

TÍTULO: IMPORTANCIA DE LA INOCULACIÓN DUAL DE BACTERIAS Y *GLOMUS MOSSEAE* SOBRE CRECIMIENTO Y MICORRIZACIÓN DE PLÁNTULAS DE *SWIETENIA MACROPHYLLA X MAHAGONI*.

AUTORES: LIC. IHOSVANNI CUESTA, LIC. ANAIRAD FERRER E ING. EMELINA RENGIFO.

RESUMEN

Se investigó la influencia de la aplicación de bacterias: *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* sobre el crecimiento y micorrización de posturas de *Swietenia macrophylla x mahagoni*. Se probaron los siguientes tratamientos:, *Glomus mosseae*, *Glomus mosseae* + *Bacillus subtilis*, *Glomus mosseae* + *Pseudomonas fluorescens* y testigo, para evaluar la altura, peso seco foliar, peso seco radical, Infección micorrizógena y cuantificación indirecta de micelio externo por agregación del suelo a la raíz. Se obtuvo que la aplicación de *Glomus mosseae* + *Bacillus subtilis* y *Glomus mosseae* + *Pseudomonas fluorescens* fueron los mejores tratamientos superando significativamente a la adición de *Glomus mosseae* y el testigo para todos los caracteres de crecimiento y el desarrollo del micelio externo.

INTRODUCCION

El término MICORRIZA define la relación mutualista existente entre determinados hongos del suelo y las raíces de las plantas superiores. Los hongos micorrizógenos arbusculares tienen su efecto más significativo sobre el crecimiento de las plantas en suelos con baja concentración de fósforo en la solución del suelo (Harley y Smith, 1983), lo cual se logra principalmente basado en :

Incremento de la rizosfera .

Incremento de la absorción de nutrientes.

Agregación del suelo.

Resistencia a situaciones climáticas de estrés.

Las interacciones entre los hongos micorrizógenos arbuscular (AM) y microorganismos del suelo: bacterias nitro fijadoras (Bagyaraj y Mengue, 1978, y Bethlenfalvay et al. ,1982) y bacterias fosfosolubilizadoras (Barea et al. ,1975, Manjunath et al, 1981) han sido ampliamente estudiadas.

Las bacterias constituyen los microorganismos más abundantes del suelo, formando poblaciones de más de 10^9 ufc (unidades formadoras de colonias) por gramo seco de suelo, de ahí la importancia de conocer y aplicar aquellas bacterias que producen estimulación en la formación de micorrizas, las cuales son llamadas Mycorrhiza Helper Bacteria (MHB). Se estima que las MHB estimulan esta simbiosis de las siguientes formas (Garbaye, 1994):

Efecto de MHB sobre la receptividad de las raíces.

Efecto de MHB sobre el crecimiento fúngico.

Efecto de MHB sobre la germinación de los propágulos micorrizógenos.

Modificación de la rizosfera por MHB.

Swietenia macrophylla x mahagoni es un importante híbrido que surge del resultado de la plantación de ambas especies en proximidad y fue descubierto en Puerto Rico en 1935 (Whitmore y Hinojosa, 1977). Nobles y Briscoe en 1966 plantean que el híbrido tiene mayor resistencia a drogas y mayor calidad de la madera que *Swietenia macrophylla*, así como un crecimiento más rápido en algunos sitios que *Swietenia macrophylla* y *Swietenia mahagoni* (Briscoe y Nobles, 1962; Lamb, 1966; Geary et al.,1972) y mejor forma que la última.

El objetivo del presente trabajo es valorar la influencia de las interacciones de *Glomus mosseae-Bacillus subtilis* y *Glomus mossseae-Pseudomonas fluorescens* sobre la micorrización e indicadores de crecimiento de las plántulas de *Swietenia macrophylla x mahagoni*,

MATERIALES Y METODOS

El experimento se desarrolló en el Instituto de Investigaciones Forestales y los tratamientos ensayados consistieron en:

Glomus mosseae

Glomus mosseae + *Bacillus subtilis*

Glomus mosseae + *Pseudomonas fluorescens*

Testigo

Donde cada uno de estos tratamientos contiene 4 réplicas con 20 plántulas cada una.

Las semillas de *Swietenia macrophylla x mahagoni* se sembraron en bolsas de polietileno (12 cm X 20. cm), en las cuales previamente se inoculó *Glomus mosseae* por medio de adición de 10g de suelo micorrizado (esporas , raíces micorrizadas y micelio); excepto para el testigo, donde se adicionó 10g de suelo estéril.

Las especies bacterianas que se aplicaron en el experimento, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, se obtuvieron del Cepario de la Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Dichas bacterias se sembraron en medio TSB 3% (Caldo Soya Triptona) y se incubaron a 37 °C por espacio de 48 h .Posteriormente se extrajo 1 ml de una solución de cada una de dichas bacterias con una concentración de 10⁸ ufc/ml.

Las plántulas de *Swietenia macrophylla x mahagoni* crecieron por espacio de 2 meses y al final de este período se evaluaron los indicadores de crecimiento y estado micotrófico de las plántulas:

Altura (cm).

Peso seco foliar (g)

Peso seco radical (g).

Infección micorrizógena (%) (por el método de Phillips and Hayman, 1970).

Cuantificación indirecta de micelio externo por agregación del suelo a la raíz (por el método de Graham et al, 1982)

Los resultados obtenidos se procesaron estadísticamente aplicando un ANOVA para Diseño Completamente Aleatorizado y Test de Rangos Múltiples de Duncan (5%) para la comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como se muestra en la tabla 1, los valores promedios obtenidos con los tratamientos constituidos por la inoculación hongo-bacterias y la inoculación exclusiva del hongo superan significativamente al testigo en altura y peso seco radical de las plántulas de *Swietenia macrophylla x mahagoni*. Comportamientos similares, pero con *Trifolium subterraneum* fueron obtenidos por Bagyaraj (1984), Meyer y Linderman (1986) y Oliveira et al (1987). Con relación al peso seco foliar el comportamiento de la inoculación hongo-bacterias fue significativamente superior a *Glomus mosseae* y al testigo.

La inoculación con *Glomus mosseae* produjo un incremento significativo en la altura y peso seco radical de las plántulas de *Swietenia macrophylla x mahagoni* con respecto al testigo, lo cual evidencia que esta especie de hongo micorrizógeno interviene beneficiosamente en el desarrollo de la plántula y esto podría deberse a la síntesis fúngica de fitohormona (auxina). Por otra parte los niveles alcanzados con la inoculación dual fueron significativamente más altos para los dos indicadores de crecimiento analizados, debido a que al parecer: (1) se obtiene mayor absorción por parte de *Glomus mosseae* del fósforo solubilizado por *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, quienes pertenecen a géneros fosfolubilizadores y (2) potenciación de la síntesis de auxinas, ya que estas bacterias también producen dichas hormonas, que son consideradas estimuladoras del crecimiento vegetal (Sieverding, 1991).

Resulta de gran importancia, el hecho de que los valores de altura alcanzados por las plántulas con inoculación dual dupliquen prácticamente el alcanzado por las posturas en el testigo. Esta positiva respuesta de las posturas de *Swietenia macrophylla x mahagoni* a la inoculación dual posibilitaría disminuir el período de estancia de esta especie en vivero, además de producir plántulas de más alta calidad fisiológica, que cuando es solamente inoculada por *Glomus mosseae*.

Como se muestra en la tabla 1 *Glomus mosseae* pese a que no produce por sí solo un nivel de peso seco foliar en las plántulas estadísticamente mayor que el alcanzado por el testigo, numéricamente sí supera al testigo, lo que muestra aunque de forma muy leve su efectividad para este indicador de crecimiento. Sin embargo las plántulas inoculadas con la combinación *Glomus mosseae-Bacillus subtilis* o *Glomus mosseae-Pseudomonas fluorescens*, presentan un valor promedio de peso seco foliar superior significativamente al alcanzado tanto con el testigo, como con la adición de *Glomus mosseae*, induciéndonos a pensar que estas bacterias incrementan la absorción de macroelementos como el nitrógeno y el fósforo, los cuales están estrechamente vinculados con el desarrollo y vigorosidad de las plantas. Este resultado coincide con lo mostrado por Meyer y Linderman (1986) y Oliveira et al (1987)

En la tabla 2 se aprecia que la inoculación hongo-bacterias y la inoculación de *Glomus mosseae*, tanto para la infección micorrizógena como para el suelo agregado a las raíces superan significativamente al testigo

Con relación a la cuantificación de la infección micorrizógena, se estimó que el 100 % de todas las raíces cortas estaban micorrizadas, para el 100% de las plántulas que se inocularon con *Glomus mosseae* y con *Glomus mosseae-bacterias*. lo que evidencia la afinidad de estos microorganismos con esta especie forestal

Al observar la cantidad de suelo que se agrega a las raíces, la cual nos da una medida del desarrollo del micelio externo en posturas micorrizadas, se puede observar que la cantidad de suelo adherido a las raíces al inocular *Glomus mosseae* supera significativamente al alcanzado por el testigo (suelo unido exclusivamente a las raíces), en donde se obtuvo prácticamente el cuádruplo de lo mostrado por el testigo, esto sugiere un buen desarrollo del micelio externo (estructura fúngica encargada de la absorción de nutrientes del suelo y agua hacia las raíces).

Por último, el hecho de que ambas combinaciones de hongo-bacteria muestren los valores significativamente más altos para la agregación del suelo a las raíces, al duplicar lo mostrado por *Glomus mosseae* nos confirma que las bacterias usadas en este experimento estimulan el desarrollo del micelio externo, lo que trae consigo una mayor disponibilidad de nutrientes a la plántula al encontrarse su sistema radical en contacto con un mayor volumen de suelo permitiéndole absorción de iones con baja velocidad de difusión como: el fósforo, el zinc y el molibdeno; y en baja concentración como el potasio, el azufre y el amonio.

CONCLUSIONES

Las plántulas de *Swietenia macrophylla x mahagoni* resultaron micorrizadas con la inoculación de *Glomus mosseae* y respondieron positivamente a la adicción conjunta de hongo micorrizógeno-bacteria: *Glomus mosseae-Bacillus subtilis* y *Glomus mosseae-Pseudomonas fluorescens*, en el sustrato donde se desarrollo la especie forestal hasta los tres meses de edad.

Se obtuvieron valores promedios más altos con la inoculación dual hongo-bacteria: *Glomus mosseae-Bacillus subtilis* y *Glomus mosseae-Pseudomonas fluorescens*, para todos los caracteres de crecimiento evaluados en las plántulas de la especie forestal.

Se observa una ligera superioridad en la altura y peso seco radical en presencia de *Glomus mosseae* con respecto al testigo y un comportamiento similar con relación al peso seco foliar.

Con relación a la cuantificación de la infección micorrizógena, se estimó que el 100 % de todas las raíces cortas estaban micorrizadas, para el 100% de las plántulas que se inocularon con *Glomus mosseae* y con *Glomus mosseae-bacterias*, lo que evidencia la afinidad de estos microorganismos con esta especie forestal.

La cantidad de suelo adherido a las raíces al inocular las combinaciones hongo-bacteria fueron estadísticamente iguales y significativamente superior al resto de los tratamientos. Además *Glomus mosseae* fue cuatro veces superior al testigo.

BIBLIOGRAFIA

- Bagyaraj D.J. and Mengue J.A. (1978): Interaction between a VA mycorrhiza and Azotobacter and their effects on rhizosphere microflora and plant growth. *New Phytologist* 80, 567-573.
- Bagyaraj D.J. (1984): Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. In: Powell C.L., and Bagyaraj D.J (eds) *VA Mycorrhiza*, 131-153, CRC Press, Boca Raton.
- Barea J.M., Azcon R. and Hayman D.S. (1975): Possible synergistic interactions between *Endogone* and phosphate-solubilizing bacteria in low-phosphate soils. In *Endomycorrhizas* (F.E. Sanders, B. Mosse and P.B. Tinker. (eds), 409-418. Academic Press, London.
- Bethlenfalvai G.J., Pacovoky R.S., Bayne H. G. and Stafford A.E. (1982): Interactions between nitrogen fixation, mycorrhizal colonization, and host-plant growth in the *Phaseolus-Rhizobium-Glomus* symbiosis. *Plant Physiology* 70, 446-450.
- Briscoe C.B. and Nobles R.W. (1962): Height growth of mahogany seedlings. U.S. Dep. Agric. For. Serv., Trop. Forest Note 13,2 p. U.S. Dep. Agric. For. Serv., Institute of Tropical Forestry, Río Piedras, P.R.
- Garbaye J. (1994): Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 128, 197-210.**
- Geary T.F., Nobles R.W. and Briscoe C.B. (1972): Hybrid mahogany recommended for planting in the Virgin Islands. U.S. Dep. Agric. For. Serv., Res. Pap. ITF-15, 4 p, U.S. Dep. Agric. For. Serv., Institute of Tropical Forestry, Río Piedras, P.R.
- Lamb F.B. (1966): *Mahogany of Tropical America*, 220 p, Univ. of Michigan Press, Ann Arbor.
- Manjunath A., Mohan R. and Bagyaraj D.J. (1981): Interaction between *Beijerinckia mobilis*, *Aspergillus niger* and *Glomus fasciculatus* and their effects on growth of onion. *New Phytologist* 87, 723-727.
- Meyer J.R. and Linderman R.G. (1986): Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*, *Soil Biology and Biochemistry* 18: 185-190.

- Nobles R.W. and Briscoe C.B. (1966): Height growth of mahogany seedlings. St Croix, Virgin Islands. U.S. Dep. Agric. For. Serv., Trop. Forest Note ITF-10, 4 p. U.S. Dep. Agric. For. Serv., Institute of Tropical Forestry, Río Piedras, P.R.
- Oliveira E., Sieverding E. and Toro T.S. (1987): Interaction between three species of VAM fungi and one isolate of *Pseudomonas putida* on casava. In: Sylvia D.M., Hung L.T. and Graham J.M.H. (eds) Mycorrhizae in the Next Decade, Practical Applications and Research Priorities, 216. Proceedings of the 7th NACOM, IFAS, University of Florida, Gainesville.
- Phillips J.M. and Hayman D.S. (1970): Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infecction. Trans. Br. mycol. Soc. 55, 158-161.
- Ross J.P. and Daniels B.A. (1982): Hyperparasitism of endomycorrhizal fungi. In: Methods and Principles of Mycorrhizal Research (N.C. Schenck, Ed.), 5-59. American Phyttopathological Society, St Paul, Minn.
- Sieverding E. (1991): Free-living bacteria of the rhizosphere In: Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. 69.
- Sutton J.C and Sheppard B.R (1976): Aggregation of sand-dune soil by endomycorrhizal fungi. Can. J. Bot.. 54.326-333.
- Whitmore J.L. and Hinojosa G. (1977): MAHOGANY (*Swietenia*) HYBRIDS. U.S. Dep. Agric. For. Serv., Res. Pap. ITF-23, 1 p, U.S. Dep. Agric. For. Serv., Institute of Tropical Forestry, Río Piedras, P.R Forest Service Research Paper

ANEXO

Tabla 1: Indicadores de crecimiento para las plántulas de *Swietenia macrophylla x mahagoni* a los 2 meses de edad.

Tratamiento	Altura (cm)	PSF (g)	PSR (g)
<i>Glomus mosseae</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	25.2 a	1.80 a	0.30 a
<i>Glomus mosseae</i> + <i>Pseudomonas fluorescens</i>	27.1 a	1.74 a	0.26 ab
<i>Glomus mosseae</i>	18.5 b	1.10 b	0.23 b
Testigo	12.5 c	0.90 b	0.14 c

Nota: Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente para Duncan (5%).

Tabla 2: Estado micotrófico de las plántulas de *Swietenia macrophylla x mahagoni* a los 2 meses de edad.

Tratamiento	Infección micorrizógena (%)	Suelo agregado a la raíz (g)
<i>Glomus mosseae</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	100 a	2.8 a
<i>Glomus mosseae</i> + <i>Pseudomonas fluorescens</i>	100 a	3.2 a
<i>Glomus mosseae</i>	100 a	1.5 b
Testigo	0 b	0.4 c

Nota: Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente para Duncan (5%).