

Efecto de Hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y *Azospirillum* sobre el crecimiento y nutrición de plántulas de banano micropropagadas durante su fase de aclimatación

Tania Carina VILLARREAL¹, María Emilia MEDINA¹, Santiago ULLOA²

¹Laboratorio de Microbiología del Suelo, Centro de Investigaciones Científicas, Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Ecuador.

²Carrera de Ingeniería Agropecuaria, Escuela Politécnica del Ejército. Santo Domingo, Ecuador.

Abstract – The effect of the combined inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and *Azospirillum* on micropropagated banana plantlets development during their acclimatization phase was investigated. At the time of transplantation, micropropagated banana plantlets were inoculated with a native mycorrhizal inoculum containing 10 spores/g at four doses: 0, 50, 100 and 200 g. Seventy days after fungal inoculation, 20 ml of *Azospirillum* in four concentrations (0, 10⁶, 10⁷ and 10⁸ CFU/ml) was applied. Finally, after 98 days from the start of the experiment a second dose (40 ml) of *Azospirillum* in the concentrations mentioned above was inoculated. Plants were harvested 5 months after transplantation and the growth and nutritional parameters were assessed. The evaluation of the trial showed in general that banana plants co-inoculated with 200 g of AMF and 1.5E⁸ 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

1. INTRODUCCIÓN

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, 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).

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. En este contexto tanto los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Azospirillum* han sido estudiadas debido a que presentan gran adaptabilidad a las condiciones ambientales y edáficas de las plantaciones bananeras (Loredo *et al*, 2004).

Las micorrizas arbusculares 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). 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).

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). 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.

Es por ello que en la presente investigación se analizó el efecto de la inoculación combinada de HMA y *Azospirillum* sobre el crecimiento y nutrición de plántulas de banano micropropagadas durante su fase de aclimatación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las plántulas de banano variedad 'Williams' micropropagadas fueron provistas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Politécnica del Ejército con una altura aproximada de 5±2 cm. Estas se trasplantaron en macetas de 32 oz. conteniendo un sustrato estéril compuesto por 30% arena, 10% turba negra PROMIX PGX y 60% suelo negro.

Las esporas de HMA se propagaron en un período de 5 meses a partir de suelo (1,07 esporas/g) proveniente de la Hacienda Central (HDINEAGROS S.A - El Oro) utilizando plantas de avena como hospedero, un sustrato suelo-arena (1:1 p/p) y suelo bananero que poseía una población inicial de 1,07 esporas/g. Al final del periodo de propagación se obtuvo un inóculo micorrízico que consistió en una mezcla de suelo y raíces que contenía 10 esporas/g.

La cepa inóculo de *Azospirillum* (G4b) fue seleccionada entre 8 aislamientos obtenidos de suelo y raíces de banano en base a su capacidad de producción de ácido indol acético (AIA) (6,33 µg/ml) mediante reacción con el reactivo de Salkowski (Bric *et al*, 1991). El inóculo de *Azospirillum* se desarrolló a partir de cultivos axénicos en medio Ácido Málico Rojo Congo y consistió en una suspensión bacteriana sobre solución salina estéril (NaCl 0.85%) que se ajustó a tres concentraciones: 10⁶, 10⁷ y 10⁸ UFC/ml.

Diseño Experimental e Inoculación

Se estableció un ensayo con 16 tratamientos generados a través de un diseño factorial a partir de la interacción de los factores: dosis de micorrizas (0, 50, 100 y 200 g) y concentración de *Azospirillum* (0, 10⁶, 10⁷ y 10⁸ UFC/ml). Se consideraron 9 repeticiones por tratamiento (unidad experimental: 1 planta. Total 144 plantas) y las plantas se dispusieron en una cámara de crecimiento en un diseño completamente al azar.

La inoculación de las diversas dosis de HMA se llevó a cabo en el momento del transplante de las plántulas de banano a maceta, mientras que la inoculación bacteriana se realizó en dos ocasiones a lo largo del ensayo. La primera dosis (20 ml/planta) de *Azospirillum* se suministró 70 días después del transplante y la segunda (40 ml/planta) se llevó a cabo tras 98 días del iniciado el ensayo. La fase de aclimatación tuvo una duración de 5 meses en los cuales las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento con temperaturas de 25±5 °C, humedad relativa de 90±5% y riego con solución nutritiva de Hewitt (durante las primeras 6 semanas) y agua destilada de acuerdo a los requerimientos de irrigación.

Monitoreo y Evaluación de las variables

Se monitorearon las variables de crecimiento: altura, perímetro del pseudotallo y área foliar a los 0, 70 y 98 días; y se realizó la evaluación final del ensayo al cabo de 5 meses (150 días) donde se midieron las variables previamente descritas además de la biomasa aérea, biomasa radical, contenido de nutrientes tanto en suelo como en tejido foliar y se determinó la población final de esporas de HMA (Genderman y Nicholson, 1963, modificada por Herrera *et al.*, 2004) porcentaje de colonización micorrízica (Philips & Hayman, 1970) y población final de *Azospirillum* en suelo y raíces de banano.

Análisis de resultados

El análisis de los resultados de las variables de crecimiento, nutrición y simbiosis se realizó mediante el Software Estadístico InfoStat utilizando Modelos Lineales Generales y Mixtos con una prueba de comparación de medias de LSD Fisher al 5%. A continuación se llevó a cabo un análisis matemático de regresión no lineal mediante lenguaje R, de las variables anteriores vs. el factor en estudio que mostró significancia estadística.

Los resultados del contenido de nutrientes tanto de suelo como foliares se analizaron utilizando gráficas de barras debido a que no se disponía de repeticiones en los análisis nutricionales de cada tratamiento.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propagación de esporas de 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 de HMA 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* (Figura 1).

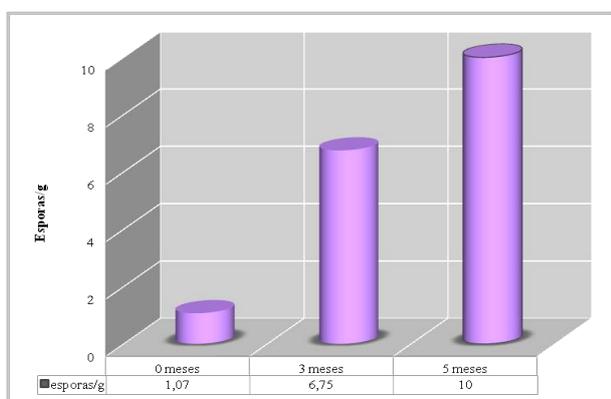


Figura 1. Incremento de la densidad poblacional de esporas de HMA en cultivo trampa de avena.

Crecimiento

Tanto la inoculación simple de HMA como la co-inoculación de HMA y *Azospirillum* proveen beneficios a las plántulas de banano en términos de crecimiento vegetal. No obstante las plántulas tratadas con 200 g de HMA y 10^8

Selección de cepa inóculo de *Azospirillum*

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 (Figura 2) muestran que la concentración máxima de AIA entre las cepas de *Azospirillum* varía entre 2,5 a 6,33 $\mu\text{g/ml}$, valores que se encuentran dentro del rango de producción reportado para el género y que corresponden a concentraciones de 1 a 25 $\mu\text{g/ml}$ (Tien *et al.*, 1979; Crozzier *et al.*, 1988). La cepa seleccionada es la que evidenció la mayor producción de AIA (6,33 $\mu\text{g/ml}$) y correspondió al aislamiento G4b.

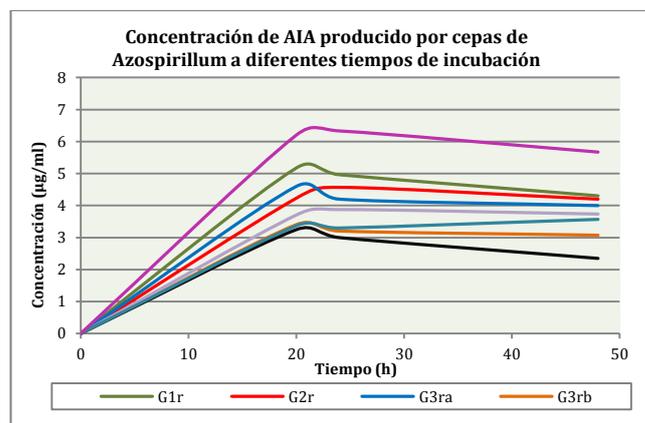


Figura 2. Concentración de AIA producido por las cepas de *Azospirillum*

UFC/ml de *Azospirillum* muestran los mayores incrementos en todas las variables de crecimiento evaluadas, a pesar que para la altura y perímetro no se evidencian diferencias estadísticas, el tratamiento mencionado exhibe las medias muestrales más altas (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la co-inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el crecimiento de plántulas de banano micropropagadas (150 días)

Tratamiento	Altura (cm)	Perímetro (cm)	Área foliar (cm ²)	Biomasa aérea (g)	Biomasa radical (g)
Control	1,59 a	0,76 a	12,11 c	4,27 c	4,37 d
<i>Azospirillum</i> (10^8 UFC/ml)	3,00 a	1,04 a	55,67 b	4,57 c	7,88 c
HMA (200 g)	9,82 a	2,19 a	158,56 ab	36,59 b	20,37 b
<i>Azospirillum</i> + HMA (10^8 UFC/ml+200 g)	10,83 a	2,68 a	193,44 a	51,07 a	34,82 a

Dentro de la misma columna, datos con la misma letra no presentan diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de LSD Fisher al 5% ($p \leq 0.05$)

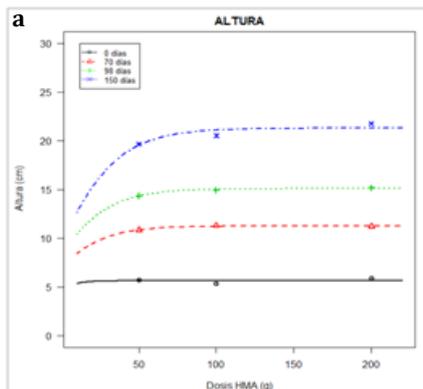
Los valores registrados para todos los parámetros de crecimiento evaluados muestran los mayores

incrementos en el tratamiento inoculado con las dosis más altas de los dos microorganismos en

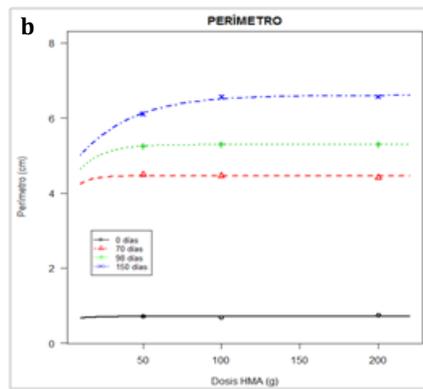
estudio, llegando a incrementar 7 veces la altura, 4 veces el perímetro y 16 veces el área foliar en relación a las plantas control. De igual forma se observa un efecto significativo sobre la biomasa vegetal de las plántulas de banano co-inoculadas, en las que se observó un incremento de 12 veces la biomasa aérea y 8 veces la biomasa radical comparada con el grupo control.

Además, el análisis matemático (Figura 3) muestra que el modelo que se ajusta a todas las variables de crecimiento evaluadas corresponde a una regresión logística de Gompertz. Para la altura y perímetro, la dosis de micorrizas es el factor que tiene mayor impacto sobre estas, observándose que

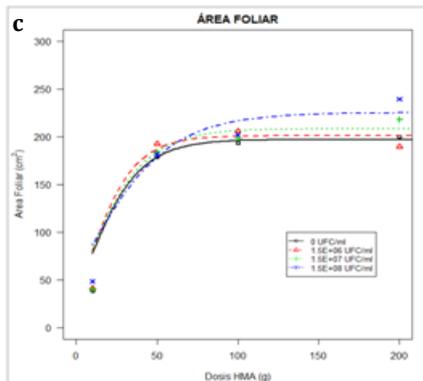
conforme incrementa la cantidad de HMA aplicada también incrementan dichas variables. Por otro lado, tanto el área foliar como la biomasa vegetal es directamente influenciada por la co-inoculación de HMA y *Azospirillum*, encontrándose que los mayores valores para cada una de ellas se registran en el tratamiento de 10^8 UFC/ml de *Azospirillum* +200 g de HMA. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Jaizme-Vega *et al* (2004) quienes precisaron que al aplicar *Glomus manihotis* y un coctel de *Bacillum spp.* a plántulas de banano, se obtenían los valores más elevados para todas las variables de crecimiento evaluadas respecto a la inoculación simple con cada microorganismo por separado y al grupo control.



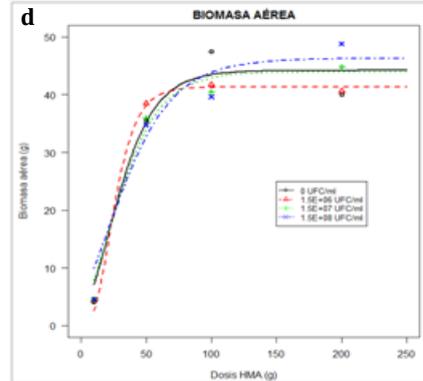
Tiempo (días)	b (pendiente)	d (límite superior)
0	0.13 (0.41)	5.63 (0.12)
70	0.05 (0.01)	11.24 (0.10)
98	0.05 (0.01)	15.08 (0.25)
150	0.05 (0.01)	21.29 (0.31)



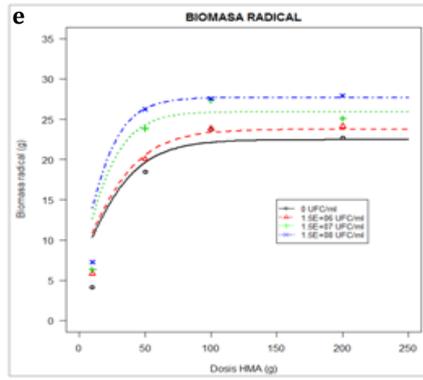
Tiempo (días)	b (pendiente)	d (límite superior)
0	0.07 (0.13)	0.71 (0.02)
70	0.13 (0.20)	4.45 (0.04)
98	0.07 (0.05)	5.29 (0.04)
150	0.03 (0.01)	6.60 (0.10)



Concentraciones <i>Azospirillum</i>	b (pendiente)	d (límite superior)
0	0.06 (0.03)	197.1 (2)
10^6	0.06 (0.01)	200.9 (6)
10^7	0.05 (0.01)	208.3 (6)
10^8	0.05 (0.01)	225.2 (13)



Concentraciones <i>Azospirillum</i>	b (pendiente)	d (límite superior)
0	0.05 (0.02)	44.21 (3)
10^6	0.08 (0.06)	41.32 (3)
10^7	0.05 (0.01)	43.95 (2)
10^8	0.06 (0.01)	46.27 (3)



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. Modelo de Gompertz para las variables de crecimiento de banano. a) Altura, b) Perímetro, c) Área foliar, d) Biomasa aérea e) Biomasa radical

Contenido de nutrientes

Nitrógeno

Los resultados del contenido de nitrógeno en tejido foliar (Figura 4a) 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/o 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 10^8 UFC/ml.

Por otro lado, el análisis del contenido de nitrógeno en suelo (Figura 5a) evidencia que 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. Además 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 nitrógeno, siendo el tratamiento de 200 g de HMA y 10^8 UFC/ml el que exhibe el mayor nivel de este mineral (27,8 ppm).

Fósforo

Los resultados del contenido de fósforo en tejido foliar (Figura 4b) 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/o 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 10^8 UFC/ml.

Por otro lado, los resultados del contenido de fósforo suelo (Figura 5b) 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 10^8 UFC/ml.

Potasio

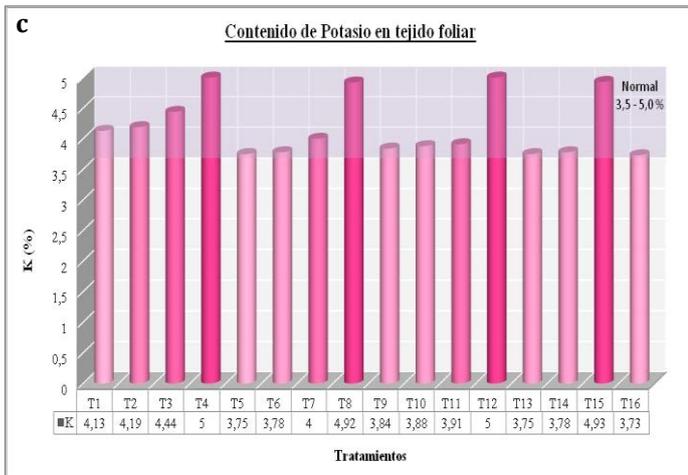
Los resultados del contenido de potasio en tejido foliar (Figura 4c) muestran que los valores de este elemento, se encuentran dentro del nivel normal tanto en plantas del grupo control como en aquellas que fueron inoculadas con HMA y/o con *Azospirillum* en sus diferentes concentraciones, además, se 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 10^8 UFC/ml de *Azospirillum*.

Los resultados del contenido de potasio en suelo (Figura 5c) 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 10^8 UFC/ml

Simbiosis y densidad poblacional

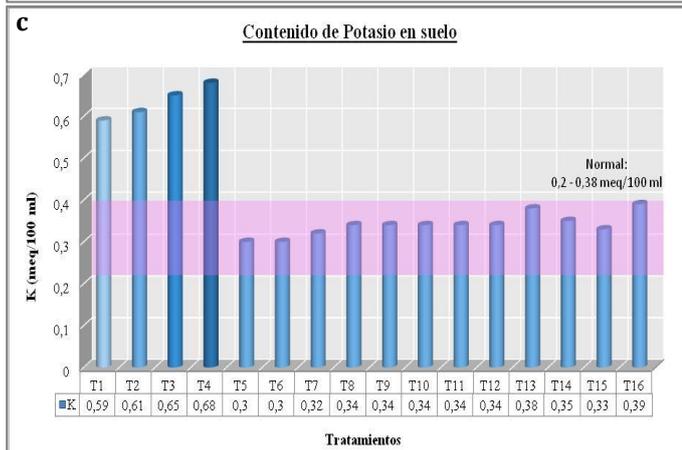
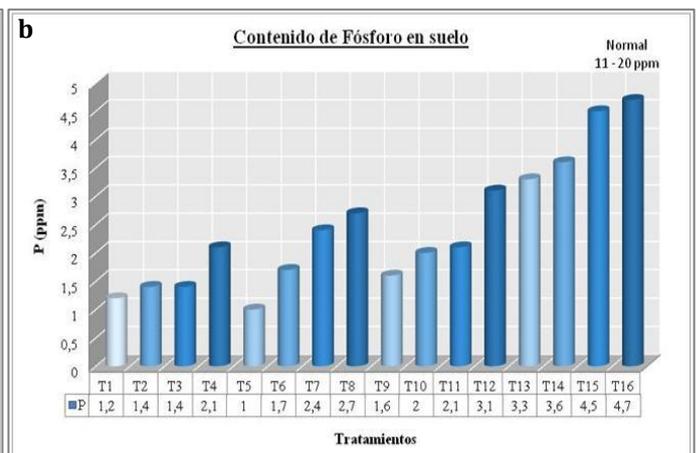
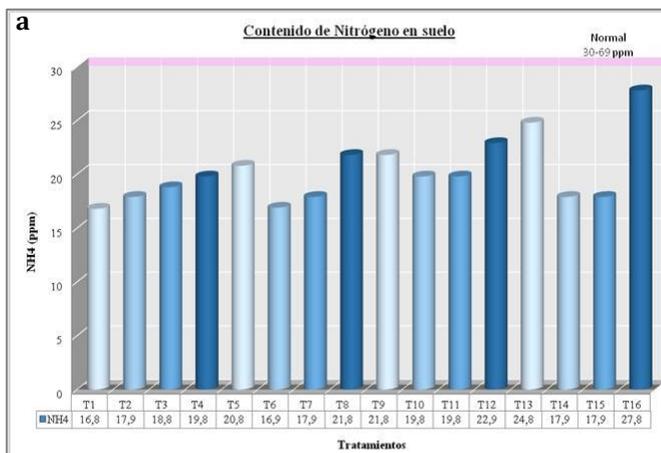
Población final de esporas de HMA

Tomando en cuenta las interacciones HMA-*Azospirillum* (Tabla 2), se observa que la mayor dosis de HMA (200 g) y la concentración más alta de la bacteria (10^8 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.



Tratamientos en dosis HMA (gramos) : concentración *Azospirillum* (UFC/ml); T1 (0:0), T2 (0:10⁶), T3 (0:10⁷), T4 (0:10⁸), T5 (50:0), T6 (50:10⁶), T7 (50:10⁷), T8 (50:10⁸), T9 (100:0), T10 (100:10⁶), T11 (100:10⁷), T12 (100:10⁸), T13 (200:0), T14 (200:10⁶), T15 (200:10⁷), T16 (200:10⁸).

Figura 4. Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el contenido de nutrientes en tejido foliar. a) Nitrógeno, b) Fósforo, c) Potasio



Tratamientos en dosis HMA (gramos) : concentración *Azospirillum* (UFC/ml); T1 (0:0), T2 (0:10⁶), T3 (0:10⁷), T4 (0:10⁸), T5 (50:0), T6 (50:10⁶), T7 (50:10⁷), T8 (50:10⁸), T9 (100:0), T10 (100:10⁶), T11 (100:10⁷), T12 (100:10⁸), T13 (200:0), T14 (200:10⁶), T15 (200:10⁷), T16 (200:10⁸).

Figura 5. Efecto de la inoculación de HMA y *Azospirillum* sobre el contenido de nutrientes en suelo. a) Nitrógeno, b) Fósforo, c) Potasio

Tabla 2. 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*

Dentro de la misma columna, datos con la misma letra no presentan diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de LSD Fisher al 5% ($p \leq 0.05$)

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 6).

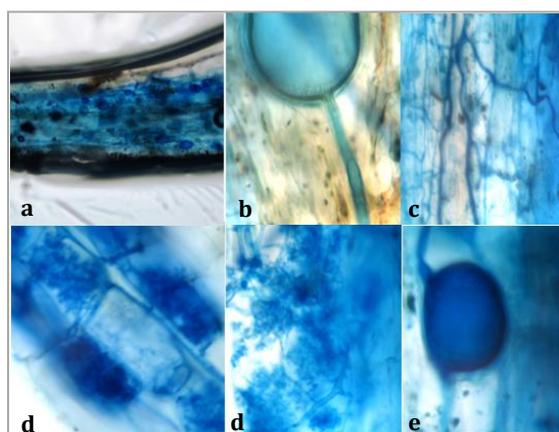


Figura 6. Estructuras de HMA encontradas en el interior de las raíces de banano. a) Raíz colonizada por HMA, b) Espora de HMA con su hifa de sustentación, c) Red de hifas infectivas, d) Arbusculos de HMA, e) Vesícula de HMA.

Al analizar el efecto de las diversas interacciones HMA-*Azospirillum* sobre la variable de respuesta en estudio (Tabla 3), se observa que los tratamientos que contienen las dosis más altas de HMA (100 y 200 g) y las mayores concentraciones de *Azospirillum* (10^7 y 10^8 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 10^8 UFC/ml de *Azospirillum* permite obtener el mayor porcentaje de infección micorrícica con un valor de 96,37%

Tabla 3. 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*

Dentro de la misma columna, datos con la misma letra no presentan diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de LSD Fisher al 5% ($p \leq 0.05$)

Población final de *Azospirillum*

En la Tabla 4 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 4. 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

Los resultados descritos 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). Los mecanismos de los HMA asociados al mayor crecimiento y desarrollo de las plantas de banano inoculadas con estos simbioses 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). Mientras

que por parte de *Azospirillum*, Bashan *et al* (1996) 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 el desarrollo y nutrición vegetal.

En base a ello se podría considerar que al combinarse los mecanismos de crecimiento de cada microorganismo se logra un importante efecto sobre el desarrollo de las plantas, la posible sinergia entre mecanismos de se basaría en 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).

Finalmente, el incremento de las poblaciones de ambos microorganismos evidencia una relación cooperativa 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* 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 micorrícica.

En resumen, no se observaron efectos negativos de los microorganismos aplicados sobre el desarrollo de las plántulas de banano, por el contrario la aplicación de HMA y *Azospirillum* favorecen el crecimiento y nutrición de estas durante su fase de aclimatación.

4. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que la aplicación de HMA y *Azospirillum* a razón de 200 g y 10⁸ UFC/ml respectivamente, permiten obtener el mayor crecimiento y nutrición en las plántulas de banano micropropagadas, llegando a registrarse incrementos 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, en relación a las plantas control.

Por otro lado, se observa que las poblaciones finales de ambos microorganismos son favorecidas por la co-inoculación de los mismos, alcanzando los mayores valores con las mayores dosis de cada uno lo que indica que la aplicación conjunta de HMA y *Azospirillum* favorecen la mutua supervivencia y multiplicación, así como benefician la colonización vegetal.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Dra. María Soledad Benítez Ponce (Duke University) y al Programa de Maíz del INIAP por su asesoría en parte de la investigación. El presente trabajo contó con el apoyo económico de HoldingDine S.A y la Escuela Politécnica del Ejército

REFERENCIAS

- 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. González, M.C. Villegas, A. (2000). Hongos Micorrícico 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.
- Barea, J. Pozo, J. Azcón, R. Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rizosphere. *J. Exp. Bot.* 56, 1761-1778.
- 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. Holguin, G. (1997b). Root-to-root travel of beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2120-2131.
- Bashan, Y. Holguín, G. Ferrera-Cerrato, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*. *Terra*, 14, 159-194.
- 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.
- 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.
- 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.
- Döbereiner, J. Marriel, I. Nery, M. (1976). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22, 1464-1473.
- 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.
- Herrera, R. Furrázola, E. Ferrer, R. Fernández, R. Torres, Y. (2004). Functional strategies of root hairs and Arbuscular micorrizhae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario-Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 35, 113-123.
- 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.

- Loredo, O. López, R. Espinosa, V. (2004). Revisión: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. Terra Latinoamericana, 22, 225-239.
- Maldonado, J. Ramírez, G. (1997). Efecto de la inoculación con hongos micorrizógenos en almácigos de café (*Coffea arábica*) Variedad Colombia.
- Okon, Y. Labandera-González, C. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biology and Biochemistry, 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.
- 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
- Russo, A. Felici, C. Toffanin, A. Götz, M. Collados, C. Barea, J. Moëgne-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.
- 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