento de plántulas de banano micropropagadas

En la presente investigación se llevó a cabo la aplicación de HMA, *Azospirillum* y su interacción sobre plántulas de banano micropropagadas de acuerdo al Diseño Experimental descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. El ensayo abarcó un período de 5 meses, tras lo cual se realizó la evaluación del mismo.

Los datos correspondientes a las variables: altura, perímetro y área foliar, en primera instancia fueron transformados a tasas de crecimiento (incremento de la variable en un período de tiempo) y fueron analizados junto con los datos de biomasa aérea, biomasa radical, población de esporas/g y porcentaje de colonización, mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos, utilizando una prueba de comparación de medias de LSD Fisher al 5%. Posteriormente se analizaron modelos matemáticos de regresión para conocer el comportamiento de las variables en el tiempo y en relación a los factores aplicados.

Los resultados obtenidos para cada variable de respuesta se muestran a continuación.

3.5.1 Altura

Análisis estadístico

Para obtener un análisis real del efecto de los factores HMA (hongos micorrícicos arbusculares) y *Azospirillum* sobre la altura de la planta, se realizó el cálculo de su tasa de crecimiento. A partir de esos datos, se llevó a cabo el análisis estadístico, cuyos resultados se presentan en dos períodos de tiempo: 0-70 días (solo efecto de HMA) y 70-150 días (interacción entre HMA y *Azospirillum*).

La Tabla 3.5 muestra el efecto de los HMA sobre el incremento de altura entre los 0 a 70 días. Se observa que las plantas que fueron inoculadas, presentan una media muestral mayor frente a aquellas que no poseen micorrizas, es decir, la altura incrementa significativamente cuando existe la presencia HMA. Además, se advierte que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos que poseen las distintas dosis de HMA, sin embargo, se evidencia que el incremento de altura más alto corresponde al tratamiento de 100 g con una media de 5,76 cm. Se debe tomar en cuenta que la dosis señalada no es la que en definitiva produce una mejor respuesta de la variable altura para el ensayo, debido a que este análisis se está realizando para el período de 0-70 días y las HMA muestran su efecto real a partir de los tres meses de su aplicación. No obstante, en la Tabla 3.5 se puede observar que estas mejoran sutilmente el crecimiento de las plantas en etapas tempranas de la inoculación.

Tabla 3.5 Efecto de la inoculación de HMA sobre el incremento de altura para el período 0-70 días

Tratamiento	Altura (cm)
100 g	5,76 a
50 g	5,40 a
200 g	5,13 a
0 g	1,97 b
$p = 0,0001$	
$p \leq 0,05$ indica diferencias significativas	

En la Tabla 3.6 se muestra que en el período 70 a 150 días, los tratamientos que poseen el factor micorrizas presentan diferencias estadísticas significativas, es decir, cada dosis de HMA aplicada, produce una respuesta distinta sobre la variable; siendo la de 200 g la que causa un incremento significativo de altura (9,82 cm) respecto a las restantes (Tabla 3.7).

Tabla 3.6 Prueba de hipótesis para la comparación de alturas promedio para el período 70-150 días.

Factor	Valor p
HMA	0,0001
AZO	0,2024
HMA : AZO	0,9673
$p \leq 0,05$ indica diferencias significativas	

Por otro lado, los factores *Azospirillum* y la interacción (HMA-*Azospirillum*) no presentan diferencias estadísticas entre sus tratamientos (Tabla 3.6), es decir, las diferentes dosis de bacterias y las diversas interacciones HMA-*Azospirillum* tienen efectos similares sobre la variable en estudio.

Tabla 3.7 Efecto de la inoculación de HMA sobre el incremento de altura para el período 70-150 días

Tratamiento	Altura (cm)
200 g	9,82 a
100 g	9,00 ab
50 g	8,19 b
0 g	1,59 c

A pesar de que no existen diferencias estadísticas para la interacción HMA-*Azospirillum*, la Tabla 3.8 muestra el efecto de cada una de ellas sobre el incremento de altura para el período 70-150 días. En primera instancia se observa que los tratamientos con micorrizas y la interacción HMA-*Azospirillum* producen un desarrollo significativo de la altura en referencia a los tratamientos no inoculados con HMA. Además, si se analiza el incremento promedio que produce cada interacción, se evidencia que la que posee 200 g de HMA y $1,5E^8$ UFC/ml de *Azospirillum* promueve un mayor crecimiento de la planta, con un aumento de 10,83 cm en el período de tiempo señalado.

Tabla 3.8 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el incremento de altura para el período 70-150 días

HMA (g)	AZO (UFC/ml)	Altura (cm)
200	$1,50E^8$	10,83
200	$1,50E^7$	10,53
100	$1,50E^6$	10,00
200	0	9,82
100	$1,50E^7$	9,80
200	$1,50E^6$	9,80
50	$1,50E^6$	9,39
100	0	9,00
100	$1,50E^8$	8,58
50	$1,50E^7$	8,22
50	$1,50E^8$	8,21
50	0	8,19
0	$1,50E^8$	3,00
0	$1,50E^7$	2,97
0	$1,50E^6$	2,17
0	0	1,59

HMA: dosis HMA, **AZO:** dosis *Azospirillum*

Tomando en cuenta el tratamiento que promueve el mayor crecimiento de la planta en relación a la altura, en la Figura 3.5 se puede observar que la inoculación de los microorganismos por separado así como su co-inoculación producen un incremento significativo en la altura de las plantas en relación al grupo control.

Además, se observa que cuando los HMA y *Azospirillum* son aplicados en conjunto, favorecen el incremento de la variable, en comparación a cuando se inoculan por separado.

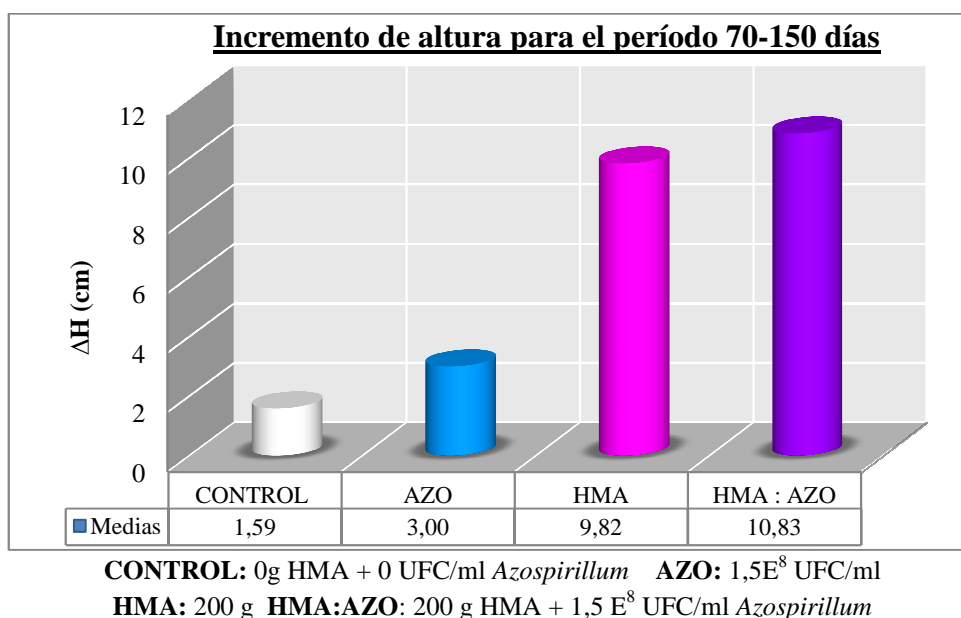
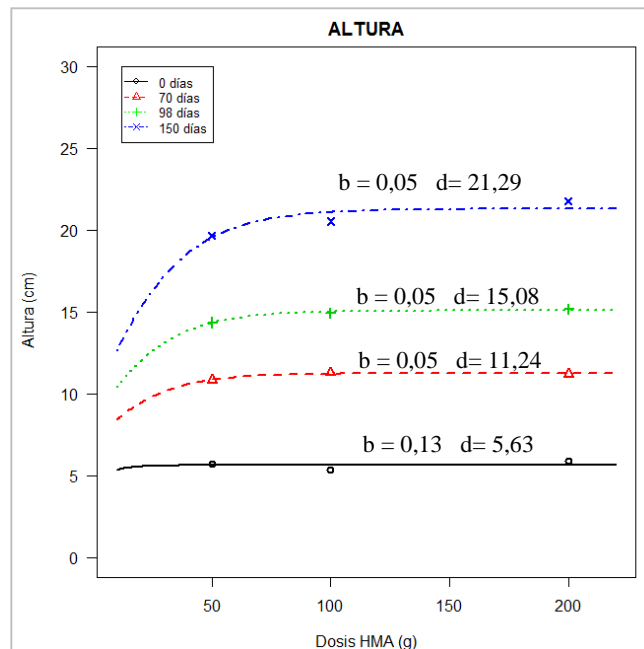


Figura 3.5 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el incremento de altura para el período 70-150 días

Análisis matemático

Debido a que no existen diferencias significativas para el factor *Azospirillum* ni para la interacción de los microorganismos, se realizó el análisis matemático para la variable altura, tomando en cuenta únicamente al elemento que presenta significancia estadística, el factor micorrizas.

Utilizando el lenguaje R mediante editor de código Tinn-R, se llevó a cabo el análisis de regresión para los datos de la variable altura, encontrándose que estos se ajustan a una Regresión Logística de Gompertz, cuyo comportamiento se define en la Figura 3.6.



b: pendiente de la curva **d:** límite superior

Figura 3.6 Curvas de regresión para la variable altura a los 0, 70, 98 y 150 días.

En la Figura 3.6 se encuentran las curvas de la variable altura para los tiempos 0, 70, 98 y 150 días, con sus respectivas pendientes y límites superiores. Se observa en forma general que por cada gramo de inóculo de HMA que se adiciona, la altura se incrementa en 0,05 cm, llegando a un valor máximo de 11,24 cm a los 70 días, 15,08 cm a los 98 días y finalmente alcanzando una altura máxima de 21,29 cm al cabo de 150 días.

En síntesis (Figura 3.7), se evidencia que conforme incrementa la dosis de HMA, la altura de la planta también aumenta, obteniéndose la máxima altura a una dosis de 200 g de inóculo. Además se observa que el crecimiento de la planta sufre una aparente “estabilización” a partir de una dosis aproximada de

100 g de inóculo, donde en lugar de experimentar un crecimiento acelerado como se observa a dosis menores de HMA, la altura incrementa gradualmente con el aumento de la dosis micorrizas.

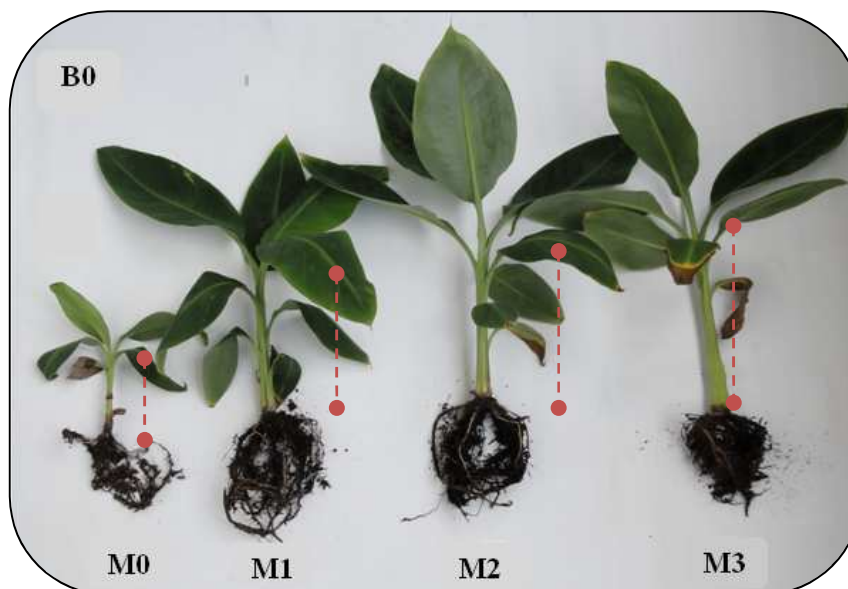


Figura 3.7 Comparación de la altura de individuos sometidos a las diferentes dosis de micorrizas en ausencia de *Azospirillum*.

3.5.2 Perímetro

Análisis estadístico

Para analizar los datos del perímetro del pseudotallo, en primer lugar se realizó el cálculo de su tasa de crecimiento. A partir de estos datos, se llevó a cabo el análisis estadístico, cuyos resultados se presentan en dos períodos de tiempo: 0-70 días (solo efecto de HMA) y 70-150 días (interacción entre HMA y *Azospirillum*).

La Tabla 3.9 muestra el efecto de HMA sobre el incremento de perímetro entre los 0 a 70 días. Se observa que existen diferencias estadísticas entre los tratamientos que contienen HMA y el grupo control, lo que indica que

las plantas inoculadas presentan un incremento de perímetro que supera a aquellas sin HMA.

Tabla 3.9 Efecto de la inoculación de HMA sobre el incremento de perímetro para el período 0-70 días

Tratamiento	Perímetro (cm)
100 g	3,75 a
50 g	3,74 a
200 g	3,62 a
0 g	3,06 b
$p = 0,0001$	
<i>p ≤ 0,05 indica diferencias significativas</i>	

En la Tabla 3.11 se observa que en el período 70 a 150 días, el factor micorrizas presenta diferencias significativas, esto se aprecia concretamente entre los tratamientos que poseen las diferentes dosis de HMA en relación al grupo control. Evidentemente las respuestas de las plantas a cada uno de los tratamientos son diferentes, siendo el de 200 g el que produce un mayor incremento de perímetro (2,19 cm) respecto a los tratamientos con menores dosis de HMA (Tabla 3.10).

Tabla 3.10 Efecto de la inoculación de HMA sobre el incremento de perímetro para el período 70-150 días

Tratamiento	Perímetro (cm)
200 g	2,19 a
100 g	2,10 a
50 g	1,70 b
0 g	0,76 c

Por otro lado, los factores *Azospirillum* y la interacción (HMA-*Azospirillum*), no muestran diferencias estadísticas entre sus tratamientos (Tabla 3.8), lo que indica, que las diferentes dosis de bacterias y las diversas

interacciones HMA-*Azospirillum* tienen efectos similares sobre la variable en estudio.

Tabla 3.11 Prueba de hipótesis para la comparación de medias (perímetro) para el período 70-150 días.

Factor	Valor <i>p</i>
HMA	0,0001
AZO	0,7033
HMA : AZO	0,5538

p ≤ 0,05 indica diferencias significativas

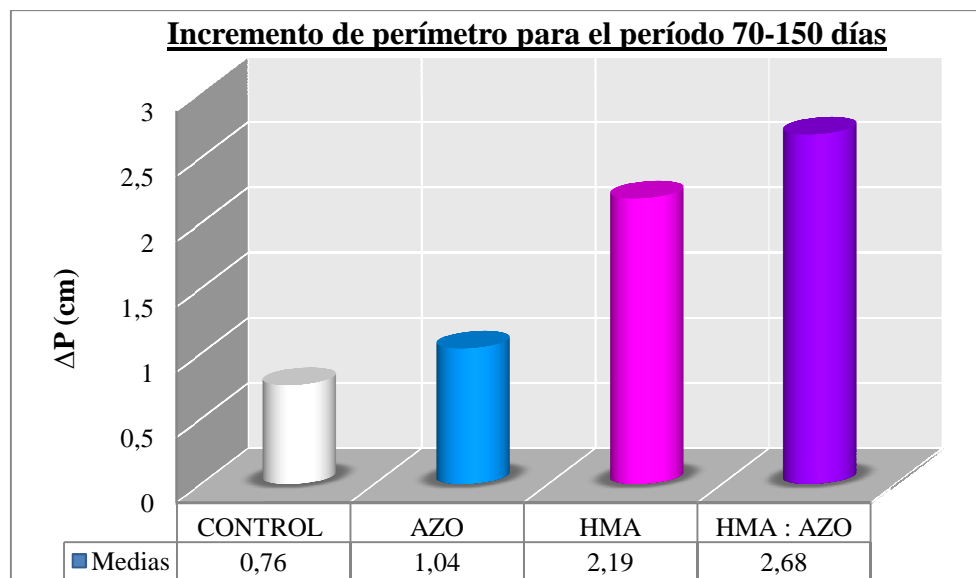
Si bien, la prueba de hipótesis revela que no existen diferencias estadísticas para la interacción HMA-*Azospirillum*, la Tabla 3.12 muestra el efecto de la inoculación combinada de los microorganismos sobre el incremento de perímetro en el período 70-150 días. Claramente se evidencia que tratamientos con las mayores dosis de micorrizas (100 y 200 g) y/o la interacción HMA-*Azospirillum* presentan incrementos de perímetro más altos en relación a los tratamientos que poseen la dosis más baja de HMA (50 g) o que han sido inoculados únicamente con *Azospirillum*. Asimismo, al analizar el incremento promedio que produce cada interacción, se advierte que el tratamiento que posee 200 g de HMA y $1,50E^8$ UFC/ml de *Azospirillum* induce un significativo desarrollo de la planta en cuanto a perímetro con un valor de 2,68 cm dentro del período de tiempo señalado.

Tabla 3.12 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el incremento de perímetro para el período 70-150 días

HMA (g)	AZO (UFC/ml)	Perímetro (cm)
200	1,50E ⁸	2,68
200	1,50E ⁷	2,32
100	1,50E ⁷	2,26
200	1,50E ⁶	2,23
200	0	2,19
100	1,50E ⁶	2,10
100	0	2,10
100	1,50E ⁸	2,07
50	1,50E ⁶	1,82
50	0	1,70
50	1,50E ⁸	1,67
50	1,50E ⁷	1,43
0	1,50E ⁸	1,04
0	1,50E ⁷	1,00
0	1,50E ⁶	0,92
0	0	0,76

HMA: dosis HMA, **AZO:** dosis *Azospirillum*

Considerando el tratamiento que promueve el mayor crecimiento de la planta en relación al perímetro, en la Figura 3.8 se aprecia que la inoculación de los microorganismos por separado así como su co-inoculación producen un incremento representativo del perímetro en relación a las plantas control. Además, se observa que cuando los HMA y *Azospirillum* son aplicados en conjunto, potencian el incremento de la variable, en comparación a cuando se inoculan por separado.



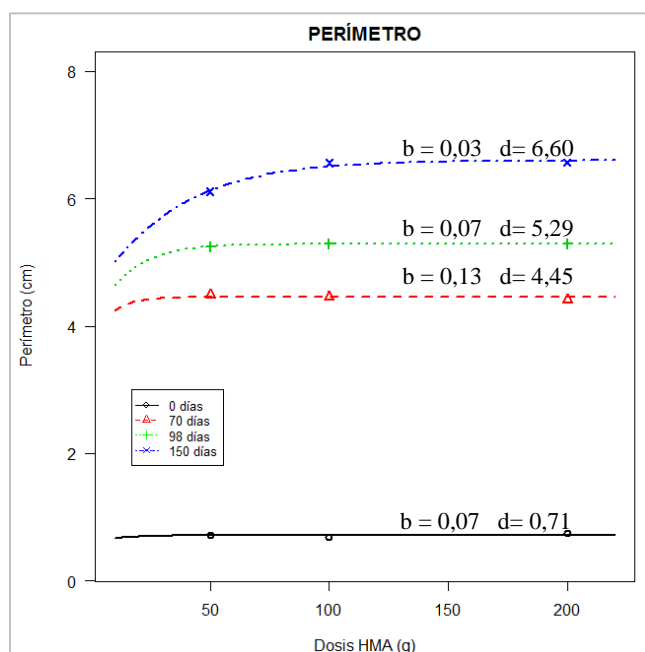
CONTROL: 0g HMA + 0 UFC/ml *Azospirillum* **AZO:** 1,5E⁸ UFC/ml
HMA: 200 g **HMA:AZO:** 200 g HMA + 1,5 E⁸ UFC/ml *Azospirillum*

Figura 3.8 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el incremento de perímetro para el período 70-150 días

Análisis matemático

Considerando que no existen diferencias significativas para *Azospirillum* ni para la interacción de los microorganismos, se realizó el análisis matemático del perímetro, tomando en cuenta exclusivamente al factor micorrizas, que presenta diferencia estadística de acuerdo a la prueba de comparación de medias.

Empleando el lenguaje R mediante editor de código Tinn-R, se llevó a cabo el análisis de regresión para los datos del perímetro, encontrándose que estos se ajustan a una Regresión Logística de Gompertz, cuyo comportamiento se detalla en la Figura 3.9.



b: pendiente de la curva **d:** límite superior

Figura 3.9 Curvas de regresión para la variable perímetro a los 0, 70, 98 y 150 días.

La Figura 3.9 presenta las curvas de regresión de la variable perímetro para los tiempos 0, 70, 98 y 150 días, con sus respectivas pendientes y límites superiores. Se observa que por cada gramo de inóculo de HMA que se adiciona, la altura incrementa en 0,07 cm a los 98 días, mientras que a los 70 y 150 días, aumenta en 0,13 y 0,03 cm respectivamente. Además se aprecia que el valor máximo de perímetro alcanzado a cada tiempo es 0,71 cm a los 0 días, 4,45 cm a los 70 días, 5,29 cm a los 98 días y finalmente 6,60 cm a los 150 días.

En resumen (Figura 3.10), se observa que conforme incrementa la dosis de HMA, el perímetro de la planta también aumenta, hasta llegar a un punto alrededor de los 100 g de inóculo donde posiblemente el crecimiento se estabiliza, es decir, a partir de este punto el crecimiento permanecería más o menos constante, sin grandes cambios en su tendencia. No obstante, dosis de HMA mayores a 100 g podrían promover un sutil incremento de perímetro que eventualmente resulte significativo para la planta.

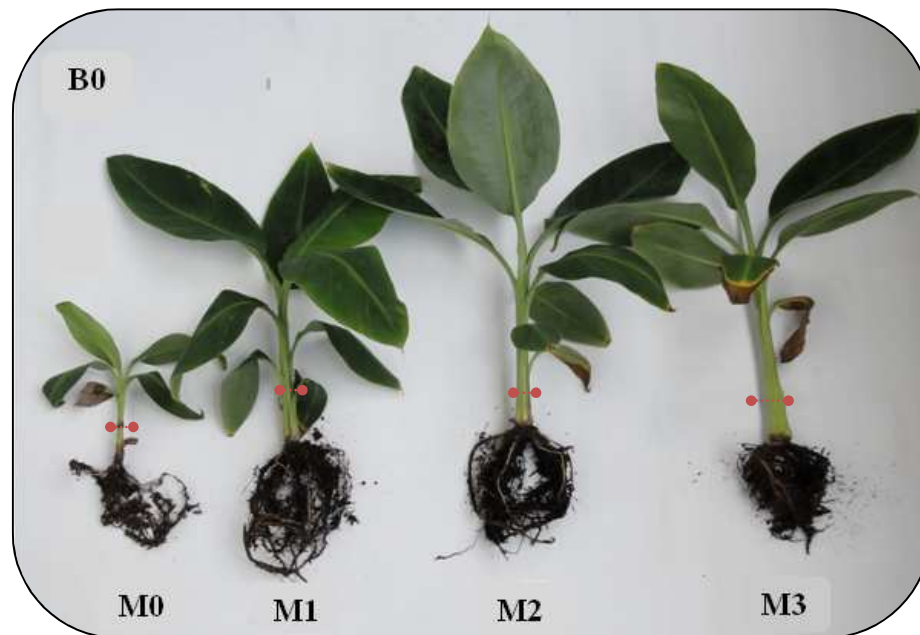


Figura 3.10 Comparación de la altura de individuos sometidos a las diferentes dosis de micorrizas en ausencia de *Azospirillum*.

3.5.3 Área foliar

Análisis estadístico

Para analizar los datos del área foliar, se realizó el cálculo de su tasa de crecimiento y a partir de estos datos se generó el análisis estadístico, cuyos resultados se presentan en un solo período de tiempo: 70-150 días (interacción entre HMA y *Azospirillum*).

En la Tabla 3.13 se observa que en el período 70 a 150 días, los factores micorrizas, *Azospirillum* y su interacción muestran diferencias estadísticas entre sus tratamientos.

Tabla 3.13 Prueba de hipótesis para la comparación de medias (área foliar) para el período 70-150 días.

Factor	Valor p
HMA	0,0001
AZO	0,0001
HMA : AZO	0,0001

p ≤ 0,05 indica diferencias significativas

Tomando en cuenta al factor micorrizas (Tabla 3.14), se observa que la dosis a la que se produce el mayor incremento de área foliar corresponde a 200 g con una media de 158,56 cm².

Tabla 3.14 Efecto de la inoculación de HMA sobre el incremento de área foliar para el período 70-150 días

Tratamiento	Área foliar (cm²)
200 g	158,56 a
100 g	105,56 a
50 g	84,56 b
0 g	12,11 c

Además, para el factor *Azospirillum* se evidencia que la dosis de 1,5E⁸ UFC/ml produce un incremento significativo de 55,57 cm² en área foliar.

Tabla 3.15 Efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre el incremento de área foliar para el período 70-150 días

Tratamiento	Área foliar (cm²)
1,50E ⁸	55,67 a
1,50E ⁷	23,11 ab
1,50E ⁶	16,89 ab
0	12,11 c

Finalmente en la Tabla 3.16 se observa que los tratamientos inoculados con HMA y la interacción HMA-*Azospirillum*, no difieren estadísticamente entre sí, no obstante, si se diferencian respecto a los que no poseen HMA. Asimismo, se muestra que el tratamiento que se encuentra dentro del primer rango de

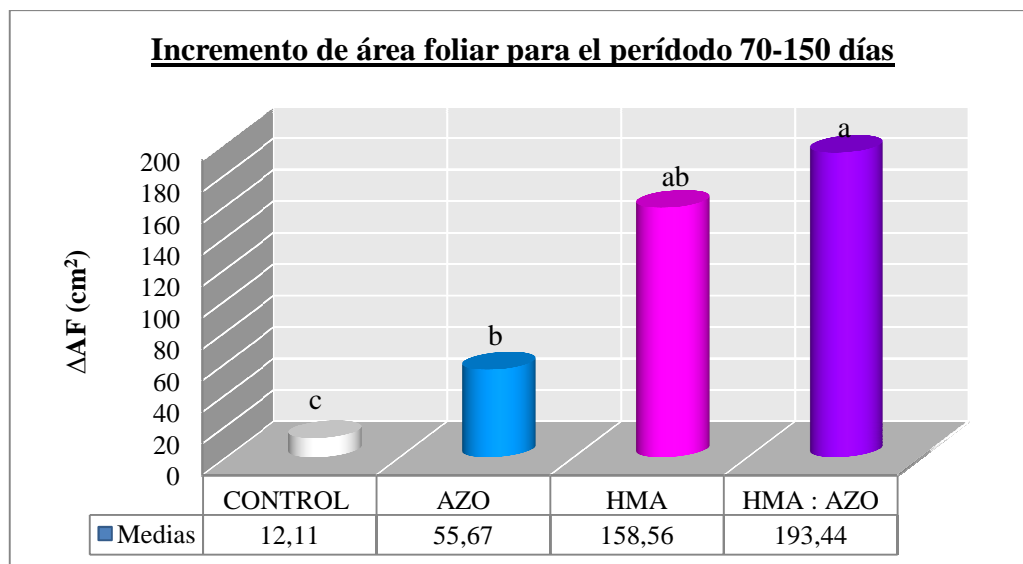
significancia y que presenta la media más alta en relación a sus homólogos, es el que posee 200 g de HMA y $1,50E^8$ UFC/ml de *Azospirillum* con un valor de $193,44 \text{ cm}^2$ de incremento en área foliar dentro del período de tiempo señalado.

Tabla 3.16 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el incremento de área foliar para el período 70-150 días

HMA (g)	AZO (UFC/ml)	Área foliar (cm^2)
200	$1,50E^8$	193,44 a
100	$1,50E^7$	188,44 a
200	$1,50E^7$	160,89 ab
200	0	158,56 ab
100	$1,50E^8$	157,89 ab
100	$1,50E^6$	139,67 ab
200	$1,50E^6$	133,33 ab
50	$1,50E^7$	126,44 ab
100	0	105,56 ab
50	$1,50E^6$	102,44 ab
50	$1,50E^8$	97,00 ab
50	0	84,56 ab
0	$1,50E^8$	55,67 b
0	$1,50E^7$	23,11 bc
0	$1,50E^6$	16,89 bc
0	0	12,11 c

HMA: dosis HMA, **AZO:** dosis *Azospirillum*

Tomando en cuenta la interacción que promueve el mayor incremento de área foliar, en la Figura 3.11 se observa que tanto la inoculación de los microorganismos por separado como la co-inoculación producen un incremento representativo del área foliar en relación a las plantas control. Al mismo tiempo, se observa que cuando los HMA y *Azospirillum* son aplicados en conjunto, estimulan a la planta para que se produzca un incremento significativo del área foliar.



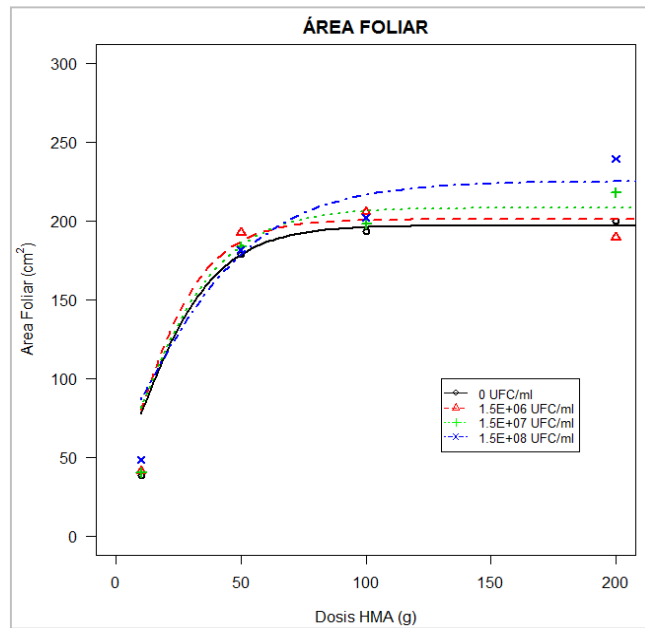
CONTROL: 0g HMA + 0 UFC/ml *Azospirillum* **AZO:** 1,5E⁸ UFC/ml
HMA: 200 g **HMA:AZO:** 200 g HMA + 1,5 E⁸ UFC/ml *Azospirillum*

Figura 3.11 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el incremento del área foliar para el período 70-150 días

Análisis matemático

Debido a que existen diferencias significativas para la interacción de los microorganismos, se realizó el análisis matemático para la variable área foliar, tomando en cuenta este factor.

Utilizando el lenguaje R mediante editor de código Tinn-R, se llevó a cabo el análisis de regresión para los datos de la variable área foliar, encontrándose que estos se ajustan a una Regresión Logística de Gompertz, cuyo comportamiento se define en la Figura 3.12



Concentraciones <i>Azospirillum</i>	b (pendiente)	d (límite superior)
0	0,06 (0,03)	197,1 (2)
1,5E ⁶	0,06 (0,01)	200,9 (6)
1,5E ⁷	0,05 (0,01)	208,3 (6)
1,5E ⁸	0,05 (0,01)	225,2 (13)

Figura 3.12 Curvas de regresión para la variable área foliar en relación a la interacción HMA-*Azospirillum*

La Figura 3.12 presenta las curvas de regresión de la variable área foliar para los 150 días con sus respectivas pendientes y límites superiores. Se observa que por cada gramo de inóculo de HMA que se adiciona, el área foliar incrementa en alrededor de 0,06 cm² en el grupo control y la interacción con las menores dosis de los microorganismos. Además, se aprecia que cuando se incrementa la dosis de *Azospirillum* a 1,5E⁷ y 1,5E⁸, el área foliar incrementa 0,05 cm² por cada gramo de HMA que se aplica. Finalmente se observa que el valor máximo de área foliar se encuentra cerca de 23 cm² para el grupo control y las interacciones con la menor concentración de la bacteria y entre 26 a 28 cm² para aquellos tratamientos que poseen las mayores dosis de *Azospirillum*.

En resumen, se evidencia que la interacción HMA-*Azospirillum* en sus mayores concentraciones, promueven en mayor proporción el desarrollo del área foliar de las plántulas de banano, permitiendo alcanzar el valor más alto de esta variable cuando se aplican 200 g de HMA y $1,5E^8$ UFC/ml de *Azospirillum*.

3.5.4 Biomasa aérea

Análisis estadístico

Las mediciones de esta variable se tomaron a los 150 días a partir del establecimiento del ensayo. Los datos se analizaron mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos y sus resultados se muestran a continuación.

En la Tabla 3.17 se observa que los factores micorrizas y la interacción HMA-*Azospirillum* presentan diferencias estadísticas entre sus tratamientos, por lo tanto, las diferentes dosis de HMA y las diversas interacciones producen respuestas distintas sobre la variable en estudio. Por otro lado, se advierte que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos para el factor *Azospirillum*.

Tabla 3.17 Prueba de hipótesis para la comparación de medias (biomasa aérea)

Factor	Valor <i>p</i>
HMA	0,0001
AZO	0,4655
HMA : AZO	0,0001

p ≤ 0,05 indica diferencias significativas

En la Tabla 3.18 se muestra que las plantas que fueron inoculadas con HMA y/o con la interacción HMA-*Azospirillum*, presentan diferencias estadísticas significativas (biomasa aérea mayor) en relación al grupo control y a aquellas a las que se les aplicó solamente bacterias. Además, se observa que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos que poseen 200 g HMA y

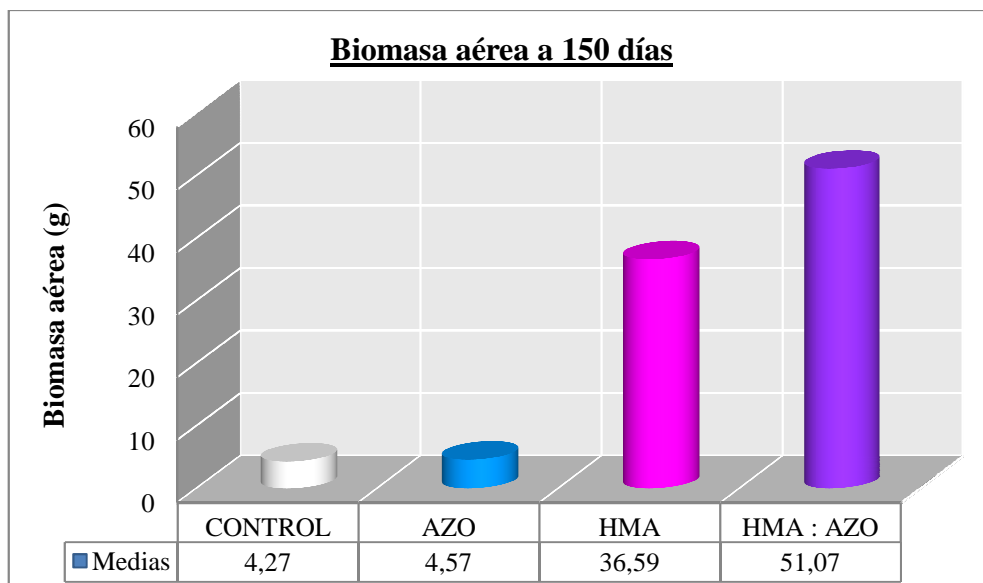
1,5E⁸ UFC/ml *Azospirillum*, 0 g HMA:0 UFC/ml *Azospirillum* y 200 g HMA y 1,5E⁷ UFC/ml *Azospirillum*, sin embargo, al analizar la biomasa aérea promedio alcanzada a los 150 días para los tratamientos señalados, se evidencia que el primer tratamiento (200 g-1,5E⁸ UFC/ml) es el que promueve un mayor desarrollo de la porción aérea de las plantas de banano, logrando un peso promedio de 51,07 g.

Tabla 3.18 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre la biomasa aérea

HMA (g)	AZO (UFC/ml)	Biomasa aérea (g)
200	1,50E ⁸	51,07 a
100	0	46,89 ab
200	1,50E ⁷	44,74 abc
100	1,50E ⁶	41,70 bc
200	1,50E ⁶	40,58 bc
100	1,50E ⁷	40,48 bcd
100	1,50E ⁸	39,63 cd
50	1,50E ⁶	38,48 cde
200	0	36,59 cde
50	1,50E ⁷	35,44 cde
50	1,50E ⁸	34,79 de
50	0	33,43 e
0	1,50E ⁸	4,57 f
0	1,50E ⁷	4,46 f
0	1,50E ⁶	4,31 f
0	0	4,27 f

HMA: dosis HMA, **AZO:** dosis *Azospirillum*

Tomando en cuenta la interacción que permite alcanzar la mayor biomasa aérea, en la Figura 3.13 se observa que tanto la inoculación de los microorganismos por separado como la co-inoculación producen un incremento representativo de la biomasa radical en relación a las plantas control. Al mismo tiempo, se observa que cuando los HMA y *Azospirillum* son aplicados en conjunto, fomentan el desarrollo de la porción aérea de las plantas de banano



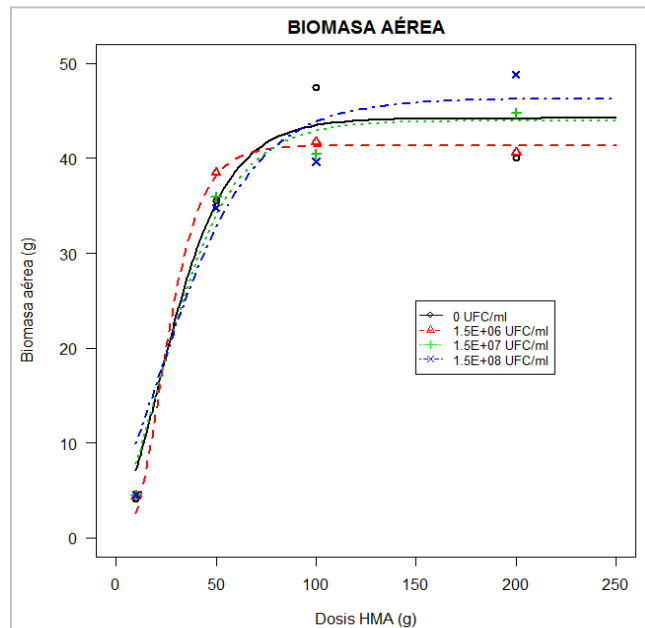
CONTROL: 0g HMA + 0 UFC/ml *Azospirillum* **AZO:** 1,5E⁸ UFC/ml
HMA: 200 g **HMA:AZO:** 200 g HMA + 1,5 E⁸ UFC/ml *Azospirillum*

Figura 3.13 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre la biomasa aérea de plantas de banano.

Análisis matemático

Debido a que existen diferencias significativas para la interacción de los microorganismos, se realizó el análisis matemático para la variable biomasa aérea, tomando en cuenta este factor.

Utilizando el lenguaje R mediante editor de código Tinn-R, se llevó a cabo el análisis de regresión para los datos de la variable biomasa aérea, encontrándose que estos se ajustan a una Regresión Logística de Gompertz, cuyo comportamiento se define en la Figura 3.14.



Concentraciones <i>Azospirillum</i>	b (pendiente)	d (límite superior)
0	0,05 (0,02)	44,21 (3)
1,5E ⁶	0,08 (0,06)	41,32 (3)
1,5E ⁷	0,05 (0,01)	43,95 (2)
1,5E ⁸	0,06(0,01)	46,27 (3)

Figura 3.14 Curvas de regresión para la variable biomasa aérea en relación a la interacción HMA-*Azospirillum*

La Figura 3.14 presenta las curvas de regresión de la variable biomasa aérea para los 150 días con sus respectivas pendientes y límites superiores. Se observa que por cada gramo de inóculo de HMA que se adiciona, la biomasa aérea incrementa en 0,05 g en el grupo control, 0,08 g para la interacción con la menor dosis de la bacteria y entre 0,05 y 0,06 g para la interacción con $1,5E^7$ y $1,5E^8$ UFC/ml de *Azospirillum*. Finalmente se observa que el valor máximo de biomasa aérea se encuentra cerca de 43 g para el grupo control y las interacciones con la menor concentración de la bacteria y en 46,27 g para las interacciones con la mayor dosis de *Azospirillum*.

En resumen, aunque no se observan diferencias entre los valores máximos de biomasa aérea, al analizar las curvas de la Figura 3.14 se observa que la interacción HMA-*Azospirillum* en sus mayores concentraciones influye positivamente el desarrollo de la porción aérea de las plántulas de banano.

3.5.5 Biomasa radical

Análisis estadístico

Las mediciones de esta variable se tomaron a los 150 días a partir del establecimiento del ensayo. Los datos se analizaron mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos y sus resultados se muestran a continuación.

En la Tabla 3.19 se observa que los factores micorrizas, *Azospirillum* y la interacción HMA-*Azospirillum* presentan diferencias estadísticas entre sus tratamientos, indicando que las diferentes dosis de HMA, *Azospirillum* y las diversas interacciones producen respuestas distintas sobre la variable en estudio.

Tabla 3.19 Prueba de hipótesis para la comparación de medias (biomasa radical)

Factor	Valor <i>p</i>
HMA	0,0001
AZO	0,0001
HMA : AZO	0,0001

p ≤ 0,05 indica diferencias significativas

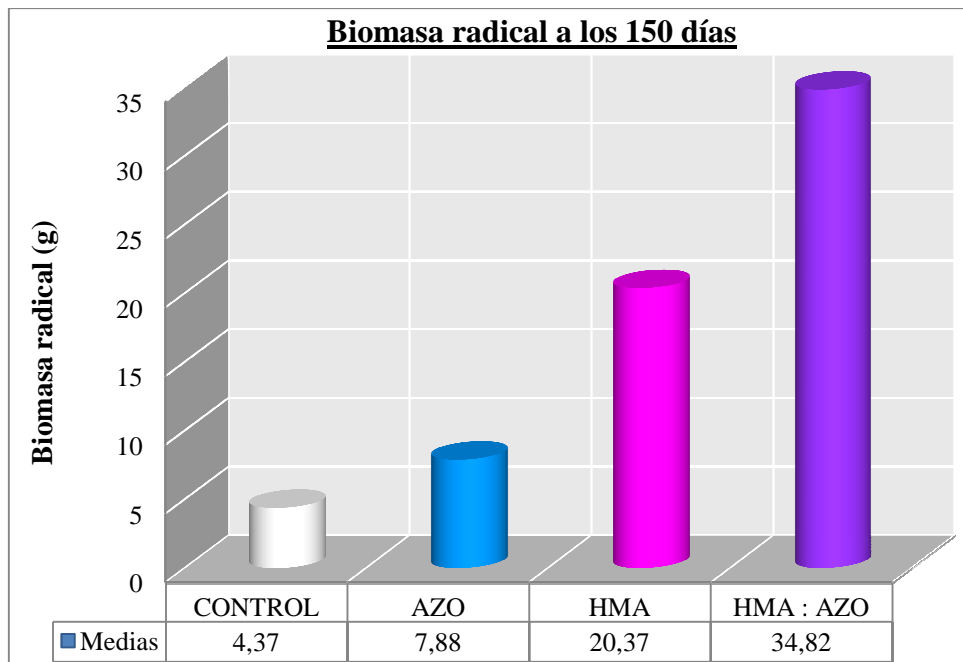
En la Tabla 3.20 se muestra que las plantas que fueron inoculadas con HMA y/o con la interacción HMA-*Azospirillum*, presentan diferencias estadísticas significativas (biomasa radical mayor) en relación al grupo control y a aquellas a las que se les aplicó solamente bacterias. Además, se observa que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos que poseen 200 g HMA:1,5E⁸ UFC/ml *Azospirillum* y 0 g HMA:0 UFC/ml *Azospirillum*, no obstante, al examinar la biomasa radical promedio alcanzada a los 150 días para los tratamientos señalados, se evidencia que el primer tratamiento (200 g y 1,5E⁸ UFC/ml) es el que causa un mayor desarrollo de la porción radical de las plantas de banano, logrando un peso promedio de 34,82 g.

Tabla 3.20 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre la biomasa radical

HMA (g)	AZO (UFC/ml)	Biomasa radical (g)
200	1,50E ⁸	34,82 a
100	0	30,31 ab
100	1,50E ⁷	29,20 b
50	1,50E ⁷	27,83 bc
100	1,50E ⁸	27,56 bc
50	1,50E ⁸	27,13 bc
50	1,50E ⁶	25,06 bc
200	1,50E ⁶	24,11 bc
200	1,50E ⁷	24,01 bcd
200	0	20,37 cde
100	1,50E ⁶	20,08 de
50	0	19,08 e
0	1,50E ⁸	7,88 f
0	1,50E ⁷	6,00 g
0	1,50E ⁶	5,98 gh
0	0	4,37 h

HMA: dosis HMA, **AZO:** dosis *Azospirillum*

Tomando en cuenta la interacción que permite el desarrollo de la mayor biomasa radical, en la Figura 3.15 se observa que tanto la inoculación de los microorganismos por separado como la co-inoculación producen un incremento representativo la biomasa radical en relación a las plantas control. Además se observa que cuando los HMA y *Azospirillum* son aplicados en conjunto, incrementa sustancialmente el desarrollo de la porción radical de las plantas de banano



CONTROL: 0g HMA + 0 UFC/ml *Azospirillum* **AZO:** 1,5E⁸ UFC/ml
HMA: 200 g **HMA:AZO:** 200 g HMA + 1,5 E⁸ UFC/ml *Azospirillum*

Figura 3.15 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre la biomasa radical de plantas de banano.

En la Figura 3.16 se observa lo anteriormente expuesto, el grupo control muestra raíces cortas y poco abundantes, aquellas plantas inoculadas con 200 g de HMA poseen gran cantidad de raíces pero estas son gruesas y con pocos pelos radicales, los individuos a los que se les aplicó *Azospirillum* (1,5E⁸ UFC/ml) evidencian un alto número de raíces tanto gruesas como delgadas; mientras que las plantas que fueron expuestas a los dos microorganismos en sus dosis más altas presentan una elevada densidad de pelos radicales que se generan a partir de las raíces principales gruesas.

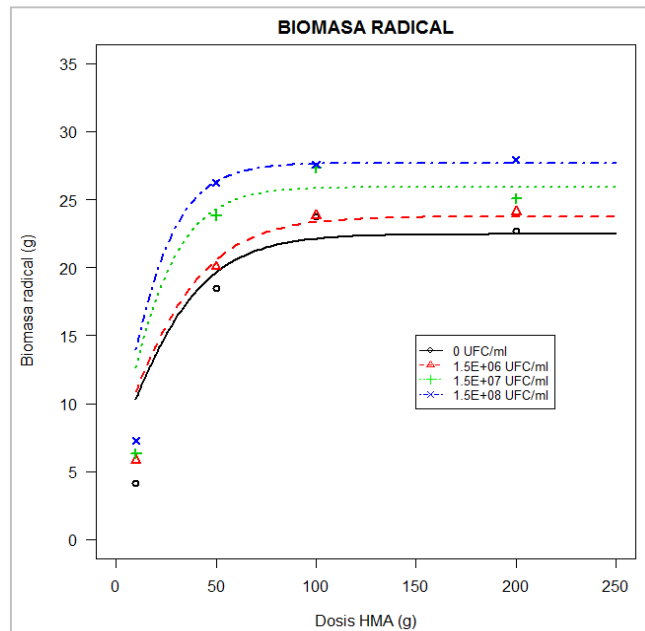


Figura 3.16 Comparación de la densidad radical entre individuos del grupo control e inoculados con HMA y/o *Azospirillum*

Análisis matemático

Debido a que existen diferencias significativas para la interacción de los microorganismos, se realizó el análisis matemático para la variable biomasa radical, tomando en cuenta este factor.

Utilizando el lenguaje R mediante editor de código Tinn-R, se llevó a cabo el análisis de regresión para los datos de la variable biomasa radical, encontrándose que estos se ajustan a una Regresión Logística de Gompertz, cuyo comportamiento se define en la Figura 3.17.



Concentraciones <i>Azospirillum</i>	b (pendiente)	d (límite superior)
0	0,04 (0,02)	22,45 (2)
1,5E ⁶	0,04 (0,01)	23,74 (1)
1,5E ⁷	0,06 (0,02)	25,91 (2)
1,5E ⁸	0,06(0,003)	27,68 (0,1)

Figura 3.17 Curvas de regresión para la variable biomasa radical en relación a la interacción HMA-*Azospirillum*

La Figura 3.16 presenta las curvas de regresión de la variable biomasa radical para los 150 días con sus respectivas pendientes y límites superiores. Se observa que por cada gramo de inóculo de HMA que se adiciona, la biomasa radical incrementa en 0,04 g para el grupo control y las interacciones con la menor dosis de la bacteria y 0,06 g para la interacción con 1,5E⁷ y 1,5E⁸ UFC/ml de la bacteria. Finalmente se observa que el valor máximo de biomasa radical se encuentra cerca de 23 g para el grupo control y las interacciones con la menor concentración de la bacteria y en 25,91 y 27,68 g en las interacciones con 1,5E⁷ y 1,5E⁸ UFC/ml de *Azospirillum*.

En resumen, aunque no se observan diferencias entre los valores máximos de biomasa radical, al analizar las curvas de la Figura 3.16 se observa

que la interacción HMA-*Azospirillum* en sus mayores concentraciones influye positivamente el desarrollo de la porción radical de las plántulas de banano.

3.5.6 Contenido de nutrientes

a. Foliar

El análisis de nutrientes en tejido foliar lo llevó a cabo el Laboratorio de Investigaciones AGROBIOLAB, a razón de una muestra por cada tratamiento (no repeticiones). A continuación se describen los nutrientes cuyos resultados muestran relevancia para la investigación y son críticos para la nutrición del banano.

– Nitrógeno (N)

Los resultados del contenido de nitrógeno en tejido foliar (Figura 3.18) muestran que los valores de este nutriente, se encuentran sobre el nivel normal tanto en plantas del grupo control como en aquellas que fueron inoculadas con HMA y/ó con *Azospirillum* en sus diferentes concentraciones, además, se evidencia que conforme se incrementa la dosis de HMA y de la bacteria, aumenta paulatinamente el contenido de nitrógeno en la planta. Por otro lado, se observa que la concentración de este nutriente es más alto en el tejido foliar cuando se han aplicado 200 g de HMA y las diversas concentraciones de bacterias, alcanzando su mayor valor (5,17%) cuando *Azospirillum* es inoculado a razón de $1,5E^8$ UFC/ml.

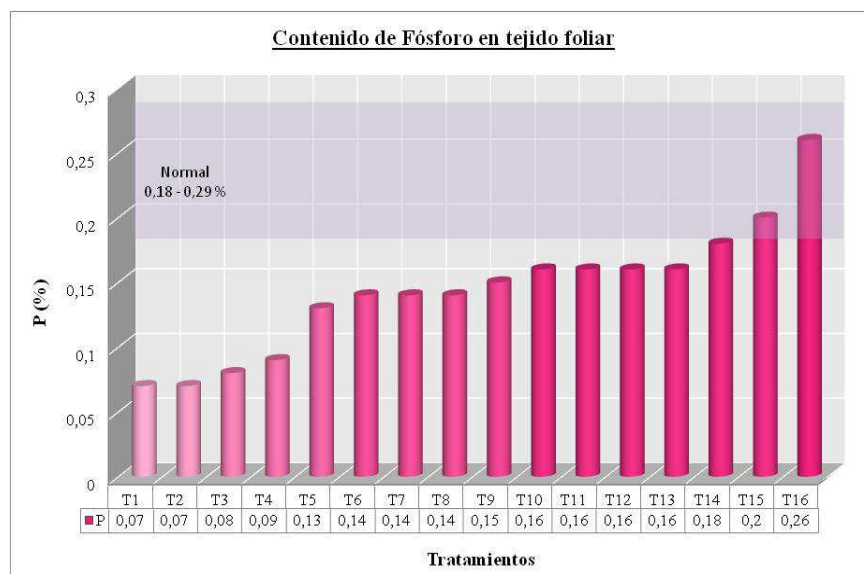


Tratamientos en dosis HMA (gramos) : concentración *Azospirillum* (UFC/ml); T1 (0:0), T2 (0:1,5E⁶), T3 (0:1,5E⁷), T4 (0:1,5E⁸), T5 (50:0), T6 (50:1,5E⁶), T7 (50:1,5E⁷), T8 (50:1,5E⁸), T9 (100:0), T10 (100:1,5E⁶), T11 (100:1,5E⁷), T12 (100:1,5E⁸), T13 (200:0), T14 (200:1,5E⁶), T15 (200:1,5E⁷), T16 (200:1,5E⁸).

Figura 3.18 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el contenido de Nitrógeno en tejido foliar

– Fósforo (P)

Los resultados del contenido de fósforo en tejido foliar (Figura 3.19) muestran que los valores de este elemento, se encuentran por debajo del nivel normal tanto en plantas del grupo control como en aquellas que fueron inoculadas con HMA en dosis de 0, 50 y 100 g y/ó con *Azospirillum* en sus diferentes concentraciones, además, se evidencia que conforme se incrementa la dosis de HMA, aumenta gradualmente el contenido de fósforo en la planta. Finalmente, se observa que la concentración de este nutriente alcanza el nivel normal en el tejido foliar cuando se aplican en conjunto 200 g de HMA y las diversas concentraciones de bacterias, alcanzando su valor más alto (0,26 %) cuando *Azospirillum* es inoculado a razón de 1,5E⁸ UFC/ml.

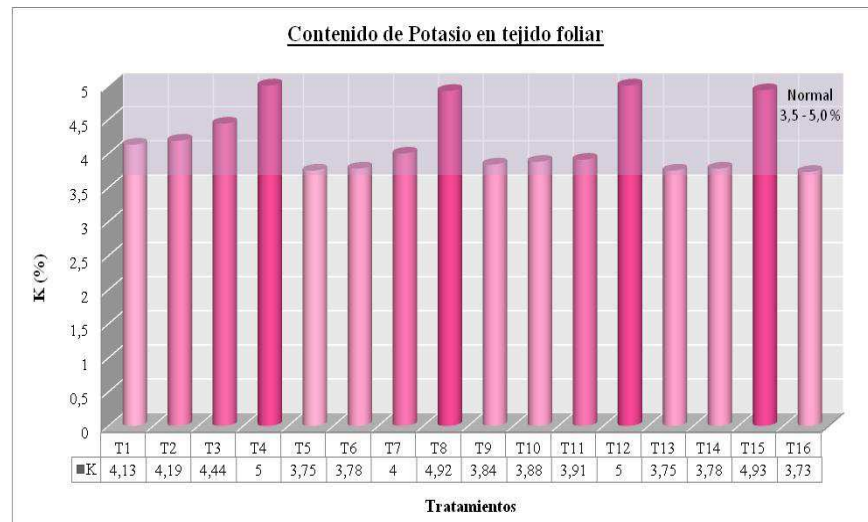


Tratamientos en dosis HMA (gramos) : concentración *Azospirillum* (UFC/ml); T1 (0:0), T2 (0:1,5E⁶), T3 (0:1,5E⁷), T4 (0:1,5E⁸), T5 (50:0), T6 (50:1,5E⁶), T7 (50:1,5E⁷), T8 (50:1,5E⁸), T9 (100:0), T10 (100:1,5E⁶), T11 (100:1,5E⁷), T12 (100:1,5E⁸), T13 (200:0), T14 (200:1,5E⁶), T15 (200:1,5E⁷), T16 (200:1,5E⁸).

Figura 3.19 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el contenido de fósforo en tejido foliar

– **Potasio (K)**

Los resultados del contenido de potasio en tejido foliar (Figura 3.20) muestran que los valores de este elemento, se encuentran dentro del nivel normal tanto en plantas del grupo control como en aquellas que fueron inoculadas con HMA y/o con *Azospirillum* en sus diferentes concentraciones, además, se evidencia que indistintamente de la dosis de HMA aplicada, al aumentar la concentración de bacterias, incrementa también en forma gradual el contenido de potasio en la planta, encontrándose valores alrededor del 5% cuando se han inoculado 1,5E⁸ UFC/ml de *Azospirillum*. No obstante, se observa que esto no se cumpliría para las plantas que presentan la dosis de HMA de 200 g donde no se expresa una relación clara entre los factores en estudio y los niveles de potasio foliar.



Tratamientos en dosis HMA (gramos) : concentración *Azospirillum* (UFC/ml); T1 (0:0), T2 (0:1,5E⁶), T3 (0:1,5E⁷), T4 (0:1,5E⁸), T5 (50:0), T6 (50:1,5E⁶), T7 (50:1,5E⁷), T8 (50:1,5E⁸), T9 (100:0), T10 (100:1,5E⁶), T11 (100:1,5E⁷), T12 (100:1,5E⁸), T13 (200:0), T14 (200:1,5E⁶), T15 (200:1,5E⁷), T16 (200:1,5E⁸).

Figura 3.20 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el contenido de potasio en tejido foliar

– Nutrientes secundarios

El nitrógeno, fósforo y potasio se consideran nutrientes primarios debido a su alta demanda y su importancia en la nutrición del banano, los demás nutrientes: Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, B y S tienen roles específicos para la planta pero no son requeridos en grandes proporciones, por esta razón y debido a que sus resultados no muestran tendencias claras respecto a los factores en estudio (HMA y *Azospirillum*) los datos del contenido foliar de estos elementos no se incluyen en el presente capítulo, no obstante, se encuentran resumidos en el Anexo F.

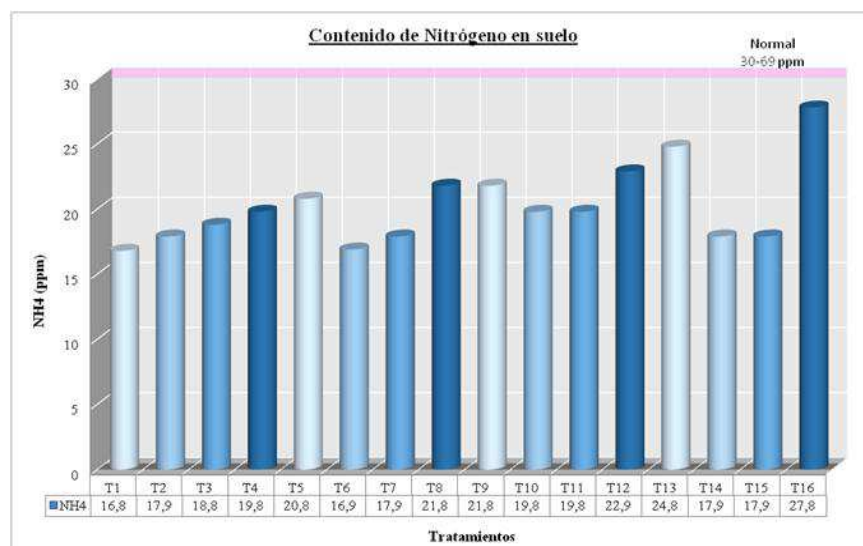
b. Suelo

Al igual que en el caso foliar, el análisis de nutrientes de suelo lo llevó a cabo el Laboratorio de Investigaciones AGROBIOLAB, a razón de una muestra por cada tratamiento. A continuación se describen los nutrientes

cuyos resultados muestran relevancia para la investigación y son críticos para la nutrición del banano.

– **Nitrógeno (NH₄)**

Los resultados del contenido de nitrógeno (NH₄) en el suelo (Figura 3.21) muestran que los valores de este elemento, se encuentran por debajo del rango normal tanto el suelo del grupo control como en el de los que fueron inoculados ya sea con HMA y/o *Azospirillum*. A pesar de que los tratamientos muestran niveles por debajo de los valores normales, se observa que en los que no poseen HMA pero fueron tratados con *Azospirillum*, el contenido de este mineral incrementa conforme incrementa la concentración del microorganismo. Por otro lado, en los tratamientos restantes se evidencia que los suelos que fueron inoculados solamente con HMA presentan niveles entre 20,8 a 24,8 ppm, aquellos que poseen las diversas dosis de HMA y los niveles bajo y medio (recomendado) de *Azospirillum* se encuentran bajo este nivel, con valores entre 16,9 a 19,8 ppm. Finalmente se muestra que el suelo de aquellas plantas donde fueron aplicadas las diversas dosis de HMA y la concentración más alta de *Azospirillum*, es donde se encuentran las mayores concentraciones de amonio, siendo el tratamiento de 200 g de HMA y 1,5E⁸ UFC/ml el que exhibe el mayor nivel de este mineral (27,8 ppm).

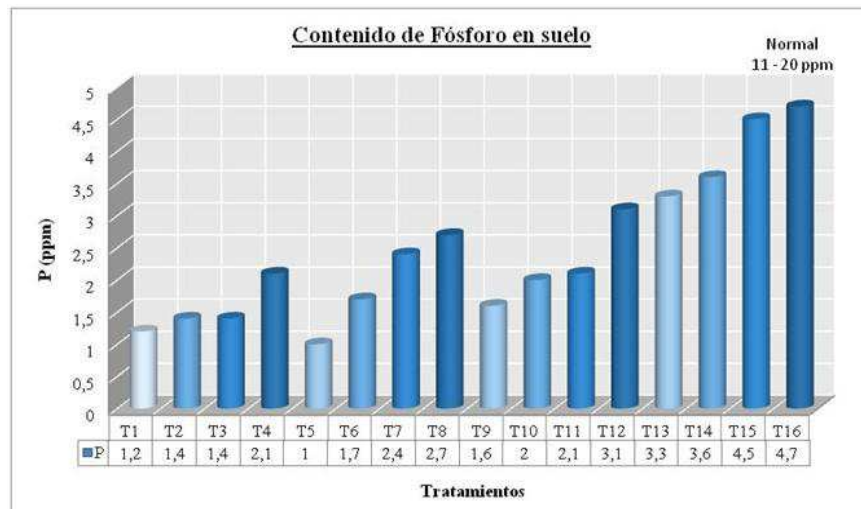


Tratamientos en dosis HMA (gramos) : concentración *Azospirillum* (UFC/ml); T1 (0:0), T2 (0:1,5E⁶), T3 (0:1,5E⁷), T4 (0:1,5E⁸), T5 (50:0), T6 (50:1,5E⁶), T7 (50:1,5E⁷), T8 (50:1,5E⁸), T9 (100:0), T10 (100:1,5E⁶), T11 (100:1,5E⁷), T12 (100:1,5E⁸), T13 (200:0), T14 (200:1,5E⁶), T15 (200:1,5E⁷), T16 (200:1,5E⁸).

Figura 3.21 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el contenido de nitrógeno en suelo

– **Fósforo (P)**

Los resultados del contenido de fósforo suelo (Figura 3.22) muestran que los valores de este elemento, se encuentran por debajo del nivel normal tanto en plantas del grupo control como en aquellas que fueron inoculadas con HMA y/o con *Azospirillum* en sus diferentes concentraciones, además, se evidencia que conforme se incrementa la dosis de HMA y de bacterias, aumenta gradualmente el contenido de fósforo en la planta. Finalmente, se observa que a pesar que en ninguno de los tratamientos se logra alcanzar el nivel normal de fósforo en suelo, cuando se aplican 200 g de HMA y las diversas concentraciones de bacterias, su nivel incrementa significativamente en relación a los tratamientos precedentes, alcanzando su valor más alto (4,7 ppm) cuando *Azospirillum* es inoculado a razón de 1,5E⁸ UFC/ml.

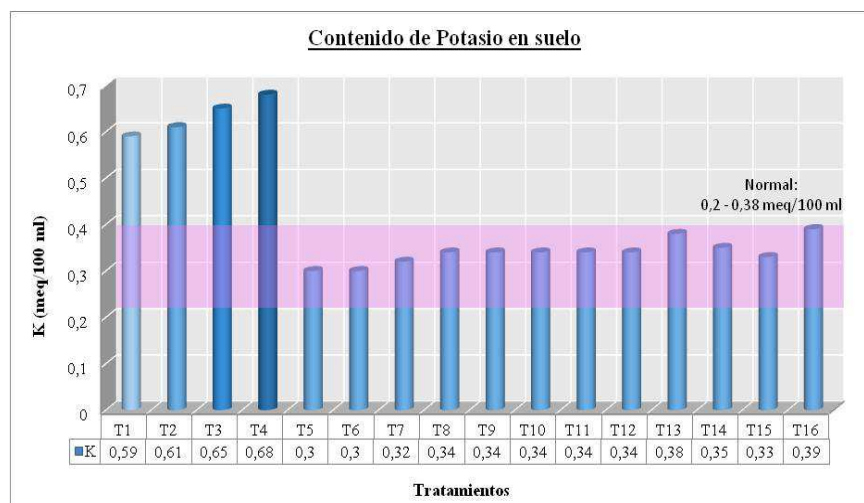


Tratamientos en dosis HMA (gramos) : concentración *Azospirillum* (UFC/ml); T1 (0:0), T2 (0:1,5E⁶), T3 (0:1,5E⁷), T4 (0:1,5E⁸), T5 (50:0), T6 (50:1,5E⁶), T7 (50:1,5E⁷), T8 (50:1,5E⁸), T9 (100:0), T10 (100:1,5E⁶), T11 (100:1,5E⁷), T12 (100:1,5E⁸), T13 (200:0), T14 (200:1,5E⁶), T15 (200:1,5E⁷), T16 (200:1,5E⁸).

Figura 3.22 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el contenido de fósforo en suelo

– **Potasio (K)**

Los resultados del contenido de potasio en suelo (Figura 3.23) muestran que los valores de este elemento, se encuentran dentro del nivel normal tanto en plantas del grupo control como en aquellas que fueron inoculadas con HMA y/o con *Azospirillum* en sus diferentes concentraciones, además, se evidencia que los valores más altos de este nutriente, incluso por sobre el nivel normal, se registran cuando no se aplican HMA pero existe un suministro de bacterias. El mayor nivel que corresponde a 0,68 meq/100 ml de potasio se produce al aplicar la concentración más alta de *Azospirillum* de 1,5E⁸ UFC/ml.



Tratamientos en dosis HMA (gramos) : concentración *Azospirillum* (UFC/ml); T1 (0:0), T2 (0:1,5E⁶), T3 (0:1,5E⁷), T4 (0:1,5E⁸), T5 (50:0), T6 (50:1,5E⁶), T7 (50:1,5E⁷), T8 (50:1,5E⁸), T9 (100:0), T10 (100:1,5E⁶), T11 (100:1,5E⁷), T12 (100:1,5E⁸), T13 (200:0), T14 (200:1,5E⁶), T15 (200:1,5E⁷), T16 (200:1,5E⁸).

Figura 3.23 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el contenido de potasio en suelo

– Nutrientes secundarios

La disponibilidad de nitrógeno, fósforo y potasio en el suelo para cultivo de banano, resulta crítico para la adecuada nutrición de este, es por ello que estos elementos se consideran nutrientes primarios, los demás elementos: Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, B y S tienen roles específicos para la planta pero no son requeridos en grandes proporciones, por esta razón y debido a que sus resultados no muestran tendencias claras respecto a los factores en estudio (HMA y *Azospirillum*); los datos del contenido de estos elementos en suelo no se incluyen en el presente capítulo, no obstante, se encuentran resumidos en el Anexo G.

3.5.7 Población de esporas de HMA

Los datos de la población de esporas de HMA se analizaron mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos y sus resultados se muestran a continuación.

En la Tabla 3.21 se observa la comparación de medias obtenida a partir de una prueba de LSD Fisher al 5%. Se observa que tanto los factores HMA y *Azospirillum*, como la interacción de ellos, presentan diferencias estadísticas significativas para la variable evaluada.

Tabla 3.21 Prueba de hipótesis para la comparación de medias de la población de esporas de HMA

Factor	Valor <i>p</i>
HMA	0,0001
AZO	0,0001
HMA : AZO	0,0397

p ≤ 0,05 indica diferencias significativas

Analizando el factor HMA (Tabla 3.22) se observa que conforme incrementa la dosis también se incrementa el número de esporas por gramo de suelo, por lo tanto, cuando se aplica 200 g de inóculo, se obtiene la población más alta de HMA correspondiente a 58,67 esporas/g. Nótese que la dosis de 0 g presenta una población de 0 esporas/g, evidencia de que el sustrato utilizado se encontraba totalmente libre de propágulos de HMA.

Tabla 3.22 Efecto de la inoculación de HMA sobre la población final de esporas de HMA

Tratamiento	Población esporas (esporas/g)
200 g	58,67 a
100 g	40,33 b
50 g	32,33 c
0 g	0,0 d

Analizando el factor *Azospirillum* (Tabla 3.23), se observa que las mayores concentraciones de la bacteria ($1,5E8$ y $1,5E7$ UFC/ml) ocupan el primer rango de significancia estadística y permiten obtener la mayor población de esporas de HMA, no obstante, si se toman en cuenta la población promedio obtenida al finalizar el ensayo, se evidencia que con la concentración de $1,5E8$ UFC/ml se logra un mayor número propágulos correspondientes a 35 esporas/g.

Tabla 3.23 Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sobre la población final de esporas de HMA

Tratamiento	Población esporas (esporas/g)
$1,50E^8$	35,00 a
$1,50E^7$	34,08 ab
$1,50E^6$	33,58 bc
0	32,83 c

Finalmente, tomando en cuenta las interacciones HMA-*Azospirillum* (Tabla 3.24), se observa que la mayor dosis de HMA (200 g) y la concentración más alta de la bacteria ($1,5E8$ UFC/ml), inducen que la población de esporas de HMA, sea la más alta (62,67 esporas/g) comparada con el resto de tratamientos. Además, se evidencia en forma general que la inoculación combinada de HMA y *Azospirillum* incrementa la densidad poblacional de esporas en relación a cuando se inocula solamente las micorrizas.

Tabla 3.24 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el incremento la población final de esporas de HMA

HMA (g)	AZO (UFC/ml)	Población esporas (esporas/g)
200	1,50E ⁸	62,67 a
200	1,50E ⁶	60,33 b
200	1,50E ⁷	60,33 b
200	0	58,67 b
100	1,50E ⁸	41,33 c
100	1,50E ⁶	40,33 c
100	0	40,33 c
100	1,50E ⁷	40,00 c
50	1,50E ⁷	36,00 d
50	1,50E ⁸	36,00 d
50	1,50E ⁶	33,67 e
50	0	32,33 e
0	1,50E ⁸	0,00 f
0	1,50E ⁷	0,00 f
0	1,50E ⁶	0,00 f
0	0	0,00 f

HMA: dosis HMA, **AZO:** dosis *Azospirillum*

3.5.8 Porcentaje de colonización micorrícica

La colonización micorrícica permite estimar el grado de infección por parte de los HMA del sistema radical de la planta a través de la identificación de estructuras fúngicas dentro de las raíces (Figura 3.24). Los datos correspondientes a esta variable se analizaron mediante Modelos Lineales, Generales y Mixtos. Sus resultados se describen a continuación.

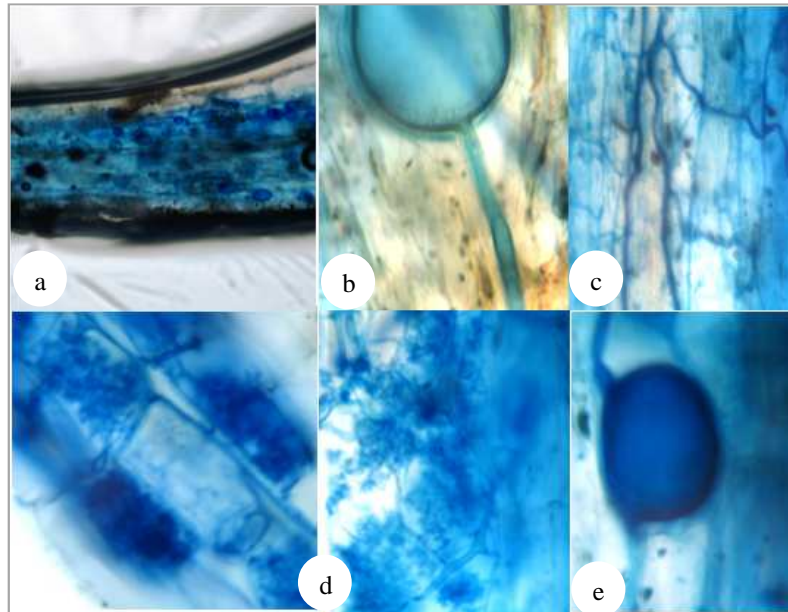


Figura 3.24 Estructuras de HMA encontradas en el interior de las raíces de banano. a) Raíz colonizada por HMA, b) Espora de HMA con su hifa de sustentación, c) Red de hifas infectivas, d) Arbúsculos de HMA, e) Vesícula de HMA.

La Tabla 3.25 muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos de los factores HMA, *Azospirillum* y la interacción HMA-*Azospirillum* sobre el porcentaje de colonización micorrícica de las raíces de banano.

Tabla 3.25 Prueba de hipótesis para la comparación de medias del porcentaje de colonización micorrícica

Factor	Valor <i>p</i>
HMA	0,0001
AZO	0,0001
HMA : AZO	0,0002

p ≤ 0,05 indica diferencias significativas

El análisis del factor HMA (Tabla 3.26) muestra que la dosis de 200 g produce el más alto porcentaje de colonización en relación a los tratamientos restantes, con un valor correspondiente a 95,25%.

Tabla 3.26 Efecto de la inoculación de HMA el porcentaje de colonización micorrícica

Tratamiento	% colonización
200 g	95,25 a
100 g	94,08 b
50 g	91,83 c
0 g	0,0 d

Por otro lado, el factor *Azospirillum* (Tabla 3.27) muestra que la dosis más alta de la bacteria ($1,5E^8$ UFC/ml) induce el mayor porcentaje de colonización en relación a los demás tratamientos, con un valor promedio de 71,42%.

Tabla 3.27 Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sobre el porcentaje de colonización micorrícica

Tratamiento	% colonización
$1,50E^8$	71,42 a
$1,50E^7$	70,58 b
$1,50E^6$	69,75 c
0	69,42 c

Por último, al analizar el efecto de las diversas interacciones HMA-*Azospirillum* sobre la variable de respuesta en estudio (Tabla 3.28), se observa que los tratamientos que contienen las dosis más altas de HMA (100 y 200 g) y las mayores concentraciones de *Azospirillum* ($1,5E^7$ y $1,5E^8$ UFC/ml) promueven una mayor colonización de las raíces de banano por parte de las HMA en relación a los demás tratamientos. Además, se evidencia que la inoculación combinada de los dos microorganismos, permite obtener mayores porcentajes de infección en relación a aquellos tratamientos que solamente fueron inoculados con HMA, es decir, la presencia de la bacteria permite que las micorrizas puedan colonizar en mayor proporción las raíces de banano. Finalmente, tomando en cuenta los porcentajes de colonización promedios de cada tratamiento, se observa que la interacción de 200 g de HMA y $1,5E^8$

UFC/ml de *Azospirillum* permite obtener el mayor porcentaje de infección micorrícica con un valor de 96,37%.

Tabla 3.28 Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el porcentaje de colonización micorrícica

HMA (g)	AZO (UFC/ml)	% colonización
200	1,50E ⁸	96,67 a
100	1,50E ⁸	95,33 ab
200	1,50E ⁷	95,33 ab
200	0	95,00 bc
200	1,50E ⁶	95,00 bc
100	1,50E ⁷	94,67 bc
100	0	94,00 bc
100	1,50E ⁶	93,67 cd
50	1,50E ⁸	92,33 de
50	1,50E ⁷	91,33 ef
50	1,50E ⁶	91,33 ef
50	0	90,00 f
0	1,50E ⁸	0,00 g
0	1,50E ⁷	0,00 g
0	1,50E ⁶	0,00 g
0	0	0,00 g

HMA: dosis HMA, **AZO:** dosis *Azospirillum*

3.5.9 Población final de *Azospirillum* en suelo y raíces

La determinación de la población final de *Azospirillum* en muestras de suelo y raíces de los 16 tratamientos se lo realizó mediante cultivo en tubo utilizando medio NFb semisólido (Secciones 2.15 y 2.16) y su posterior confirmación en medio Ácido Máfico Rojo Congo sólido, los resultados obtenidos se resumen a continuación.

La Tabla 3.29 muestra la población final de *Azospirillum* tanto en suelo como en raíces al final del ensayo. Se observa que aquellos tratamientos que no fueron inoculados con la bacteria tienen una población final de 0 UFC/g en suelo y raíces, evidenciando que no existió contaminación en el

ensayo. Además se advierte que para los tratamientos T2 a T4 que no poseen HMA, la población bacteriana en suelo y raíces no sufre un incremento a través del tiempo, es decir, su densidad es similar a la inoculada inicialmente. Por otro lado, los tratamientos restantes con 50, 100 y 200 g de HMA promueven el crecimiento de *Azospirillum* tanto en raíces como en suelo, encontrándose que si bien todas las dosis de HMA permiten la multiplicación de la bacteria, la población de estas experimenta un incremento ligeramente mayor a una dosis de 50 g de HMA.

Tabla 3.29 Población final de *Azospirillum* en suelo y raíces de banano

TRATAMIENTO	MICO (g)	AZOS (UFC/ml)	SUELO (UFC/g)	RAÍCES (UFC/g)
T1	0	0	0	0
T2	0	1,50E+06	9,00E+07	9,00E+06
T3	0	1,50E+07	6,00E+07	3,30E+07
T4	0	1,50E+08	9,00E+08	4,20E+08
T5	50	0	0	0
T6	50	1,50E+06	4,20E+08	9,00E+07
T7	50	1,50E+07	3,45E+08	4,20E+09
T8	50	1,50E+08	3,30E+09	4,20E+09
T9	100	0	0	0
T10	100	1,50E+06	4,20E+08	6,00E+07
T11	100	1,50E+07	3,30E+08	4,20E+08
T12	100	1,50E+08	3,45E+08	4,20E+09
T13	200	0	0	0
T14	200	1,50E+06	3,30E+08	4,20E+07
T15	200	1,50E+07	7,50E+07	3,30E+08
T16	200	1,50E+08	3,30E+09	4,95E+09

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Propagación de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) nativos del cultivo de banano (*Musa paradisiaca*)

Durante la última década, el uso intensivo de pesticidas y fertilizantes (en dosis por encima de la capacidad de extracción del cultivo) en las plantaciones comerciales de banano en América Latina, se ha convertido en un componente integral de su sistema de producción agrícola; registrándose durante este período de tiempo, una reducción considerable de la productividad debido al deterioro de los factores físico-químicos y biológicos suelo (FONTAGRO, 2004). En relación a este último factor, debemos tener en cuenta que los microorganismos del suelo (componente biológico) juegan un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos el suelo, siendo los responsables de mantener su calidad (Jeffries *et al.*, 2003). Por lo tanto, si su composición o densidad son perturbadas, de igual forma la calidad del medio será afectada. Dentro del factor biológico del suelo se encuentran los HMA, capaces de colonizar las raíces de las plantas de banano y mejorar su nutrición. Existen reportes donde se indica que tanto los pesticidas como fertilizantes pueden llegar a afectar de una forma adversa la colonización de la raíces de las plantas, además de disminuir considerablemente la población de esporas infectivas de HMA (Schweiger & Jakobsen, 1998; Smith *et al.*, 2000).

Este hecho se observa en los resultados obtenidos en relación a la población de esporas de HMA en el suelo de las siete haciendas bananeras muestreadas (Sección 3.6, Figura 3.1) donde se evidencian densidades poblacionales de HMA muy bajas (entre 0,09 a 1,07 esporas/g de suelo); lo que indicaría la baja calidad del suelo de estas plantaciones, basándose en el hecho de que la presencia de 1-10 esporas/g de suelo se considera un valor normal en suelos bien nutridos (Tovar-Franco, 2006).

De las muestras analizadas, se seleccionó el suelo que contenía la mayor cantidad de propágulos infectivos por gramo y para suplir la baja cantidad de esporas de HMA encontradas en él, se utilizó un 30% de este suelo para desarrollar el inóculo micorrícico.

El inóculo micorrícico se produjo utilizando la técnica de propagación de esporas basado en cultivo trampa. Esta metodología se fundamenta en el carácter de simbiote obligado de los HMA. El establecimiento de un cultivo trampa utilizando suelo y/o raíces que contengan las esporas de interés junto con un hospedero apropiado (altamente micotrófico) representa una estrategia factible para obtener un gran número de esporas sanas en un período de tiempo relativamente corto (Bever et al., 1996). En la presente investigación, se utilizó suelo con una población inicial de 1,07 esporas/g y al cabo de 5 meses de cultivo con plantas de avena como hospederos, se obtuvo un inóculo con una población de 10 esporas/g (incremento del 89,3%) el cual se aplicó en diferentes dosis a plántulas de banano provenientes de cultivo in vitro (Sección 3.1, Figura 3.2)

4.2 Densidad poblacional de bacterias diazótroficas en muestras de suelo y raíces de banano

Se conoce que al menos once géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótroficas) [incluyendo *Azospirillum spp.*] están presentes en la rizósfera de una gran variedad de plantas tropicales y subtropicales; y son capaces de colonizar varias zonas de las raíces (Lynch, 1982). Las raíces a su vez ejercen una notable influencia sobre estas poblaciones microbianas debido a la presencia de una gran variedad de sustancias orgánicas y mucilaginosas excretadas por las raíces que provocan que la biomasa bacteriana sea mucho más abundante en la rizósfera que en el suelo (Bolton *et al.*, 1992). Este fenómeno se observa claramente en los resultados obtenidos del aislamiento de bacterias diazótroficas en suelos bananeros (Tabla 3.2), donde la población bacteriana fue mayor en muestras de raíces (10^6 a 10^8 microorganismos/g de raíces) en relación a los aislamientos obtenidos a partir de suelo (10^5 a 10^6 microorganismos/g de suelo).

4.3 Aislamiento e identificación de *Azospirillum* spp.

4.3.1 Aislamiento

Para el aislamiento de cepas de *Azospirillum* a partir de cultivos de bacterias diazótrofes, se utilizó el medio Ácido Máfico Rojo Congo debido a que este permite diferenciar entre bacterias del género *Rhizobium* y otros fijadores de nitrógeno como *Azospirillum* (Fred & Waksman, 1928). Esto se debe a que las colonias de *Azospirillum* toman una coloración rojo escarlata a rojo anaranjado característica del género cuando crecen sobre el medio señalado (de acuerdo al Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, 2005). Esta particular coloración se atribuye a que los exopolisacáridos de la superficie bacteriana constituidos principalmente por compuestos tipo lipopolisacárido-proteína y polisacárido-lípido, forman complejos con el colorante Rojo Congo, consecuentemente las colonias de *Azospirillum* se vuelven rojas en el medio sólido que contiene el colorante (Shelud'ko *et al*, 2005). Basado en esta información se aislaron ocho cepas del género *Azospirillum* (5 de raíces y 3 de suelo) cuyas colonias presentaron diversas morfologías y coloraciones dentro de la gama del rojo (Tabla 3.3).

4.3.2 Identificación fenotípica

La identificación fenotípica de los aislamientos obtenidos a partir de cultivos en medio Ácido Máfico Rojo Congo se llevó a cabo utilizando como principio dos características fenotípicas que presenta el género: tinción Gram negativa y presencia de gránulos de poli- β -hidroxibutirato (Sección 3.3, Tabla 3.3).

La tinción Gram tipo negativa de las bacterias del género *Azospirillum* se produce debido a que presentan una pared celular compleja con una sola capa de peptidoglucano en el interior y una membrana externa compuesta por fosfolípidos y glicolípidos asociados a polisacáridos, esta membrana es

permeable gracias a la presencia de canales de porinas (Lañes, 2005). Los poros causan que estas bacterias al ser tratadas con un decolorante como alcohol-cetona, no retengan el complejo cristal violeta-yodo y se tiñan con el colorante de contraste safranina tornándose de color rojo (Sánchez-Guillen, 2007).

Por otro lado, la presencia de gránulos de poli- β -hidroxibutirato en el interior de las células bacterianas juega un rol importante en la sustentabilidad, tolerancia y supervivencia de la bacteria bajo condiciones de estrés (Castro-Sowinski *et al.*, 2010; Kadouri *et al.*, 2005; Ratcliff *et al.*, 2008). Particularmente en bacterias del género *Azospirillum* este componente representa el 25-50% de su peso seco (Brenner *et al.*, 2005) por lo que su tinción sirve como marcador para la identificación del género.

4.3.3 Identificación bioquímica

Azospirillum es un microorganismo versátil en su nutrición, dado que posee muchas vías metabólicas alternas que le permiten consumir una amplia variedad de ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos, no obstante, estudios sobre el metabolismo del género han permitido desarrollar pruebas de laboratorio cuyos resultados esperados han sido recopilados y descritos ampliamente en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Anexo H), documento que ha sido tomado como referencia en la presente investigación y a partir del cual se confirmó la identidad de los aislados bacterianos como pertenecientes al género *Azospirillum* (Sección 3.3, Tabla 3.4).

4.4 Selección de la cepa de *Azospirillum* para la preparación del inóculo bacteriano

Para la selección de la cepa inóculo entre los ocho aislamientos de *Azospirillum* se tomó como base el principal mecanismo que exhibe el género para la promoción del crecimiento vegetal que es la producción de ácido indol acético (AIA). El ácido indol acético es un metabolito derivado del triptófano capaz de desencadenar respuestas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas en la planta, asociadas principalmente al desarrollo radical, incluyendo elongación y crecimiento celular (Khan et al., 2009).

Se realizó la selección evaluando la capacidad de las cepas para la producción de la fitohormona, en un medio suplementado con triptófano a diferentes tiempos de incubación. Los resultados muestran que la concentración máxima de AIA entre las cepas de *Azospirillum* varía entre 2,5 a 6,33 µg/ml (Sección 3.4, Figura 3.4), valores que se encuentran dentro del rango de producción reportado para el género y que corresponden a concentraciones de 1 a 25 µg/ml (Tien *et al.*, 1979; Crozzier *et al.*, 1988). La cepa seleccionada es la que evidenció la mayor producción de AIA (6,33 µg/ml) y correspondió al aislamiento G4b.

4.5 Evaluación del efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el crecimiento de plántulas de banano micropropagadas

4.5.1 Efectos sobre el crecimiento y desarrollo vegetal

La micropropagación constituye una técnica vanguardista a través de la que se logra la multiplicación de cultivares de interés, como el banano, y que permite obtener individuos uniformes, de alta calidad y libres de patógenos. Sin embargo, existen ciertas limitaciones subyacentes a esta metodología que incluyen altos grados de mortalidad

y que impiden aprovechar los beneficios que este sistema (Vestberg y Estaún 1994; Elmeskaoui *et al.*, 1995).

Con el fin de incrementar el grado de supervivencia de las plántulas de banano y promover su desarrollo durante la fase de aclimatación, estudios recientes, incluido el presente, se han centrado en buscar alternativas biológicas que permitan lograr este objetivo. En este contexto, una de las opciones más prometedoras ha sido la aplicación de HMA y bacterias promotoras del crecimiento vegetal durante la fase *ex vitro*, ya que se ha observado que las plantas multiplicadas mediante cultivo *in vitro*, desarrollan relaciones micorrícicas y microbianas, con alto grado de dependencia (Nemec, 1986). Además debido a que estos comparten micro hábitats comunes, inevitablemente interactúan durante el proceso de colonización (Barea, 1997), por lo que esta situación será tomada en cuenta para determinar los posibles efectos cooperativos de los microorganismos sobre el desarrollo vegetal.

Al realizar la evaluación de los parámetros de crecimiento, se encontró en forma general que las plántulas de banano, sometidas a la co-inoculación de HMA y *Azospirillum* en sus dosis más altas (200 g y $1,5E^8$ UFC/ml respectivamente), alcanzaron mayor desarrollo (Secciones 3.5.1 a 3.5.5) en relación al grupo control y a aquellas plantas que fueron inoculadas con las dosis restantes de HMA y/o *Azospirillum*.

Para las variables de crecimiento: altura, perímetro y área foliar, se observa que su desarrollo se ve favorecido por la inoculación simple con HMA (mayor crecimiento a mayor dosis) (Tablas 3.7, 3.10 y 3.14), registrándose para la dosis más alta (200 g) un incremento de 6 veces la altura, tres veces el perímetro y 13 veces el área foliar respecto al grupo control. Estos resultados son similares a los descritos por Yano-Melo *et al* (1999) quienes tras infectar plántulas de banano micropropagadas con

esporas de *Glomus* y *Acaulospora*, observaron que los individuos inoculados presentaban un crecimiento cerca del doble de las plantas control. De igual forma Jaizme-Vega *et al* (2002) concluyeron que los hongos micorrícicos arbusculares contribuyeron al crecimiento de plántulas de banano (tras cinco meses de la inoculación) favoreciendo un mayor desarrollo de aquellas colonizadas con cepas de *Glomus* en relación las no infectadas con HMA.

Asimismo, el análisis de los resultados de la biomasa aérea y radical de las plántulas de banano (Tablas 3.17 y 3.19) muestra la misma tendencia que las variables anteriores, es decir, los individuos inoculados con HMA presentan un mayor desarrollo en cuanto a biomasa vegetal, mostrando un incremento de 8 a 10 veces la biomasa aérea y 5 a 7 veces la biomasa radical de las plantas inoculadas con las mayores dosis de HMA en referencia al grupo control. Esta situación coincide con lo encontrado por Usuaga *et al* (2008) donde aplicando un inóculo de HMA nativo en plántulas de banano observaron que aquellas colonizadas con HMA mostraban una acumulación tanto de biomasa aérea como radical cerca del doble de las plantas control. González y Cuenca (2008) aplicaron dosis entre 1400 y 5000 esporas de *Glomus* y *Scutellospora* a plántulas de banano y reportaron que la biomasa vegetal fue tres veces mayor en aquellas que fueron inoculadas con el mayor número de esporas de HMA en relación al grupo control.

Los mecanismos de los HMA asociados al mayor crecimiento y desarrollo de las plantas de banano inoculadas con estos simbiontes se centran en la actividad del micelio externo y ciertas características metabólicas de los hongos que contribuyen a la funcionalidad fisiológica de la planta huésped y le permiten asimilar fácilmente los nutrientes del suelo (Alarcón *et al*, 2000). Además, Jaizme *et al* (2005) en su investigación sobre el efecto de los HMA y otros microorganismos rizosféricos en el desarrollo del sistema radical del banano, manifiestan

que el efecto más importante de las micorrizas sobre este, fue el incremento de la ramificación de raíces adventicias. Este fenómeno, sumado al gran potencial de exploración y absorción del micelio externo de los HMA, serían responsables del mayor desarrollo y crecimiento de las plantas inoculadas.

Además al analizar los resultados obtenidos de la inoculación únicamente con *Azospirillum*, se observó que este microorganismo ejerce una evidente influencia sobre el área foliar y la biomasa radical de las plántulas de banano, encontrándose que al aplicar la mayor concentración ($1,5E^8$ UFC/ml) se logra un incremento de 5 veces el área foliar y el doble de biomasa radical en relación a las plantas del grupo control. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Baset *et al* (2009) quienes concluyeron que la inoculación de plantas de banano con *Azospirillum* de la cepa Sp7 quintuplicaba el área foliar de estas e incrementaba tres veces la biomasa radical en relación al grupo control.

La clara relación de este microorganismo con el área foliar y la biomasa radical, lo precisan Bashan *et al* (1996) en una extensa revisión sobre el género *Azospirillum*. En ella señalan como mecanismo de acción principal de la bacteria, a la modificación morfológica del sistema radical de la planta inducida por auxinas bacterianas, la que se refleja en el incremento del número y longitud de raíces laterales, aumento de la biomasa de la raíz, aparición temprana de pelos radicales, aumento del área superficial radicular y estimulación de los exudados radicales. A esta transformación positiva del sistema radicular se le atribuye la mayor capacidad de absorción de minerales por parte de la planta y a su vez un incremento en la materia seca foliar y la acumulación de nutrientes en tallos y hojas (Bashan *et al*, 2000; Rodríguez *et al*, 2004).

Finalmente al examinar el efecto de la interacción HMA-*Azospirillum* sobre el crecimiento de banano, se observa que particularmente la que corresponde a 200 g de HMA y $1,5E^8$ UFC/ml de *Azospirillum* parece influir positivamente en el desarrollo de la planta, permitiendo alcanzar los mayores valores en cada variable de respuesta. Es así que al aplicar la interacción mencionada se logran incrementar 7 veces la altura, 4 veces el perímetro, 16 veces el área foliar, 12 veces la biomasa aérea y cerca de 8 veces de biomasa radical en relación a las plantas control. Estos resultados sugieren la existencia de una relación sinérgica entre los dos microorganismos, alcanzada solamente cuando estos interactúan en sus mayores dosis, ya que al interactuar en otra proporción, no llegan a estimular de igual forma el crecimiento de las plantas. No existen descripciones sobre el efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el desarrollo de banano, sin embargo, Jaizme-Vega *et al* (2004) precisaron que al aplicar *Glomus manihotis* y un coctel de *Bacillus spp.* a plántulas de banano, se obtenían los valores más elevados para todas las variables de crecimiento evaluadas respecto a la inoculación con cada microorganismo por separado y al grupo control. Por otro lado, tras aplicar *Glomus fasciculatum* y *Azospirillum sp* a plantas de tomate, Girish (2006) encontró que la doble inoculación resultaba en un incremento significativo de las variables de crecimiento respecto a los tratamientos de inoculación simple y al grupo control. Estos resultados al igual que los obtenidos en la presente investigación, indican la existencia de una adecuada compatibilidad y de un efecto cooperativo entre HMA y *Azospirillum* en los diferentes cultivos.

Los resultados descritos en el párrafo anterior pueden deberse a una acción sinérgica (acción conjunta de los dos microorganismos que producen una respuesta mayor a aquella causada por cada microorganismo por separado) que permite obtener un incremento significativo del crecimiento y la nutrición del huésped (Bashan *et al*, 1996). Existen evidencias experimentales descritas por Russo *et al* (2005) quienes observaron que las bacterias del género *Azospirillum* se

encontraban adheridas a la superficie de estructuras fúngicas como micelio y esporas, y a raíces colonizadas, sugiriendo que estas pueden ser utilizadas por las bacterias como puentes para llegar a capas más internas de la epidermis radical (Bianciotto *et al*, 1996). Por otro lado, se ha sugerido que *Azospirillum* puede incrementar el desarrollo de la simbiosis HMA-planta debido a la producción de fitohormonas que estimulan la emisión y ramificación de raíces laterales. Tisserant *et al* (1996) señalan que el micelio más activo fisiológica y enzimáticamente se ha descubierto en raíces laterales recién formadas; encontrándose que la interacción HMA-*Azospirillum* conduce al establecimiento de una micorrizósfera funcional (Barea *et al*, 2005).

4.5.2 Efectos sobre el contenido de nutrientes en suelo y tejido foliar

a. Nutrientes en tejido foliar

– *Nitrógeno:*

El análisis del contenido de nitrógeno foliar (Figura 3.18) revela que los mayores niveles de este nutriente se presentan cuando las plántulas de banano son inoculadas con 200 g de HMA y $1,5E^8$ UFC/ml de *Azospirillum*, observándose un 40% de incremento de este nutriente en las plantas tratadas con la interacción señalada, en relación al grupo control. Este porcentaje resulta mucho mayor al alcanzado con la inoculación simple con HMA donde se obtuvieron incrementos entre 8 a 12% respecto a las plantas no inoculadas. Esto concuerda con lo encontrado por Mandhare y Suryawanshi (2005) quienes tras inocular siete especies diferentes de HMA en plántulas de banano, encontraron que estas incrementaban en 68% el contenido de nitrógeno foliar en relación a las plantas control. De igual forma Baset *et al* (2009) concluyó que la inoculación de plantas de banano con *Azospirillum* de la cepa Sp7 duplicaba el contenido de nitrógeno foliar en relación al grupo control. Si bien, no existen descripciones sobre el

efecto de la interacción HMA-*Azospirillum* en la absorción de nutrientes de las plantas de banano, nuestros resultados indican un efecto positivo de la co-inoculación de estos microorganismos sobre la absorción de nitrógeno, permitiendo alcanzar un estado nutricional adecuado.

Esta situación probablemente se deba a la acción conjunta de los dos microorganismos, los cuales contribuyen con mecanismos diferentes para alcanzar una concentración óptima de nutrientes en la planta.

Los HMA a través de su abundante micelio extrarradical son capaces de absorber formas inorgánicas de nitrógeno (NH_4 y NO_3) (St John *et al*, 1983). Tomando en cuenta que el ión nitrato no se adsorbe sobre las partículas del suelo, su constante flujo hacia las raíces permiten que este sea fácilmente accesible para la planta en suelos bien hidratados (Smith & Read, 1997), no así el amonio, el cual es un elemento poco móvil. El amonio es la principal forma en la que el nitrógeno es absorbido por el micelio extrarradical de los HMA (Bago *et al*, 1996), allí es incorporado a la arginina y transportado al micelio intra-radical donde este aminoácido es transformado y tras una serie de reacciones químicas se libera nuevamente como amonio que es conducido hacia la planta (Jin *et al*, 2005) contribuyendo a su nutrición.

Por su parte, la fijación de nitrógeno (transformación de nitrógeno atmosférico a amonio en suelo) es una de las principales características que muestran las células bacterianas del género *Azospirillum* y aunque probablemente no es el mecanismo principal para la promoción del crecimiento (Bashan, 1993) su contribución al estado nutricional de la planta es notable. Según descripciones de

Bashan *et al* (2004), este microorganismo puede contribuir entre 5 al 18% al contenido total de nitrógeno. Por otro lado se ha sugerido que *Azospirillum* puede favorecer la nutrición vegetal al incrementar la absorción de nutrientes mediante un aumento en el volumen del sistema radical (Bashan *et al*, 2004).

– **Fósforo:**

El fósforo es uno de los elementos principales para la nutrición de las plantas, este muestra una limitada disponibilidad en el suelo debido a su baja tasa de difusión y su tendencia a fijarse irreversiblemente a varios componentes del suelo (Sumner, 2000) a pesar de ello, en la presente investigación se muestran efectos positivos en relación a la absorción de P por parte de las plantas inoculadas con HMA y *Azospirillum*.

Los resultados del contenido de fósforo en el tejido foliar (Figura 3.19) muestran en forma general que conforme se incrementan las dosis de HMA y *Azospirillum* la concentración de este nutriente aumenta proporcionalmente, alcanzando su mayor valor con el tratamiento correspondiente a 200 g de HMA y $1,5E^8$ UFC/ml de *Azospirillum*, lo que representa un incremento del 73% respecto al grupo control. Esto indica un efecto positivo de la interacción señalada sobre la absorción de fósforo por parte de las plantas de banano, evidenciándose además que únicamente cuando los microorganismos son inoculados en sus mayores dosis, se alcanzan valores óptimos de este mineral en tejido foliar. Estos resultados coinciden con lo descrito por Jaizme-Vega y Rodríguez-Romero (2002) quienes observaron que las plántulas de banano inoculadas con *Glomus mosseae* poseían una mayor concentración de fósforo (cerca de tres veces más) en relación al grupo control. Baset *et al* (2009) señalaron que las plántulas de banano inoculadas con *Azospirillum*

poseían el doble de fósforo foliar en relación al control. Respecto a la interacción de estos dos microorganismos sobre banano, no existen reportes previos, sin embargo, Jaizme-Vega *et al* (2004) precisaron que al aplicar *Glomus manihotis* y un coctel de *Bacillus spp.* (rizobacterias promotora del crecimiento vegetal) a plántulas de banano, se lograba duplicar el contenido de fósforo en relación al grupo control. Además, investigaciones sobre la aplicación de HMA y *Azospirillum* sobre tomate señalan que la co-inoculación de estos microorganismos permite incrementar el contenido de fósforo de la planta en un 50% respecto al control (Girish, 2006; Guru *et al*, 2001).

Los resultados alcanzados en este ensayo pudieron presentarse debido a mecanismos propios de cada uno de los microorganismos aplicados, que en conjunto contribuyeron a lograr un estado nutricional óptimo de la planta. En relación a los HMA se ha descrito ampliamente sus beneficios sobre la absorción de fósforo. De acuerdo a Smith y Read (1997) la amplia red de hifas que se extiende a partir de las raíces de la planta son capaces de explorar un gran volumen de suelo, lo que permite acceder a fuentes de fósforo inorgánico (Pi) de zonas lejanas a la raíz, logrando superar la limitación que implica la baja tasa de difusión del Pi en el suelo. Además, los HMA son capaces de adquirir este nutriente a partir de fuentes orgánicas que no se encuentran disponibles para la planta (Jayachandran *et al*, 1992) gracias a la habilidad de estos para mineralizar el P del suelo (transformar de fósforo orgánico a inorgánico) (Feng *et al*, 2003). Por su parte, *Azospirillum* tiene la habilidad de mejorar la absorción de fósforo mediante modificaciones del sistema radical que se induce por la acción de AIA bacteriano. Particularmente incrementan el volumen de pelos radicales que proveen a la planta de una mayor capacidad de absorción de sustancias nutritivas del suelo (Bashan *et al*, 2004).

– **Potasio:**

En forma general de los macronutrientes requeridos por las plantas, el potasio es usualmente el más abundante en el suelo aunque solamente una pequeña fracción se encuentra disponible. Este es absorbido en mayor proporción por las plantas en etapas más tempranas del crecimiento en relación al fósforo y nitrógeno (Reitemeier, 1951) y juega un rol fundamental en la fotosíntesis, la regulación salina y la formación de cutícula en los órganos vegetales.

Aunque se conoce que solamente una fracción del potasio del suelo puede ser absorbido por las plantas, los resultados de la presente investigación evidencian un óptimo contenido de este nutriente en tejido foliar. Aunque no se distingue una tendencia diferenciada entre los diversos tratamientos y la absorción de este elemento, se observa que las plantas inoculadas con HMA y/o *Azospirillum* muestran un estado nutricional óptimo (Figura 3.20).

b. Nutrientes en suelo

Los resultados del contenido de los macronutrientes del suelo N y P (Figuras 3.21 y 3.22) muestran en forma general que los niveles de estos minerales se encuentran en mayor proporción en el sustrato de los tratamientos que fueron inoculados con las interacciones HMA-*Azospirillum*, presentándose las mayores cantidades en los que fueron tratados con 200 g de HMA y $1,5E^8$ UFC/ml con respecto al grupo control. Por otro lado, el análisis del contenido de potasio (Figura 3.23) muestra concentraciones sobre las normales para el control y los tratamientos inoculados con *Azospirillum*, sin embargo, la aplicación de *Azospirillum* y HMA regula estos niveles hasta rangos que se encuentran dentro del nivel considerado normal para este nutriente.

Si bien en el párrafo anterior se exponen los resultados obtenidos en relación a los factores investigados, se debe considerar que el suelo es un sistema abierto y dinámico donde actúan diversos procesos físicos, químicos y biológicos que influyen las características de este por lo que deben ser tomados en cuenta.

El incremento de los niveles de N y P en suelos tratados con HMA y *Azospirillum* puede deberse a que los exudados ya sean de los microorganismos como de las raíces pueden influenciar el pH del suelo. Para el caso del fósforo se ha descrito que tanto las raíces de las plantas como los HMA y bacterias del suelo son capaces de liberar fosfatasa ácida que indirectamente influyen en la solubilización de este nutriente y por lo tanto en su concentración en suelo (Joner *et al*, 1995).

4.5.3 Efectos sobre la simbiosis micorrícica y crecimiento bacteriano

El análisis de los datos de la población final de esporas de HMA (Tabla 3.23) y el porcentaje de colonización micorrícica (Tabla 3.27) muestran que conforme se incrementa la dosis de HMA incrementan también los parámetros señalados. A su vez se evidencia que la co-inoculación de *Azospirillum* ejerce un efecto positivo sobre la población de esporas y el % de colonización, siendo el tratamiento de 200 g de HMA y $1,5E^8$ UFC/ml de *Azospirillum* el que registra los mayores valores para estas variables. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Girish (2006) quien observó que tanto el conteo de esporas de HMA como el porcentaje de colonización fue mayor en plantas de tomate co-inoculadas con *Glomus fasciculatum* y *Azospirillum sp.* respecto a las que fueron tratadas solamente con HMA.

Balota *et al* (1995) señalan que el establecimiento y multiplicación de la micorriza puede estimularse por la producción de compuestos bacterianos, los cuales incrementan la sensibilidad de la planta a la colonización por HMA, promueven la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio fúngico.

Por otro lado, al analizar la población final de *Azospirillum* tanto en suelo como en raíces (Tabla 3.28), se observa que cuando se inocula únicamente la bacteria, la población bacteriana no incrementa ni disminuye respecto a la concentración inicial aplicada. Al contrario, si se co-inoculan HMA, se evidencia que indistintamente de la dosis aplicada, estos estimulan la multiplicación de *Azospirillum*. Estos resultados concuerdan con investigaciones de Belimov *et al* (1999) quienes observaron una mejor supervivencia y multiplicación de *Azospirillum* en raíces de plantas micorrizadas.

El incremento de las poblaciones de ambos microorganismos evidencia una relación sinérgica entre ellos. De acuerdo a Packovsky *et al* (1985) la penetración de las células corticales por HMA proveen de una ruta de entrada para *Azospirillum sp.* resultando en un incremento de la población de esta bacteria y facilitando su establecimiento y persistencia. Además según Thimann (1979) las hormonas producidas por *Azospirillum* producen cambios morfológicos en la raíz (incremento en el número y longitud de los pelos radicales) que resultan en un incremento de la colonización micorrízica.

Finalmente, los resultados presentados, sugieren que el banano es una especie altamente micotrófica capaz de beneficiarse de la simbiosis con HMA desde las primeras fases de su desarrollo, como lo señalaron Jaizme *et al* (2004). Durante la fase de aclimatación se

obtienen plantas sanas y bien nutridas, lo que a largo plazo supone beneficios para los productores de banano. Según Arizaleta & Pire (2008) la preparación de plantas vigorosas en fase de vivero, presentan una mayor productividad al ser introducidas a campo.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. La evaluación de las muestras de suelo de las siete haciendas bananeras de HDineAgros permitió determinar que la Hacienda Central poseía la mayor densidad poblacional de propágulos de HMA.
2. Utilizando 30% de suelo de la Hacienda Central, un sustrato de suelo - arena (1:1) y plantas de avena como hospederas, se obtuvo (tras cinco meses de propagación) un inóculo micorrícico que contenía 10 esporas/g de suelo, poniendo de manifiesto que la utilización de cultivos trampa para la propagación de esporas de HMA, constituye una técnica viable para dicho fin.
3. La población de bacterias diazótrofes aisladas de la Hacienda Central, presentó mayor densidad en raíces (10^6 a 10^8 microorganismos/g raíces) que en suelo (10^5 a 10^6 microorganismos/g de suelo).
4. Se aislaron e identificaron ocho cepas de *Azospirillum*, de las cuales cinco procedían de raíces y tres de suelo.
5. La cepa G4b de *Azospirillum* fue la que produjo mayor cantidad de AIA (6,33 $\mu\text{g/ml}$) en relación a las cepas restantes y fue seleccionada como cepa inóculo.
6. La co-inoculación de 200 g de HMA y $1,5E^8$ UFC/ml de *Azospirillum* favorece el crecimiento de las plántulas de banano, permitiendo incrementar 7 veces la altura, 4 veces el perímetro, 16 veces el área foliar, 12 veces la biomasa aérea y 8 veces la biomasa radical, en relación a las plantas control.

7. La co-inoculación de 200 g de HMA y $1,5E^8$ UFC/ml de *Azospirillum* promueve una mejor absorción de fósforo y nitrógeno, permitiendo que las plántulas de banano alcancen un estado nutricional óptimo, gracias a la capacidad de cada microorganismo para facilitar la absorción de nutrientes.
8. La aplicación de HMA y *Azospirillum* en proporciones menores a 200 g y $1,5E^8$ UFC/ml, no logran promover el desarrollo y nutrición de las plántulas de banano en la misma dimensión.
9. Los resultados obtenidos permiten corroborar la hipótesis planteada ya que se comprobó que la co-inoculación de HMA y *Azospirillum* mejoran el crecimiento y nutrición de las plántulas de banano en fase de aclimatación
10. La población final de esporas de HMA y el porcentaje de colonización, son favorecidos por la co-inoculación de *Azospirillum*, alcanzando los mayores valores (62,67 esporas/g y 96,67%) para la interacción de HMA-*Azospirillum* en sus mayores dosis, evidenciando un efecto positivo de la bacteria sobre la multiplicación de la micorriza y sus simbiosis con la planta.
11. La población final de *Azospirillum* incrementa cuando se co-inoculan con HMA, mostrando que las micorrizas favorecen la supervivencia y multiplicación de la bacteria tanto en el suelo como en raíces.
12. Los resultados obtenidos muestran que los HMA y *Azospirillum* presentan compatibilidad, evidencian una acción sinérgica sobre el desarrollo del banano y muestran una acción cooperativa para la multiplicación y desarrollo de simbiosis de ambos microorganismos con la planta.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

1. Realizar un ensayo similar utilizando menor número de tratamientos y más repeticiones para lograr obtener resultados que permitan determinar en forma concreta el efecto de cada uno de los microorganismos y de su interacción sobre el desarrollo y nutrición de banano.
2. Evaluar el efecto de mayores concentraciones de *Azospirillum* sobre el desarrollo de plántulas de banano, a fin de determinar la concentración máxima que beneficia a la planta y la dosis a la que se registran perjuicios sobre su desarrollo.
3. Incrementar el porcentaje de turba en el sustrato para el crecimiento de las plantas o aumentar el tiempo de aplicación de solución nutritiva, a fin de alcanza niveles óptimos de fósforo en el suelo que no perjudiquen a los HMA pero que permitan una adecuada nutrición de las plantas.
4. Evaluar la productividad de las plantas de banano co-inoculadas con HMA y *Azospirillum* en campo.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

AEBE Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador. (2010). El mapa bananero del Ecuador. Extraído de: <http://www.aebe.com.ec/Desktop.aspx?Id=47>

Alarcón, A. Ferrera-Cerrato, R. (2000). Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura. Agricultura Técnica en México, 26(2), 191-203.

Alarcón, A. Ferrera-Cerrato, R. González, M.C. Villegas, A. (2000). Hongos Micorrízico Arbusculares en las dinámicas de aparición de estolones y nutrición de plantas de fresa CV FERN., obtenidas por cultivo *in vitro*. TERRA Latinoamericana, 18, 211-218.

Alexander, M. (1980). Introducción a la Microbiología del Suelo. México D.F: AGT Editor.

Allen, MF. (1991). The ecology of mycorrhizae. Cambridge: Cambridge University Press.

Amaranthus, M. (1999). Mycorrhizal management. The Spring Florida Landscape Architecture Quarterly.

Arias, P. Dankers, C. Liu, P. Pilkauskas, P. (2004). La economía mundial del banano 1985-2002. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Arizaleta, M. Pire, R. (2008). Respuesta de plántulas de café al tamaño de la bolsa y fertilización con nitrógeno y fósforo en vivero. Agrociencia, 42(1), 47-55.

Arshad, M. Frankenberger, W. (1998). Plant growth regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. Adv. Agron. 62, 45-151.

Augé, R.M. (2001). Water relations, drought and vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza, 11, 3-42.

Azcón-Aguilar, C. Barea, J. (1996). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens-an overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza, 6, 457-464.

Azcón-Aguilar, C. Bagó, B. (1994). Physiological characteristics of the host plant promoting and undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. En Gianinazzi, S. Schhepp, H (Eds). Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural ecosystems. Suiza: ALS.

Azcón-Aguilar, C. Barea, J. (1997). Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance. Sci. Hort. 68, 1-24.

Bagó, B. Bécard, G. (2002). Bases of obligate biotrophy of arbuscular micorrhizal fungi. En Gianinazzi, S. Schüepp, H. Barea, J. Haselwandter, K (Eds). Mycorrhiza Technology in Agriculture: from Genes to Bioproducts. Suiza: Birkhäuser Verlag.

Bagó, B. Shachar-Hill, Y. Pfeffer, P. (2000). Dissecting carbon pathways in arbuscular mycorrhizas with NMR spectroscopy. The American Phytopathological Society, 111-126.

Bagó, B. Vierheilig, H. Piché, Y. Azcón-Aguilar, C. (1996). Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. New Phytologist, 133, 273–280.

Balota, E.L. Lopes, E.S. Hungria, M. Döbereiner, J. (1995). Interactions and physiological effects of diazotrophic bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in cassava plants. Pesq. Agropec. Bras. 30, 1335–1345.

Barea, J. Azcón, R. Azcón-Aguilar, C. (2002). Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. Antony van Leeuwenhoek, 81, 343-351.

Barea, J. (1997). Mycorrhiza-Bacteria Interactions on Plant Growth Promotion. En: Ogoshi, A. Kobayashi, K. Homma, Y. Kodama, F. Kondo, M. Akino, S (Eds.). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. París: OECD Press.

Barea, J. Azcón-Aguilar, C. (1982). La Rizosfera: Interacciones microbio-planta. Anales de edafología y Agrobiología XII, (7-8), 1517-1532.

Barea, J. Pozo, J. Azcón, R. Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rizosphere. J. Exp. Bot. 56, 1761-1778.

Baset, M. Shamsuddin, Z. Wahab, Z. Marziah, M. (2009). The effect of rhizobacterial inoculation on growth and nutrient accumulation of tissue-cultured banana plantlets under low N-fertilizer regime. African Journal of Biotechnology, 8(21), 5855-5866.

Bashan, Y. Holguin, G. (1997b). Root-to-root travel of beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2120-2131.

Bashan, Y. (1993). Potential use of *Azospirillum* as Biofertilizer. Turrialba, 43.

Bashan, Y. Holguin, G. (1997a). Short medium terms avenues for *Azospirillum* inoculation. En Plant growth-promoting rhizobacterias-present status and future prospects. Sapporo: Hokkaido University.

Bashan, Y. Holguín, G. Ferrera-Cerrato, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*. Terra, 14, 159-194.

Bashan, Y. Moreno, M. Troyo, E. (2000). Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. Biol. Fertil. Soils, 32, 265-272.

Bashan, Y. Holguin, G. de Bashan, L.E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Canadian Journal of Microbiology 50, 521-577

Belimov, A. Serebrennikova, A. Stepanok, N. (1999). Interaction of associative bacteria and an endomycorrhizal fungus with barley upon dual inoculation. Microbiology, 68, 104-108.

Ben Dekhil, S. Cahil, M. Stackebrandt, E. Sly, I. (1997). Transfer of *Conflomeromonas largomobilis* subsp. *Largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species *Conglomeromonas, Conglomeromonas parooensis* sp. Nov. Syst. Appl. Microbiol. 20, 72-77.

Bethlenfalvay, G. Linderman, R. (1992). Mycorrhizae in sustainable agriculture. ASA Special Publication Number, 54, 45-70.

Bever, J. Morton, J. Antonovics, J. Schultz, P. (1996). Host dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. J. Ecology, 84, 71-82.

Bianciotto, V. Bandi, D. Minerdi, M. Sironi, H. Tichy, P. Bonfante, P. (1996). An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3005-3010.

Boddey, R. Urquiaga, S. Reis, V. Döbereiner, J. (1991). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. Plan Soil, 137, 111-117.

Bolan, N. (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. Journal Plant and Soil, 134, 189 – 207.

Bolton, H. Fredrickson, J. Elliot, L. (1992). Microbial Ecology of the rhizosphere. En: Blaine, F. (Ed) Soil Microbial Ecology. New York: Marcel Dekker.

Bradshaw, L. (1976). Microbiología de Laboratorio. Universidad Estatal de California: Editorial El Manual Moderno.

Brenner, D. Noel, J. James, R. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition. New York: Springer Science Bussines Media Inc.

Bric, J. Bostock, R. Silverstone, S. (1991). Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. Applied Environ. Microbiol. *57*, 535-538.

Brundrett, M. Bougher, N. Dell, N. Grove, T. Malajczuc, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research.

Caballero-Mellado, J. (2001). El género *Azospirillum*: Capitulo 14. En Martínez-Romero, E. Martínez-Romero, J. Microbiología General.

Carrillo, L. (2003). Microbiología Agrícola: Capítulo 1. Extraído de: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap1.pdf>

Castro-Sowinski, S. Burdman, S. Matan, O. Okon, Y. (2010). Natural functions of bacterial polyhydroxyalkanoates. En Chen, G. (Ed). Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications (pp.39-61). Berlín: Springer.

Chalk, P. (1991). The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of non-legumes. Plant Soil, *132*, 29-39.

Cortés, G. (1994). Atlas agropecuario de Costa Rica. San José: C.R EUNED.

Crowley, D. Wang, Y. Reid, C. Szaniszlo, P. (1991). Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. Plant Soil, *130*, 179-198.

- Crozier, A. Arruda, P. Jasmin, J. Monteiro, A. Sandberg, G. (1988). Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. **54(11)**, 2233-2837.
- Declerck, S. Plenchette, C. Strullu, D. (1995). Mycorrhizal dependency of banana (*Musa acuminata* AAA group) cultivar. Plant & Soil, **176**, 183-187.
- Deubel, A. Gransee, A. Merbach, W. (2000). Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. J Plant Nutr Soil Sci. **163**, 387–392.
- Dobbelaere, S. Croonenborghs, A. Thys, A. Vande Broek, A. Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strain altered in IAA production on wheat. Plant Soil, **212**, 155-164.
- Döbereiner, J. Marriel, I. Nery, M. (1976). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can. J. Microbiol. **22**, 1464-1473
- Döbereiner, J. Urquiaga, S. Boddey, R. Ahmad, N. (1995). Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. Nitrogen economy in tropical soil. Fertil. Res. **42**, 339-346.
- Douds, D. Millner, P. (1999). Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems & Environment, **74**, 7793.
- Douds, D. Pfeffer, P. Scachar-Hill, Y. (2000). Carbon partitioning, cost and metabolism of arbuscular mycorrhizas. En Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function (pp. 107-129). Netherlands: Kluwer publishers.
- Duponnois, R. Garbaye, J. (1991). Effect of dual inoculation of Douglas fir with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* and mycorrhization helper bacteria (MHB) in two bare root forest nurseries. Plant Soil, **138**, 169-176.

Egorenkova, I. Konnova, S. Skvortsov, I. Ignatov, V. (2000). Investigation of initial stages of interaction of the bacterium *Azospirillum brasilense* with wheat seedling roots: Adsorption and root hair deformation. Microbiology, 69, 103-108.

Elmeskaoui, A. Damont, P. Poulin, M. Piche, Y. Desjardins, Y. (1995). A tripartite culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. Mycorrhiza, 5, 313-319.

Evans, H. Burris, R. (1992). Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. En Stacey, G. Burris, R. Evans, H (Eds). Biological nitrogen fixation. New York: Chapman and Hall.

Feng, G. Song, Y. Li, X. Christie, P. (2003). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to utilization of organic sources of phosphorus by red clover in a calcareous soil. Appl. Soil Ecol. 22, 139–148.

Finlay, R. Soderstrom, B. (1992). Mycorrhiza and carbon flow to the soil. En Allen, M (Ed). Mycorrhizal Functioning. An Integrative Plant-Fungal Process (p.134). New York: Chapman and Hall.

Fitter, A. Garbaye, J. (1994). Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. Plant and Soil, 159, 123 – 133.

FONTAGRO. (2004). Innovaciones tecnológicas para el manejo y mejoramiento de la calidad y salud de suelos Bananeros de América Latina y el Caribe. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano

Fred, E.S. Waksman, A. (1928). Laboratory Manual of General microbiology. New York: McGraw-Hill Book Co.

Furina, E. Bonartseva, G. Lvov, N. (1999). Effect of various concentrations of oxygen, molybdenum and nitrate on nitrogen fixation and denitrification in *Azospirillum lipoferrum*. Appl. Biochem, Microbiol. 35, 44-47

Gendermann, J. Nicholson, T. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet, sieving and decanting. Trans. Br. Mycol. Soc. 46, 235-244.

Gianinazzi, S. Gianinazzi-Pearson, V. Trouvelot, A. (1990). Potentialities and procedures for the use of endomycorrhizas with special emphasis on high value crops. En: Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth.

Giovanetti, M. Sbrana, C. (1998). Meeting a non-host: the behavior of AM fungi. Mycorrhiza, 8, 123-130.

Giovanetti, M. (2000). Spore germination and pre-symbiotic mycelia growth. Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Girish, C. (2006). Interaction of *Glomus fasciculatum* and *Azospirillum* sp. on the growth and yield of tomato. (Tesis Doctoral, Department of Agricultural Microbiology College of Agriculture, Dharwad University of Agricultural Sciences).

González, M. Cuenca, G. (2008). Respuesta de plantas de plátano (*Musa* AAB cv. Hartón) a la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares nativos e introducidos, bajo condiciones de campo. Rev. Fac. Agron. 25, 470-495.

Guru, V. Tholkappian, V. Viswanathan, K. (2011). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* co-inoculation on the growth characteristics, nutritional content and yield of tomato crops grown in south India. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Science, 1 (4), 84-92.

HAIFA. (s/a). Recomendaciones nutricionales para banana. Extraído de: http://www.horticoop.ec/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=4&Itemid=

Herrer, R. Furrázola, E. Ferrer, R. Fernández, R. Torres, Y. (2004). Functional strategies of root hairs and Arbuscular micorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario-Cuba. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 35, 113-123.

Herridge, D. (2002). Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam. ACIAC. 86-94.

Heulin, T. Rahman. Omar, M. Rafidison, Z. Pierrat, J. Balandreau, J. (1989). Experimental and mathematical procedures for comparing N₂-fixing efficiencies of rhizosphere diazotrophs. J. Microbiol. Meth. 9, 163-173.

Hucker, G. (1921). A new modification and application of the Gram stain. J Bacteriol. 6, 395-397.

IICA Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (1989). Compendio de agronomía tropical. Francia.

Infante, J. (2003). Las micorrizas. Extraído de: <http://www.triton.cl/index.php.pagina=faq>

Jaizme-Vega, M.C. Azcón, R. (1995) Response of some tropical and subtropical cultures to Endomycorrhizal fungi. Mycorrhiza, 5, 213-217.

Jaizme-Vega, M. C. Rodríguez-Romero, A. Piñero-Guerra, M. (2005). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi AMF and other rhizosphere microorganisms on development of the banana root system. En Turner, D. Rosales, B (Eds). Banana Root System: towards a better understandig for its productive management. Francia: INIBAP.

Jaizme-Vega, M.C. Rodríguez-Romero, A. Piñero-Guerra, M. (2004). Potential use of rhizobacteria from the *Bacillus* genus to stimulate the plant growth of micropropagated banana. Fruits, 59, 83-90.

Jaizme-Vega, M.C. (1999). Aplicaciones de las micorrizas arbusculares (MA) sobre plataneras micropropagadas. INIBAP. Memorias del taller internacional realizado en la EARTH, Guácimo, Costa Rica.

Jaizme-Vega, M.C. Rodríguez-Romero, A. (2002). Aplicación de micorrizas sobre el cultivo de platanera: Avances de la investigación en Canarias. En Fernández, D. Hernández, P (Eds). Actividades del ICIA en platanera. Canarias: ICIA.

Jaizme-Vega, M.C. Esquivel-Delamo, M. Tenoury-Domínguez, P. Rodríguez-Romero, A. (2002). Effects of mycorrhization on the development of two cultivars of micropropagated banana. INFOMUSA, 11(1), 25-28.

Jayachandran, K. Schwab, A. Hetrick, B. (1992). Mineralization of organic phosphorus by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biol Biochem. 24, 897-903.

Jeffries, J. Gianinnazi, S. Perotto, S. Turnaum, K. Barea, J. (2003). The contribution of arbuscular micorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. Biol. Fertil. Soil. 37, 1-16

Jin, H. Pfeffer, P. Douds, D. Piotrowski, E. Lammers, P. Shachar-Hill, Y. (2005) The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. New Phytol. 168, 687-696

Johansen, A. Jakobsen, I. Jenssen, E. (1994). Hyphal N transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus associated with cucumber grown at three nitrogen levels. Plant and Soil, 160, 1-9.

Joner, E. Magid, J. Gahoonia, T. Jakobsen, I. (1995). P depletion and activity of phosphatases in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal cucumber (*Cucumis sativus* L.) Soil Biol. Biochem. 27, 1145-1151.

Jones, D. Hodge, A. Kuzyakov, Y. (2004). Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. New Phytologist, 163, 459-480.

Kadourim, D. Jurkevitch, E. Okon, Y. Castro-Sowinski, S. (2005). Ecological and agri-cultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. Crit. Rev. Microbiol. 31, 55-67.

Khammas, K. Ageron, E. Grimont, A. Kaiser, P. (1989). *Azospirillum irakense* sp. Nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbiol. 140, 679-693.

Khan, M. Zaidi, A. Musarrat, J. (2009). Microbial strategies for crop improvement. Berlín: Springer.

Lañez, E. (Microbiología General. Universidad de Granada, España. Extraído de: <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/programa.htm>

Lee, W. Lee, J. Young Kang, Y. Je Cho, M. (1988). Synthetic pathway of Indole Acetic Acid in *Azospirillum lipoferum*. En Burris, R. Evans, H (Eds). Biological nitrogen fixation. New York: Chapman and Hall.

Loredo, O. López, R. Espinosa, V. (2004). Revisión: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. Terra Latinoamericana, 22, 225-239.

Lynch, J. (1982). Interactions between bacteria and plants in the root environment, p. 1-23. En Rhodes-Roberts, M. Skinner, F (Eds). Bacteria and plants. Londres: Academic Press Inc.

Madigan, M. Martinko, J. Parker, J. (1999). Brock. Biología de los microorganismos. Madrid: Prentice Hall.

Magalhães, F. Baldani, J. Souto, S. Kuykendall, R. Döbereiner, J. (1983). A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An. Acad. Brasil. Cienc. 55, 417-430.

Maldonado, J. Ramírez, G. (1997). Efecto de la inoculación con hongos micorrizógenos en almácigos de café (*Coffea arábica*) Variedad Colombia.

Universidad Nacional de Colombia. (Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellín, 1997).

Mandhare, V. Suryawanshi, A. (2005). Biotization of banana tissue cultured plantlets with VAM fungi. Agric. Sci. Digest, 25(1), 65-67.

Marulanda, A. Azcón, R. Ruiz-Lozano, J. (2003). Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* L. plants under drought stress. Physiologia Plantarum, 119, 526–533.

McCrary, M. (1917). The numerical interpretation of fermentation-tube results. J. Infec. Dis. 17, 183–212.M

Mertens, T. Hess, D. (1984). Yield increases in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with *Azospirillum lipoferum* under greenhouse and field conditions of a temperate region. Plant Soil, 82, 87-99.

Miyasaka, S. Habte, M. (2003). Plant mechanisms and mycorrhizal symbiosis to increase phosphorus uptake efficiency. Journal of College of Tropical Agriculture and Human resources, 1101 – 1133.

Nagahashi, G. Douds, D. (2000). Partial separation of root exudates components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. Mycological Research, 104, 1453–1464

Nagahashi, G. Douds, D. Abney, G. (1996). Phosphorus amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its effect on root exudation. Mycorrhiza, 6, 403–408.

Nemec, S. (1986). VA mycorrhizae in horticultural systems. En Safi, G (Ed). Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants (193-211). Boca Ratón: CRC.

Okon, Y. Labandera-González, C. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biology and Biochemical, 26 (12), 1591-1601.

Pacovsky, R. Fuller, S. Paul, G. (1985). Influence of soil on the interactions between endorhizosphere and *Azospirillum* in sorghum. Soil Biology and Biochemistry, 17, 525-531.

Parniske M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. Nat. Rev. Microbiol. 6, 763-775.

Patnaik, G. Bose, L. Mehta, A. Rao, V. (1994). Rhizosphere nitrogenase and *Azospirillum* sp. association with wild, trisomic and cultivated rice. Microbiol. Res. 149, 42-46.

Patriquin, D. Döbereiner, J. Jain, D. (1983). Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. Can. J. Microbiol. 29, 900-915.

Patriquin, D. Döbereiner, J. (1978). Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. Can. J. Microbiol. 24, 734-747.

Phillips, J. Hayman, D. (1970). Improve procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55, 159-161.

Ratcliff, W. Kadam, S. Denison, R. (2008). Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) supports survival and reproduction in starving rhizobia. FEMS Microbiol. Ecol. 65, 391-399.

Reinhold, B. Hurek, T. Fendrik, B. Pot, B. Gillis, M. Kersters, K. Thielemans, S. De Ley, J. (1987). *Azospirillum halopraeferens* sp. Nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 43:51.

Reitemeier, R. F. (1951). The chemistry of soil potassium: Advan.Agron. 3, 113-164.

Rodríguez, H. González, T, Goire, I. Bashan, Y. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growthpromoting bacterium *Azospirillum* spp. Naturwissenschaften, 91, 552-555.

Rodríguez, M. (1995). Microorganismos libres fijadores de nitrógeno. En Ferrera-Cerrato R. Pérez M (Eds). Agromicrobiología: Elemento útil en la agricultura sustentable (pp. 105-126). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.

Rodríguez-Romero, A. (2003). Alternativas biotecnológicas en cultivares de *Musa* frente a los principales patógenos de suelo en Canarias. (Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna).

Russo, A. Felici, C. Toffanin, A. Götz, M. Collados, C. Barea, J. Moëne-Loccoz, Y. Smalla, K. Vanderleyden, J. Nutri, M. (2005). Effect of *Azospirillum* inoculants on arbuscular mycorrhiza establishment in wheat and maize plants. Biology Fertility of Soils, 41(5), 301-309.

Sánchez, P. (1999). Endomicorrizas en agroecosistemas colombianos. Universidad Nacional de Colombia.

Sánchez-Guillén, J. (2007). Microbiología y Biotecnología. Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Extraído de: <http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/ingenieriabioquimicaIyII/microbiologia.pdf>

Sarig, S. Okon, Y. Blum, A. (1992). Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on growth dynamics and hydraulic conductivity of *Sorghum bicolor* roots. J. Plant Nutr. 15, 805-819.

- Schweiger, P. Jakobsen, I. (1998). Dose-response relationships between four pesticides and phosphorus uptake by hyphae of arbuscular mycorrhizas. Soil Biol. Biochem. **30**, 1415-1422.
- Shelud'ko, I. Borisov, V. Krestinenko, V. Panasenko, V. Katsy, E. (2006). Effect of Congo Red on the motility of the bacterium *Azospirillum brasilense*. Microbiology, **75** (1), 48-54.
- Sieverding, E. (1991). Vesicular-arbuscular mycorrhizal management in tropical agrosystems. Technical Cooperation, Federal Republic of Germany.
- Smith, G. (1988). The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi with soil borne nematodes and fungi. Phytopathology, **78**, 371-374.
- Smith, M. Hartnett, D. Rice, C. (2000). Effects of long-term fungicide applications on microbial properties in tallgrass prairie soil. Soil Biol. Biochem. **32**, 935-946.
- Smith, S. Read, D. (1997). Mycorrhizal Symbiosis. San Diego: Academic Press.
- St John, T. Coleman, D. Reid, C. (1983) Association of vesicular arbuscular mycorrhizal hyphae with soil organic particles. Ecology, **64**, 957-959.
- Steinberg, P. Rillig, M. (2003). Differential decomposition of arbuscular mycorrhiza fungal hyphae and glomalin. Soil Biology and Biochemistry, **35**, 191-194.
- Sumner, M. (2000). Handbook of Soil Science. Boca Raton: CRC Press.
- Sutter, E. (1985). Morphological physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated in vitro. Ann. Bot. **55**, 321-329.
- Tarrand, J. Krieg, N. Döbereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum* lipoferum group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two

species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) com. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. Can. J. Microbiol. **24**, 967-980.

Thimann, K. (1974). Fifty years of plant hormone research. Plant Physiology, **54**, 450- 453.

Tien, T. Gaskins, M. Hubbell, D. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl. Environ. Microbiol. **37**, 1016-1024.

Tisserant, B. Gianinazzi, S. Gianinazzi-Pearson, V. (1996). Relationships between lateral root order, arbuscular mycorrhiza development, and the physiological state of the symbiotic fungus in *Platanus acerifolia*. Can J Bot. **74**, 1947–1955.

Tovar-Franco, J. (2006). Selección en invernadero de inóculos de micorriza arbuscular (MA) para el establecimiento de la alfalfa en un andisol de la sabana de Bogotá. Universitas Scientiarum, **11**, 87-103.

Umali-Garcia, M. Hubbell, D. Gaskins, M. Dazzo, F. (1980). Association of *Azospirillum* with grass roots. Appl. Environ. Microbiol. **39**, 219-226.

Usuaga, C, Castañeda, A. Castañeda, D. Franco, A. (2008). Multiplicación de hongos micorriza arbuscular (HMA) y efecto de la micorrización en plantas micropropagadas de banano (*Musa* AAA cv. *Gran Enano*) (*Musaceae*). Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín, **61(1)**, 4279-4290.

Van der Heijden, M. Klironomos, J. Ursic, M. Moutoglis, P. Streitwolf, R. Boller, T. Wiemkem, A. Sanders, I. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plants biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature, **396**, 69-72.

Van Peer, R. Niemann, G. Schippers, B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. Phytopathology, **81**, 728-734.

Varma, A. Kharkwal, A. (2009). Symbiotic Fungi: Principles and Practice. Springer, 18, 430.

Vestberg, M. Estaun, V. (1994). Micropropagated plants, an opportunity to positively manage mycorrhizal activities. En Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems (pp: 217-226). Birkhäuser, Basel.

Vierheilig, H. (2004). Regulatory mechanisms during the plant - arbuscular mycorrhizal fungus interaction. Canadian Journal of Botany, 82, 1166-1176.

Viñals, M. Villar, J. (1999). Avances en la formulación y aplicación de inoculantes bacterianos de uso agrícola. Cultivos tropicales, 20(4), 9-17.

WRM Movimiento Mundial por los Bosques Tropicales. (2004). Plantaciones bananeras en América Latina. Extraído de: <http://www.wrm.org.uy/boletin/85/banana.html>

Wu, S. Cao, Z. Li, Z. Cheung, K. Wong, M. (2005). Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. Geoderma. 125, 155– 166.

Yano-Melo, A. Orivaldo, J. Lima-Filho, J. Melo, N. Maia, L. (1999) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. Mycorrhiza, 9, 119-123.