Efecto de la interacción de hongos micorrícicos arbusculares y *Pseudomonas fluorescens* sobre el desarrollo y la nutrición de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) durante las primeras fases de crecimiento

Echeverría, E., Medina, ME y Ponce, K.
Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Departamento de Ciencias de la Vida.
Escuela Politécnica del Ejército
Sangolquí, Ecuador.

RESUMEN

En la presente investigación se utilizaron dos tipos diferentes de biofertilizantes (microorganismos nativos de tomate de árbol): uno constituido por un consorcio de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y otro formado por rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) *Pseudomonas fluorecens*. Al finalizar el ensayo (cuatro meses) se observó un mayor desarrollo vegetal en las plantas co-inoculadas con HMA y la cepa Z5P6 (en concentración de $6{,}0x10^8$UFC/ml) presentando un aumento en la altura de 1 vez, área foliar de 2 veces, biomasa aérea y peso radicular de 3 respecto a las plantas control. Tanto las plantas micorrizadas como las co-inoculadas (con HMA *y P.fluorescens* cepa Z5P6) mostraron una mayor absorción de los nutrientes: fósforo y nitrógeno en comparación con aquellas con inoculación simple de rizobacterias y los controles, probablemente debido a la capacidad que presentan los microorganismos para descomponer la materia orgánica, logrando movilidad y mayor asimilación de nutrientes.

ABSTRACT

In the present investigation it was used two different types of biofertilizers (native microorganisms of sweet tomato): one formed by a consortium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and other formed by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) *Pseudomonas fluorecens*. At the end of the test (four months) the results showed greater growth for co-inoculated plant with AMF and Z5P6 strain (at a concentration of 6.0 x108UFC/ml) showing a increase one time the height, twice the leaf area and three time the aerial biomass and root weight compared to control plants. Both mycorrhizal plants as co-inoculated (AMF and *P.fluorescens* Z5P6 strain) showed a greater absorption of nutrients: phosphorus and nitrogen compared with those with single inoculation of rhizobacteria and control group, probably, these results were due to the ability of microorganisms to decompose organic matter, achieving greater mobility and assimilation of nutrients.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate de árbol es una especie frutal de gran aceptación en el mercado nacional e internacional, por su calidad organoléptica y sus propiedades medicinales. Por ello, es necesario contribuir a mejorar la nutrición y desarrollo de este cultivo mediante el fortalecimiento de una agricultura sustentable, con el uso de microorganismos benéficos de la rizósfera, considerados biofetilizantes por ayudar a preservar la calidad ambiental y a la vez mejorar la calidad de vida.

Estos microorganismos del suelo son capaces de producir efectos beneficiosos en estadíos tempranos de las especies vegetales, mejorando el desarrollo de la biomasa de las raíces y brotes de la plantas, aumentando la germinación de plántulas, vigor, altura, contenido de nutrientes, presencia de clorofila, acelerando el tiempo de floración y brindando protección frente a fitopatógenos radicales (Saharan, B.S. & Nehra, V., 2011). Bajo este contexto en el ensayo se utilizaron un consorcio de hongos micorrícicos arbusculares y las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas *Pseudomonas fluorecens*, ya que son los protagonistas de diversas acciones benéficas para las plantas, destacando su aporte en la nutrición y protección vegetal (Jaizme y Rodríguez, 2008; Ferrera y Alarcón, 2001).

II. METODOLOGÍA

Se realizó muestreos en diferentes zonas de las provincias de Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua con cultivos de tomate de árbol semiorgánicos para el aislamiento de los HMA y de las rizobacterias *Pseudomonas fluorescens*.

Identificación y multiplicación de los HMA

Inicialmente para la identificación de las micorrizas se utilizó la técnica de tamizado húmedo y decantación propuesta por Gerdeman y Nicholson, 1963, modificada por Herrera *et al*., 2004 y para determinar el porcentaje de colonización micorrícica se aplicó la metodología de Phillips & Hayman, 1970. Se seleccionó el sitio de muestreo con mayor número de esporas, para su posterior multiplicación del inóculo de HMA en cultivos trampa de avena durante tres meses.

Identificación y selección de *Pseudomonas fluorescens*

Se estandarizó la técnica para aislar e identificar las rizobacterias en estudio. Para ello se realizó dos procesamientos, uno de raíces y otro de rizósfera. A partir de una solución madre se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-5}, de cada una se sembró por duplicado en cajas Petri con medio de cultivo Pseudomonas Isolation Agar, se incubaron a 28°C durante 24h. Se aislaron colonias de posibles *Pseudomonas* sp. y se inocularon por duplicado en cajas Petri con medio Agar Pseudomonas F. Se observó uno de cada duplicado de los cultivos bacterianos bajo una lámpara de luz UV (254nm) y se seleccionaron aquellas que presentaron fluorescencia. El otro duplicado se purificó en medio de cultivo Trypticase Soy Agar a fin de realizar la tinción Gram y una serie de pruebas bioquímicas según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey 2005, para identificar posibles

ejemplares de la especie en estudio *P. fluorescens.*

De los aislados identificados como *P. fluorescens*, se seleccionaron tres cepas para la aplicación en el ensayo, según su capacidad de solubilizar fosfato inorgánico (fosfato tricálcico) mediante una prueba cualitativa según el protocolo de Arvind G., *et al.,* 2007.

Mantenimiento del ensayo

El ensayo se desarrolló en un período de cuatro meses, inicialmente las plántulas de tomate de árbol fueron infectadas con 180g de inóculo (que contenía 655 esporas de HMA) quedando una disolución final de 1,09 esporas por gramo de suelo en cada maceta. Después de 30 días se colocaron las tres cepas de *P. fluorescens:* Z2P6, Z5P5 y Z5P6 en dos concentraciones $1.5x10^8$ y $6.0x10^8$UFC/ml, según el diseño experimental.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del desarrollo de las plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

Los resultados de las variables de crecimiento: altura, perímetro, área foliar, biomasa aérea y radical fueron analizados mediante ANOVA, utilizando una prueba de Tukey al 5% para la comparación de los promedios, a los 120 días del ensayo. De manera general se observa que los tratamientos en combinación de HMA y *P.fluorescens* y aquellos inoculados solamente con micorrizas presentan los mayores rangos de significancia, seguidos por los tratamientos con inoculación simple de rizobacterias que superan a las plantas control (sanas). (Tabla 1).

Como se muestra en la Tabla 1 y Figura 1, los valores promedios del tratamiento con la co-inoculación entre la cepa Z5P6 de *P.fluorescens* y el consorcio de HMA mejora la altura de las plantas de tomate de árbol, siendo estadísticamente diferente de los demás tratamientos del ensayo. Según Cuesta y otros (2004) esta respuesta positiva de las plantas a la inoculación dual disminuirá el periodo de estancia de la especie vegetal en vivero, además de producir plántulas de mejor calidad fisiológica. Similares resultados fueron obtenidos por este autor con la inoculación doble de *P.fluorescens* y *Glomus mosseae* en plantas forestales de *Swietenia macrophylla x mahagoni.*

Por su parte Staley y otros (1992) encontraron que al inocular *P.fluorescens* y HMA en plantas de alfalfa y trébol incrementaron en un 23% la altura de las especies respecto a las plantas control. Comparando los resultados de la altura en las plantas de tomate de árbol del presente ensayo, se logró un incremento de 1 vez con la aplicación dual en comparación con el tratamiento control.

Tabla 1. Efecto de la inoculación simple y combinada de los HMA y las cepas de *P.fluorescens* en concentraciones de $1.5x10^8$ y $6.0x10^8$ UFC/ml sobre el desarrollo del tomate de árbol.

Tratamientos	Altura (cm)	Área foliar (cm^2)	Biomasa aérea fresca (g)	Biomasa radical fresca (g)
M1_B3.2	18,70 a	65,88 a	12,07 a	8,93 a
M1_B3.1	18,41 ab	63,10 a	11,42 a	8,75 a
M1_B2.2	17,83 abc	56,90 a	11,00 a	8,52 a
M1_B2.1	17,14 abc	64,30 a	10,99 a	8,26 a
M1_B1.2	16,30 abc	61,26 a	10,92 ab	7,78 ab
M1_B1.1	15,46 c	57,40 a	10,34 ab	7,36 ab
M1_B0	16,10 bc	60,22 a	11,12 a	8,59 a
M0_B3.2	10,22 de	32,89 bc	6,71 c	4,20 cd
M0_B3.1	11,33 d	40,89 b	8,42 bc	5,69 bc
M0_B2.2	9,54 de	27,33 bc	6,14 c	4,30 c
M0_B2.1	10,31 de	28,67 bc	6,07 c	4,38 c
M0_B1.2	10,42 de	25,56 c	6,97 c	4,24 c
M0:B1.1	10,33 de	28,67 bc	6,73 c	4,52 c
M0_B0	8,57 e	19,42 c	3,32 d	1,99 d

M0= sin HMA, **B0=** sin bacterias, **M1=** con 1.09 esporas/g
B1.1= *P. fluorescens* Z2P6 en conc. $1.5x10^8$ UFC/ml, **B1.2=** *P. fluorescens* Z2P6 en conc. $6.0x10^8$ UFC/ml,
B2.1= *P. fluorescens* Z5P5 en conc. $1.5x10^8$ UFC/ml, **B2.2=** *P. fluorescens* Z5P5 en conc. $6.0x10^8$ UFC/ml,
B3.1= *P. fluorescens* Z5P6 en conc. $1.5x10^8$ UFC/ml, **B3.2=** *P. fluorescens Z5P6* en conc. $6.0x10^8$ UFC/ml.

Dentro de cada columna, letras idénticas son estadísticamente iguales según el test de Tukey ($p \leq 0.05$).

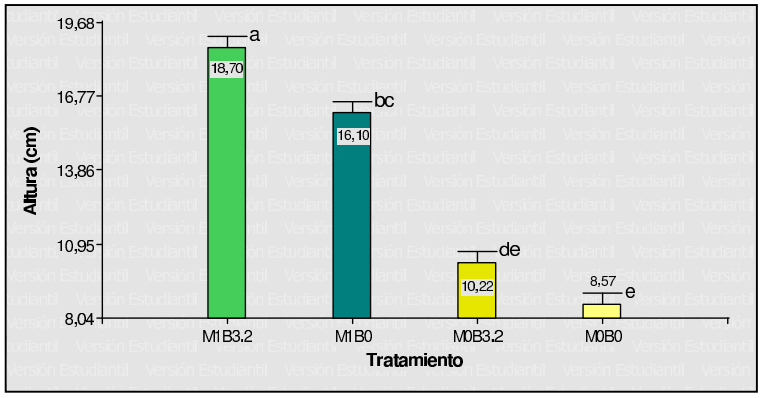

Figura 1. Efecto de la interacción simple y combinada entre los HMA y la cepa Z5P6 de *P.fluorescens* sobre la altura de las plantas de tomate de árbol.

Los valores promedios de la aplicación en conjunto de micorrizas y *P.fluorescens* y la inoculación simple de HMA presentaron el mismo nivel de significancia estadística en relación al área foliar (ver Tabla 1.) aunque numéricamente la co-inoculación supera la aplicación simple de los microorganismos, mostrando un incremento en el caso de la aplicación dual, siendo necesario realizar otros ensayos con mayor número de muestras para verificar si este incremento llega a ser significativo.

En la Figura 2 se observa que tanto la inoculación simple como la combinada entre los HMA y la cepa Z5P6 incrementan el área foliar en relación a las plantas control. Sin embargo, la respuesta a la inoculación simple con HMA y a la interacción entre los microorganismos no muestra diferencias significativas, no obstante, la co-inoculación mejora el desarrollo de las hojas.

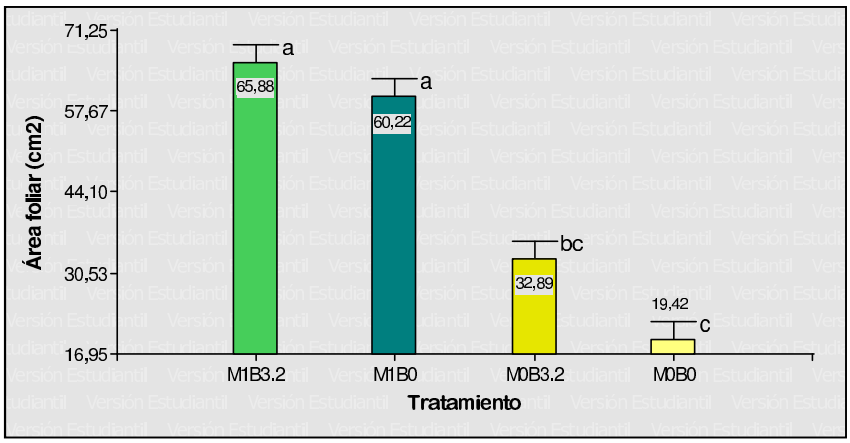

Figura 2. Efecto de la interacción entre los HMA y la cepa Z5P6 sobre el área foliar

Las plantas inoculadas con la combinación de HMA y *Pseudomonas fluorescens* presentan un valor promedio de la biomasa aérea y radicular estadísticamente igual al alcanzado por la aplicación simple de micorrizas, no obstante superiores a los tratamientos con la adición simple de rizobacterias y al control (ver Tabla 1. Figura 3). Similares resultados fueron obtenidos por Cuesta y colaboradores (2004) donde la co-inoculación HMA-bacterias y la inoculación exclusiva de micorrizas superan significativamente al testigo en peso seco de las plántulas de *Swietenia macrophylla x mahagoni.* Con estos resultados se evidencia que el consorcio de HMA y *P. fluorescens* aplicados sobre las plantas de tomate de árbol interviene beneficiosamente en el desarrollo de las plántulas, esto podría deberse a la síntesis de fitohormonas como las auxinas producidas tanto por las micorrizas como por las rizobacterias (Cuesta et. al, 2004).

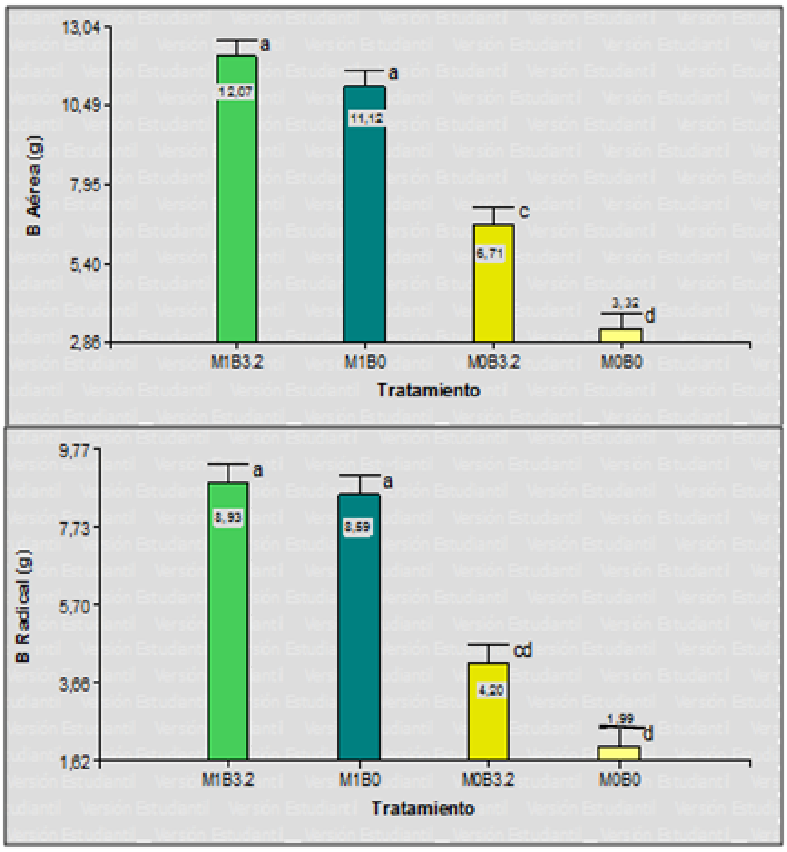

Figura 3. Efecto de la interacción entre HMA y cepa Z5P6 sobre la biomasa aérea y radical de las plantas de tomate de árbol.

Análisis de nutrientes a nivel foliar

En la Figura 4 se indica que la mayor absorción de fósforo se encontró en las plantas de tomate de árbol con inoculación dual de micorrizas y la cepa Z5P6 de *P. fluorescens* en comparación con la inoculación simple de rizobacterias. Estas diferencias sugieren que la co-inoculación contribuye a mejorar la absorción del mineral. Barea et. al, (1983) indica que la cooperación entre *P. fluorescens* (bacterias solubilizadoras de fosfato) y los HMA es muy provechosa, ya que el P liberado en el suelo por los primeros microorganismos serían absorbidos por los segundos, que posteriormente lo harán disponible para la planta. De esta manera utilizar estos microorganismos pueden llegar a sustituir a una gran cantidad de fertilizantes fosfatados, reduciendo considerablemente gastos energéticos y costos de producción agrícola (Raven, et. al, 1992).

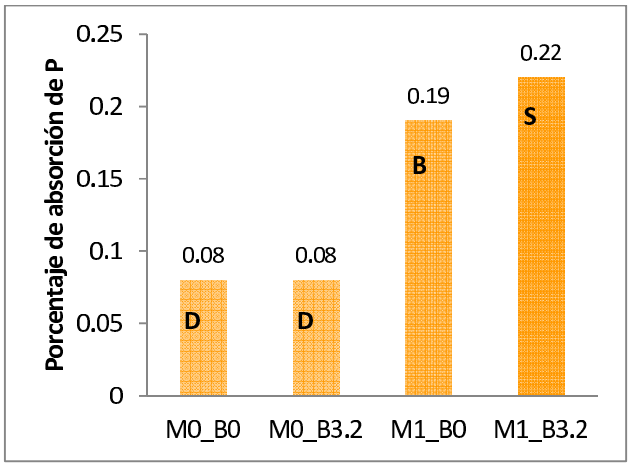

Figura 4. Efecto de la interacción entre los HMA y la cepa Z5P6 sobre la absorción de fósforo en las plantas de tomate de árbol.

La mayor absorción de nitrógeno se presentó en las plantas co-inoculadas con HMA y *Pseudomonas fluorescens* (ver Figura 5). Similares resultados fueron obtenidos con la inoculación doble entre *Glomus* sp. cepa Zac19 y *Pseudomonas aeruginosa* cepa 11PS, que mejoraron el contenido de nitrógeno en las plantas de alfalfa (Chamizo, A., *et al.*, 2009).

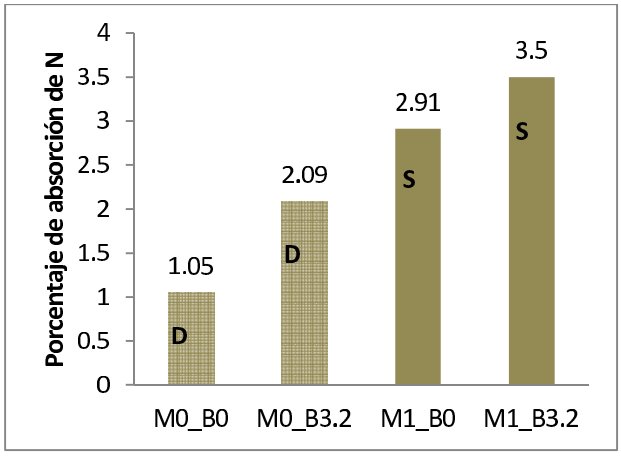

Figura 5. Efecto de la interacción entre los HMA y la cepa Z5P6 sobre la absorción de nitrógeno en las plantas de tomate de árbol.

IV. CONCLUSIONES

El porcentaje de supervivencia fue del 90% (126 plantas) de las cuales aquellas co-inoculadas con hongos micorrícicos arbusculares y la cepa Z5P6 de *P.fluorescens* (en concentración de $6{,}0x10^{8}$UFC/ml) presentaron el mejor crecimiento del tomate de árbol, aumentando la altura en 1 vez, área foliar en 2, biomasa aérea y peso radicular en 3 veces respecto los controles.

Las plantas micorrizadas y co-inoculadas con HMA *y P.fluorescens* cepa Z5P6 evidenciaron una mayor absorción de los nutrientes fósforo y nitrógeno, en contraste con las plantas control y aquellas con inoculación simple de rizobacterias, debido a la capacidad que presentan los microorganismos para descomponer la materia orgánica, logrando movilidad y mayor asimilación de nutrientes.

V. AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Politécnica del Ejército por el financiamiento en el proyecto ejecutado y al personal del Laboratorio de Microbiología del Suelo, CEINCI-ESPE.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Arvind G., Praveen, R. and Pratibha, V. (2007). Characterization of Phosphate-Solubilizing Fluorescent Pseudomonads from the Rhizosphere of Seabuckthorn Growing in the Cold Deserts of Himalayas. Curr Microbiol, 56:73–79.

- Barea, J. M.; Azcón, R., y Azcón-Aguilar, C. (1983). Interactions between phosphate solubilizing bacteria and VA mycorrhiza to improve plant utilization of rock phosphate in non acidic soils. 3rd International Congress on Phosphorus Compounds.

- Chamizo, A.; Ferrera-Cerrato, R.; González-Chávez, M. C.; Ortiz-Solorio, C. A.; Santizo- Rincón, J. A.; Varela, L. y Alarcón, A. (2009). Inoculación de alfalfa con hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias en dos tipos de suelo. TERRA Latinoamericana, Volúmen. 27, Número.3, p. 197-205.

- Cuesta I., Ferrer A. y Rengifo E. (2004). Importancia de la inoculación dual de bacterias y *Glomus mosseae* sobre crecimiento y micorrización de plántulas de *Swietenia macrophylla x Mahagoni*. Revista Forestal Baracoa, 23: p 67–72.

- Ferrera, R. y Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible, Ciencia Ergo Sum, 8: p175-183.

- Herrera-Peraza R, Furrazola E, Ferrer R, Fernández R. and Torres Y. (2004). Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario, Cuba. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 35: p113-123.

- Jaizme Vega M. C. y Rodríguez Romero, A. (2008) Integración de microorganismos benéficos (Hongos micorrícicos y Bacterias rizosféricas) en Agrosistemas de las Islas Canarias, Agroecología 3: 33-39.

- Phillips, J & Hayman D. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mychorrizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc 55: 158-161.

- Raven, Peter H., Evert Ray F y Eichhorn, Susan E. (1992). Biología de las plantas. Volumen 2. Capítulo 26, p 526-528. Editorial Reverté, S.A.

- Saharan, B.S. y Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research. LSMR-21.

- Staley, T.E., Lawrence, E.G., and Nance, E.L. (1992). Influence of a plant growtu-promoting pseudomonad and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on alfalfa an d birdsfoot trefoil growth and nodulation. Biology and Fertility of Soils, 14: p175-180.