

1. T. absoluto, 2. *G. mosseae* +0, 3. *G. fasciculatum* +0, 4. *G. clarum* +0, 5. *G. mosseae* +90, 6. *G. fasciculatum* +90, 7. *G. clarum* +90, 8. *G. mosseae* +120, 9. *G. fasciculatum* +120, 10. *G. clarum* +120, 11. T. Producción, 12. 90 ke N/ha. 13. 120 ke N/ha (DDT: Días después del trasplante). Letras comunes no difieren para $n < 0,001$

Figura 3. Influencia de las especies de HMA en la colonización rizosférica en ambos años.

El porcentaje de colonización encontrado en ese momento, puede deberse a la inducción temprana de las enzimas PR2, PR3 y fenilalanina amonio liasa en raíces de tomate (var. 'Amalia'), las cuales ayudan al avance del hongo en la raíz y por tanto al establecimiento temprano de la simbiosis (Pérez et al., 2004). Los tratamientos anteriormente mencionados, difieren a la vez de los restantes (1,2,3,4,11,12,13), correspondientes a la presencia de las micorrizas nativas y a las inoculaciones en ausencia de la fertilización nitrogenada.

Sin embargo, a los 30 días después del trasplante, se obtuvieron valores superiores de colonización y sobre todo de densidad visual, lo cual refleja con mayor claridad e intensidad la presencia del miceto y de hecho la propia eficiencia simbiótica, alcanzándose la mayor colonización (45%) con la especie *G. clarum*. Esta evaluación coincide con la plena etapa de simbiosis entre el hongo y la planta, donde según Bonfante-Fassolo y Perotto (1995), hay una explosión del crecimiento y desarrollo del vegetal, debido al aumento del volumen radical y a una mayor capacidad y eficiencia en la absorción, provocado por la presencia de hifas externas del hongo en las raíces colonizadas; el establecimiento del hongo representa una traslocación de fotosintatos desde la parte aérea hasta la zona radical, estableciéndose relaciones fisiológicas positivas entre la planta hospedera y el endófito bajo condiciones ambientales adecuadas. También, en este momento las plantas se encuentran en la plena etapa de floración - fructificación del cultivo, donde son altas sus demandas nutricionales y al coincidir con la mayor colonización del hongo, se logrará entonces una mejor relación simbiótica planta - HMA. A los 60 días después del trasplante, se aprecia que la población del hongo en los tratamientos inoculados comienza a declinar, coincidiendo esta evaluación con la etapa de senescencia del cultivo, momento en el cual se presenta la muerte y lignificación radical, además de ser mínimos los recursos nutricionales de las plantas producto a que está finalizando su ciclo biológico. El resultado obtenido en cuanto al nivel poblacional en los tres momentos de realizada las evaluaciones fue similar en el experimento realizado al año siguiente (1996). La baja población obtenida en los tratamientos no inoculados (TI, TI1, T12, T13), denota la necesidad de potenciar las poblaciones nativas de estos microorganismos mediante la inoculación artificial, esta técnica, según Augé (2000), resulta factible en situaciones específicas en que se desea alterar la composición y/o abundancia de las poblaciones de estos hongos en busca de un beneficio biológico particular. Con frecuencia, las poblaciones naturales de hongos micorrizógenos son insuficientes o ineficientes para el establecimiento de una buena simbiosis; en estos casos, la eficiencia de la micorriza puede ser incrementada ya sea por un manejo cultural de los hongos nativos, o por inoculación de hongos más eficientes y competitivos (Guerrero et al., 1996).

Valores similares de colonización fúngica han sido publicados por Cuevas (1998) y Pulido (2002), como resultados de pruebas de inoculación de cepas de probada eficiencia. A pesar del costo energético que representa para la planta la asociación, ésta parece tener carácter mutualista, dado a que el hongo obtiene carbohidratos y otras fuentes de carbono para su metabolismo, además de contar con un hábitat protegido de antagonistas en los tejidos corticales de la raíz y aún en la rizosfera (Morton y Redecker, 2001 y Martínez *et al.*, 2002).

De acuerdo a los resultados que aquí se presentan, se corrobora la efectividad de la inoculación como una vía para potenciar el efecto individual de los hongos micorrizógenos estudiados, lográndose una relación causa - efecto a partir de la respuesta agrobiológica obtenida sobre el crecimiento y desarrollo, producto de un alto porcentaje de colonización.

En la campaña de 1996, los resultados fueron completamente reproducibles, corroborándose la eficiencia de la especie *G. clarum* para el cultivo del tomate (variedad 'Amalia'). La aplicación conjunta de la inoculación y la dosis de 120 kg N.ha⁻¹ de fertilizante nitrogenado (que representa el 80% de la fertilización que requiere el cultivo), incrementó la eficiencia de la simbiosis con esta especie, lo cual se expresó en incrementos en la colonización micorrízica y el rendimiento (Figura 4), obteniéndose una dosis adecuada de fertilizante para lograr un exitoso funcionamiento micorrízico.

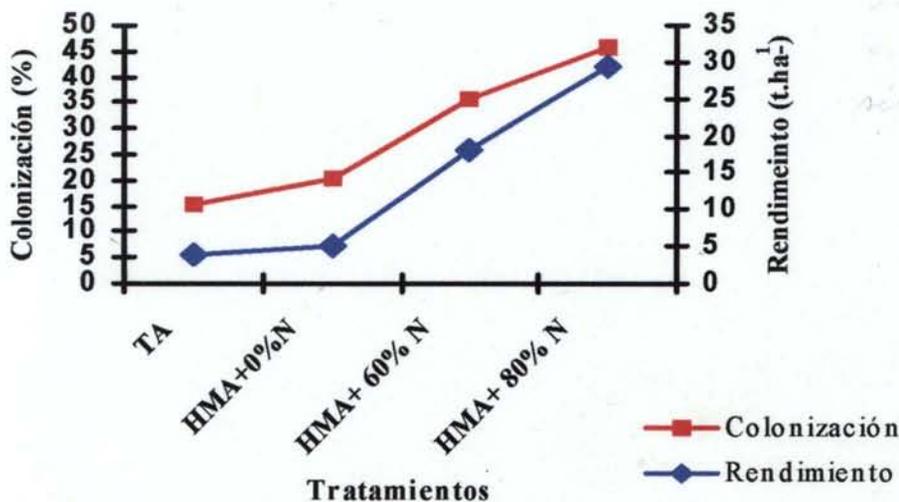


Figura 4. Influencia de los niveles de fertilización en la colonización rizosférica y el rendimiento agrícola.

En los resultados que se presentan, la dosis de 120 kg N.ha⁻¹, permitió que se lograra la simbiosis anteriormente referida; sin embargo, la inoculación de las especies con sólo la aplicación de 90 kg N.ha⁻¹, resultó ser una dosis insuficiente para potenciar el rendimiento del cultivo,

poniéndose de manifiesto la necesidad de un óptimo de nutrientes para que la simbiosis se exprese plenamente

Con la dosis de 90 kg N.ha⁻¹ (60% del fertilizante nitrogenado) para las plantas micorrizadas, fue menor la colonización micorrízica y por ende, la simbiosis y el rendimiento agrícola, lo que evidencia que el óptimo funcionamiento micorrízico se da cuando la planta recibe una adecuada cantidad de nutrientes. La inoculación de HMA en ausencia del portador nitrogenado (HMA + 0% N) superó al testigo absoluto, manifestándose en alguna medida el efecto de la micorrización en el rendimiento del cultivo.

Algunos autores como Hernández et al., (2001) y Sánchez (2001), han demostrado mediante análisis de correlaciones, la influencia directa de la inoculación con HMA en el rendimiento del tomate (variedad IIC 3880) y café, respectivamente.

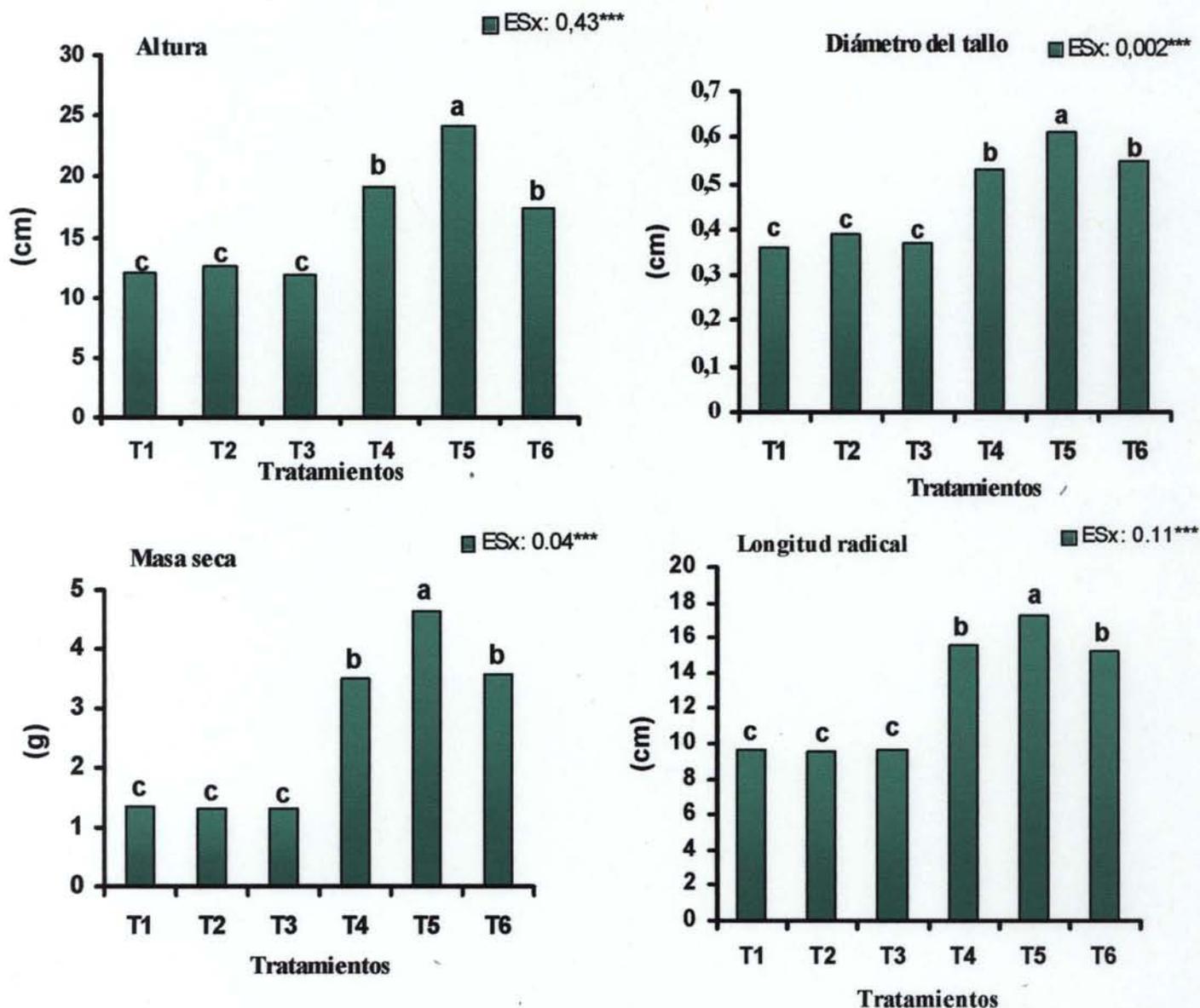
De esta manera, la respuesta del cultivo del tomate (var. 'Amalia') a la inoculación micorrízica, pone de manifiesto la acción positiva ejercida a partir de un alto porcentaje de colonización, lo que conllevó al efecto agrobiológico obtenido propiciando un estímulo en el rendimiento del cultivo y a una mayor eficiencia en la absorción de los nutrientes aportados con la fertilización mineral, lo que da una idea del éxito de esta asociación en la que ambos organismos se benefician mutuamente.

4.1.2. Evaluación y selección de diferentes especies de RPCV. Influencia en el crecimiento, rendimiento y colonización en el cultivo del tomate.

4.1.2.1. Efectos de diferentes especies de *Azospirillum* spp en el crecimiento de plántulas de tomate.

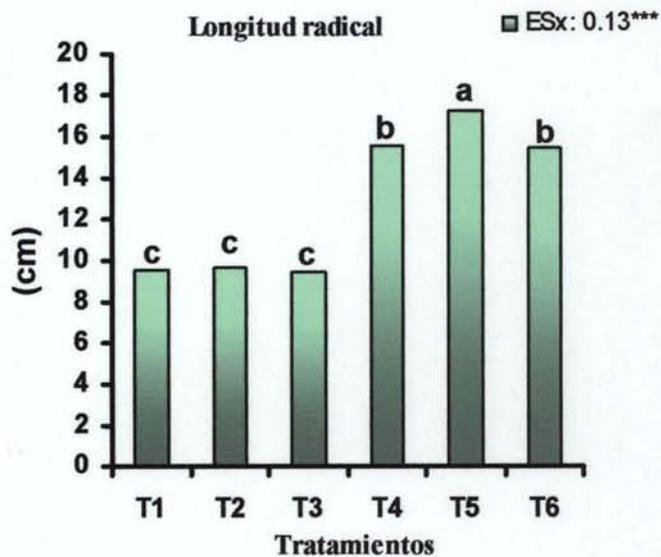
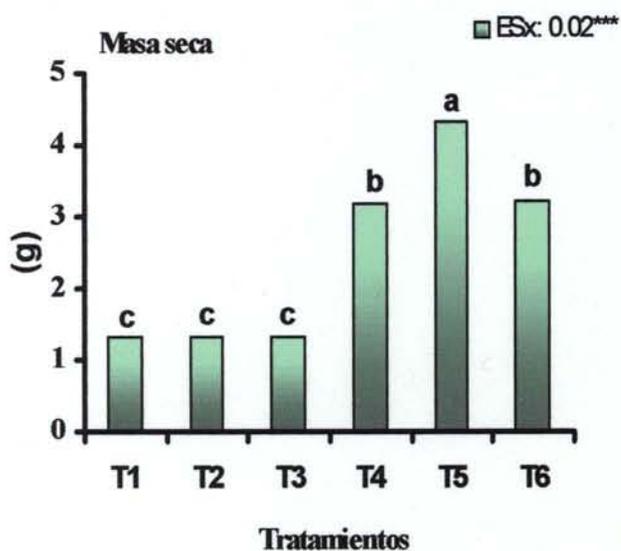
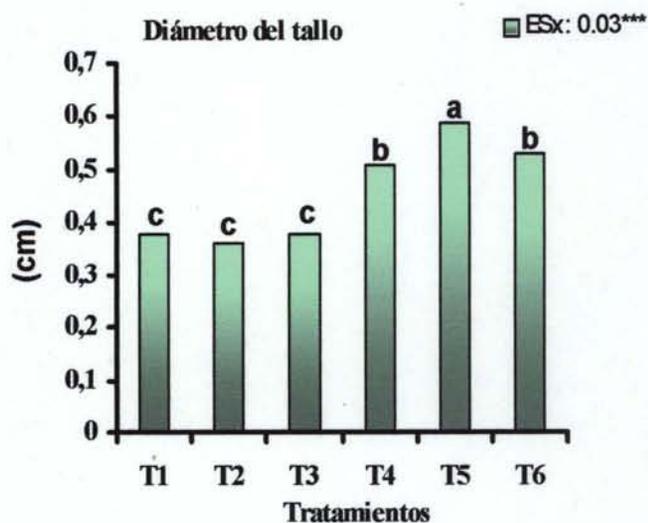
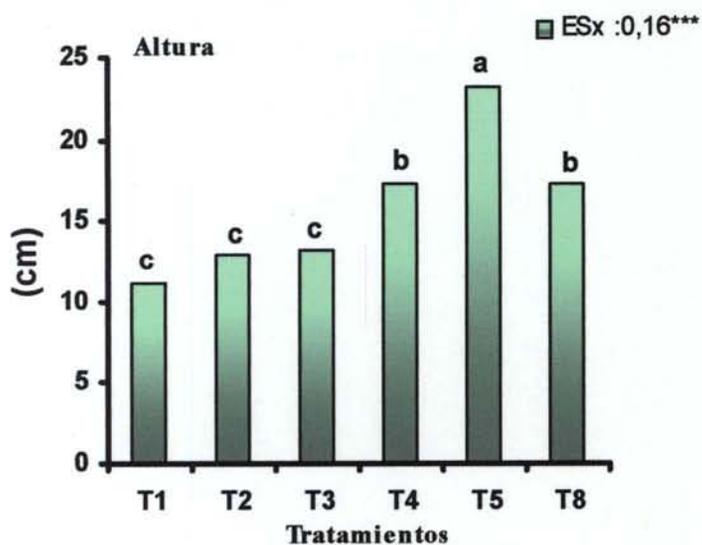
Hasta la fecha, existe información de microorganismos que aislados de diversos ecosistemas, son capaces de excretar sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, las cuales en pequeñas concentraciones, influyen sobre el metabolismo de las plantas, provocando variaciones en su crecimiento y desarrollo; entre ellas, las más conocidas son las fitohormonas, sustancias de elevada actividad biológica y que son producidas en gran medida por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Bashan, 1998b); entre ellas, el género *Azospirillum* sp es considerado un sistema modelo para el estudio de la asociación entre bacterias y plantas que no nodulan.

Los efectos de la inoculación de especies de *Azospirillum* spp sobre el crecimiento de las plántulas de tomate, fueron estudiados durante los años 1995 y 1996. En la Figura 5 (a y b) puede ser apreciado el comportamiento de algunas de las principales variables del crecimiento como son: altura, diámetro del tallo, masa seca de las plántulas y la longitud radical.



T1. Testigo Absoluto T2. *Azospirillum lipoferum* + 0 kg N/ha T3. *Azospirillum brasilense* + 0 kg N/ha T4. *Azospirillum lipoferum* + 30 kg N/ha T5. *Azospirillum brasilense* + 30 kg N/ha T6. Testigo de Producción (30 kg N/ha)

Figura 5 (a). Efectos de *Azospirillum* sp en el crecimiento de las plántulas (1995).
Medias con letras comunes no difieren significativamente según Duncan para $p < 0,001$



T1. Testigo Absoluto T2. *Azospirillum lipoferum* + 0 kg N/ha T3. *Azospirillum brasilense* + 0 kg N/ha
 T4. *Azospirillum lipoferum* + 30 kg N/ha T5. *Azospirillum brasilense* + 30 kg N/ha T6. Testigo de Producción
 (30 kg N/ha).

Figura 5 (b). Efectos de *Azospirillum* sp en el crecimiento de las plántulas (1996).
 Medias con letras comunes no difieren significativamente según Duncan para $p < 0.001$

De las dos especies estudiadas, *Azospirillum brasilense* manifestó el mejor comportamiento, al ser combinada con 30 kg N.ha⁻¹ en el momento de la siembra (T5), manifestando diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) respecto al tratamiento no inoculado (T6) que corresponde al testigo de producción, sobrepasando los valores establecidos para que una plántula sea trasplantada con adecuada calidad, (Cuba, MINAGRI, 1984). El comportamiento de este tratamiento respecto a las plantas testigo fue el siguiente: un incremento de la altura equivalente al 30 %, la longitud radical fue superior en un 26%, el diámetro del tallo un 17% y la masa seca por planta en un 38 %, como promedio de los dos años de realizadas las evaluaciones.

El mecanismo de acción mediante el cual *Azospirillum* sp promueve el crecimiento vegetal es aún un tema no bien dilucidado; al respecto Bashan y Levanony (1990) plantean, que posiblemente más de un mecanismo de acción está involucrado en la asociación y que estos operan simultáneamente o en sucesión. La suma de los diferentes mecanismos, reflejan los cambios observados en el crecimiento de las plantas, cuando son inducidos bajo condiciones ambientales propicias. Dentro de estos mecanismos se encuentran la producción de compuestos promotores del crecimiento vegetal, los cuales inducen un incremento en el número y longitud de los pelos radicales (Bacilio-Jinienez et al., 2001), a lo que se suma las contribuciones al aumento de la masa seca de las plantas, a través de la enzima nitrato reductasa, para una mejor asimilación de los nitratos presentes en el suelo, o por los aportados a través de la fertilización inorgánica (Fallik et al., 1994 y Van, 1998).

Por otra parte, se aprecia que en los tratamientos donde se realizó la inoculación en ausencia de la fertilización nitrogenada, no se obtuvo diferencias con respecto al testigo absoluto, lo que evidencia una presencia inactiva o que, bajo estas condiciones, las bacterias no logran sobrevivir, al menos en la cuantía necesaria para provocar un efecto positivo. Al respecto, Frioni (1990) citado por Rodríguez et al., (2000), plantearon que las bacterias del género *Azospirillum* sp son aerobios obligados e incapaces de crecer sin aire, a menos que se les aporte nitratos y una fuente de carbono orgánico necesario para su metabolismo.

Diferentes autores han encontrado respuesta positiva en el crecimiento de las plantas al inocular *Azospirillum* sp; así en la literatura existen trabajos publicados por Bashan et al., (1989) que en experimentos realizados con *Azospirillum brasilense* Cd, obtuvieron un incremento de la masa fresca y seca de plántulas de tomate y en la elongación de las raíces en otros cultivos. En Cuba, igualmente se han obtenido resultados positivos en cereales como trigo (Plana et al., 1999) y arroz (Pazos, 2000), además de la influencia positiva lograda en cultivos hortícolas como pepino (Calderón et al., 2000) y tomate para industria (Pulido, 2002).

La identificación de una asociación entre plantas y bacterias depende de la interacción que se logre entre ambas, donde exista el beneficio de al menos uno de los participantes. Se ha

demostrado que *Azospirillum* sp promueve el crecimiento de las plantas a través de la producción de fitohormonas las cuales tienen un efecto pronunciado sobre el crecimiento y desarrollo de las mismas (Perotti y Pidello, 1999).

Este resultado, en general expresa la especificidad entre los exudados radicales de esta variedad de tomate ('Amalia') y la rizobacteria *Azospirillum brasilense* (cepa Sp-7), a partir del estímulo provocado sobre el crecimiento de las plántulas, constituyendo un importante resultado desde el punto de vista práctico, para el manejo agronómico de esta variedad.

4.1.2.2. Influencia de las especies de *Azospirillum* spp en el rendimiento agrícola y algunos de sus componentes.

El efecto de *Azospirillum* sp con diferentes niveles de fertilización nitrogenada sobre el rendimiento agrícola del tomate y algunos de sus componentes durante los años 1995 y 1996, puede ser apreciado en la Tabla 12.

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) para ambas especies (*lipoferum* y *brasilense*) en los principales indicadores del rendimiento, así como entre los tratamientos analizados. Sin embargo, la fructificación, que es uno de los principales componentes del rendimiento del cultivo, para el tratamiento que corresponde al complemento con 120 kg N.ha⁻¹, ambas especies manifestaron un efecto positivo de su porcentaje, evidenciándose la contribución de estas rizobacterias en la formación de un mayor número de flores y frutos y mantener el porcentaje de fructificación.

Tabla 12. Efectos de *A. brasilense* en el rendimiento agrícola y algunos de sus componentes.

Tratamientos	Flores/planta (No.)		Frutos/planta No.		Fructificación %	
	1995	1996	1995	1996	1995	1996
1. Testigo absoluto (sin fertilizar)	3.85 g	3.86 f	2.53 e	2.55 f	66	66
2. <i>Azospirillum lipoferum</i> + 0 kg N.ha ⁻¹	5.50 f	5.37 e	3.70 e	3.39 f	67	63
3. <i>Azospirillum brasilense</i> + 0 kg N.ha ⁻¹	5.45 f	5.63 e	3.71 e	3.47 f	68	62
4. <i>Azospirillum lipoferum</i> + 90 kg N.ha ⁻¹	9.86 d	10.47 c	7.51 e	7.37 d,	76	70
5. <i>Azospirillum brasilense</i> + 90 kg N.ha ⁻¹	11.39 c	11.47 c	8.45 c	8.44 c	74	73
6. <i>Azospirillum lipoferum</i> + 120 kg N.ha ⁻¹	14.50 b	14.60 b	12.42 b	12.57 b	86	86
7. <i>Azospirillum brasilense</i> + 120 kg N.ha ⁻¹	16.56 a	16.44 a	14.44 a	13.63 a	87	83
8. 90 kg N.ha ⁻¹	7.63 e •	7.59 d	5.62 d	5.52 e	74	73
9. 120 kg N.ha ⁻¹	11.57 c	11.63 c	8.56 c	8.58 c	74	74
10. T. de Producción (150 kg N. ha ⁻¹)	17.57a	17.38a	13.66a	13.76a	78	79
ES x	0.44***	0.40***	0.39***	0.31 ***		

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Duncan para $p < 0.001$

Tratamientos	Masa Promedio / fruto		Rendimiento t.ha ⁻¹	
	1995	1996	1995	1996
1. Testigo absoluto (sin fertilizar)	65.43 h	64.41 h	3.67 a	3.65 g
2. <i>Azospirillum lipóferum</i> + 0 kg N.há ⁻¹	67.52 g	66.61 g	5.54 f	5.53 f
3. <i>Azospirillum brasilense</i> + 0 kg N.ha ⁻¹	68.46 g	67.71 f	5.74 f	5.77f
4. <i>Azospirillum lipóferum</i> + 90 kg N.ha ⁻¹	78.47 f	76.60 e	13.42 d	12.86 d
5. <i>Azospirillum brasilense</i> + 90 kg N.ha ⁻¹	80.42 e	80.52 d	15.76 e	15.71 e
6. <i>Azospirillum lipóferum</i> + 120 kg N.ha ⁻¹	90.59 a	91.56 a	26.14 b	26.80 b
7. <i>Azospirillum brasilense</i> +120 kg N. ha ⁻¹	87.50 e	88.45 c	29.16 a	28.37 a
8. 90 kg N.ha ⁻¹	81.58 d	80.64 d	10.31 e	10.03 e
9. 120 kg N.ha ⁻¹	78.65 f	79.66 d	15.81 e	15.73 e
10. T. de Producción (150 kg N.ha ⁻¹)	88.57 b	89.53 b	28.44 a	29.17 a
ES x	0.33***	0.36***	0.36	0.36***

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Duncan para $p < 0.001$

Esta variable del rendimiento fluctuó entre un 83-87% (T6 y T7), a diferencia del testigo de producción (T10) cuya cifra se enmarcó entre un 78 y 79%. Se pudo apreciar además, que en los restantes tratamientos, la fructificación del cultivo se redujo a un valor que osciló entre un 62 y 73%.

Sin embargo, resultaron muy claras las diferencias para el número de flores y frutos/planta en su comportamiento en ambos años, al presentarse diferencias significativas que favorecen a la especie *A. brasilense*, con particular eficiencia hacia la dosis de 120 kg N.ha⁻¹, respecto a la especie *lipóferum*. Los mayores rendimientos se alcanzaron con la especie *A. brasilense* (cepa Sp7) complementada con 120 kg N.ha⁻¹ (T7), con un rendimiento no diferente del testigo de producción donde fue empleada la dosis de 150 kg N.ha⁻¹ (T10), por lo que la inoculación de esta especie resultó ser más eficiente, permitiendo la disminución del 20% de la fertilización nitrogenada que requiere el cultivo, sin afectaciones en el rendimiento agrícola. Se demuestra como la inoculación potencia el rendimiento a partir del 86% de incremento (T7) con respecto al tratamiento testigo sin inocular e igualmente fertilizado con 120 kg. N.ha⁻¹ (T9).

Estos resultados, visualizados desde la fase de plántula, se traducen en procesos biológicos eficientes que estimulan el rendimiento, probándose así la efectividad de la rizobacteria *A. brasilense* inoculada en este cultivo (Figura 5).

Las razones por las cuales ocurre un efecto positivo en el rendimiento a partir de la inoculación de RPCV, parecen estar asociadas entre otras causas a lo planteado por Martínez (2001), quién ha indicado, que la producción de sustancias activas que son sintetizadas por las bacterias, provocan una activación de la fotosíntesis y la respiración, así como la acumulación de

fotosintatos, lo que hace que se incrementen los rendimientos agrícolas; sin embargo, tal aseveración debería ser probada mediante estudios específicos que consideren muy especialmente la fisiología del cultivo.

A este criterio, puede sumarse la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal secretadas por esta rizobacteria, las cuales propician un aumento de la superficie de absorción de las plantas y como consecuencia, ocurre un mayor desarrollo radical, lo que se traduce en una mejor nutrición y por tanto una mayor producción del cultivo.

Tanto las plantas inoculadas pero con ausencia del portador nitrogenado (T2 y T3), así como, los tratamientos donde sólo se aplicaron las dosis de 90 y 120 kg N.ha⁻¹ (T8 y T9), se obtuvieron los rendimientos más bajos, manifestándose como estos tratamientos, no permiten obtener la producción esperada de esta variedad en el período óptimo de siembra, lo que demuestra que no eran suficientes las reservas nutricionales del suelo de manera que le permitiera a las plantas nutrirse adecuadamente para finalmente tener una producción aceptable.

Por otra parte, las diferencias entre ambas especies parecen estar asociada a un mayor grado de afinidad entre los exudados radicales de las plantas y la rizobacteria *A. brasilense*, cuya quimiotaxis positiva permitió un resultado más favorable en la producción del cultivo.

El efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp sobre el rendimiento total, aumenta generalmente con el crecimiento de las plantas y está en un rango del 10 - 30% (Rodríguez *et al.*, 2000), estos autores refieren incrementos de un 25% para variedades de trigo de verano y consideran a la inoculación con esta rizobacteria como un sustituto parcial de la fertilización nitrogenada.

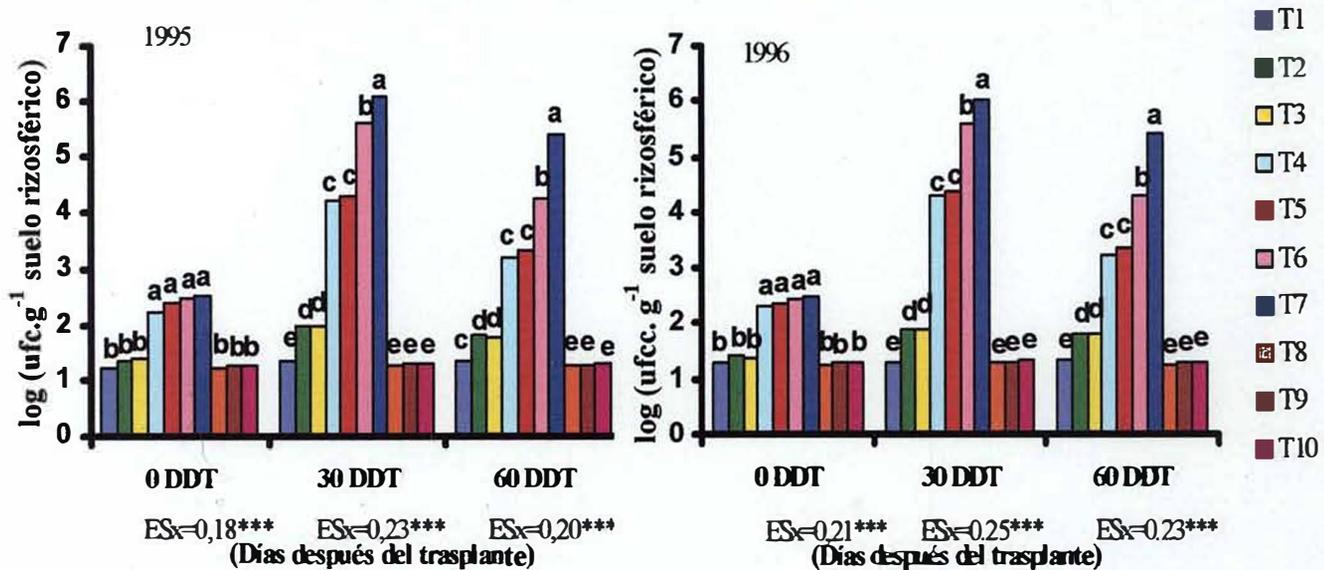
Tal comportamiento no parece ser específico para el tomate pues según trabajos publicados por Bashan (1998b) demuestran que además del tomate, otros cultivos como berenjena, pimiento y algodón han sido favorecidos sus rendimientos con inoculaciones de *Azospirillum brasilense*. A escala mundial la biofertilización con *Azospirillum* sp en gramíneas como trigo, arroz, cebada y pastos, produce incrementos en los rendimientos de hasta un 25%, permitiendo la disminución del fertilizante mineral.

Debe considerarse que *A. lipóferum* difirió estadísticamente de la especie *brasilense*, no obstante, por el comportamiento sobre el efecto agrobiológico del cultivo, puede ser valorada en otras investigaciones para profundizar en cuanto a su eficiencia en este cultivo u otro.

4.1.2.3. Evaluación de especies de *Azospirillum* spp en la rizosfera del cultivo.

Obtener una respuesta positiva a la inoculación bacteriana depende de que la población alcance una biomasa significativa en la raíz; por tanto, la característica más importante que debe tener una bacteria que se utilice con fines prácticos, es que sea un colonizador agresivo de las

raíces (Bashan, 2000). En este sentido, en la **Figura 6** se puede observar como en la evaluación realizada en el momento del trasplante de las plántulas (0 DDT), se aprecia que la mayor colonización se obtuvo en los tratamientos inoculados y suplementados con 30 kg N.ha⁻¹, difiriendo estadísticamente ($p < 0.001$) de los tratamientos inoculados en ausencia de la fertilización nitrogenada (T2 y T3), así como de los tratamientos donde se encuentra la población nativa del suelo (T1, T8, T9 y T10). A partir de los 30 días posteriores al trasplante y correspondiendo con la etapa de floración - fructificación del cultivo, se obtuvo que la especie *A. brasilense* (Sp-7) suplementada con 120 kg N.ha⁻¹ (T7), fue la que mayor colonización radical mostró en los dos años evaluados, con diferencias altamente significativas de los restantes tratamientos, alcanzando una población de 10⁶ ufc.g⁻¹ de suelo, lo cual puede ser considerado un valor óptimo, en un momento importante del desarrollo del cultivo donde son altas las necesidades nutricionales de las plantas para la formación de la producción final.



T1. Testigo absoluto T2. *A. lipoferum* + 0 kg N.ha⁻¹ T3. *A. brasilense* + 0 kg N.ha⁻¹ T4. *A. lipoferum* + 90 kg N.ha⁻¹ T5. *A. brasilense* + 90 kg N.ha⁻¹ T6. *A. lipoferum* + 120 kg N.ha⁻¹ T7. *A. brasilense* + 120 kg N.ha⁻¹ T8. 90 kg N.ha⁻¹ T9. 120 kg N.ha⁻¹ T10. T. de producción (150 kg N.ha⁻¹)

(Medias con letras iguales no difieren significativamente, según Duncan para $p < 0.001$)

Figura 6. Comportamiento de la colonización en la rizosfera del tomate, a los diferentes días después del trasplante (DDT).

En cambio, en la evaluación realizada a los 60 días del trasplante, la población de esta rizobacteria comienza a declinar, coincidiendo con la muerte de las plantas y de su sistema radical, el cual le aporta a estas bacterias constantemente gran número de sustancias orgánicas (azúcares y aminoácidos) en forma de exudados necesarios para su metabolismo.

La inoculación sin aplicación de fertilizante mineral (T2 y T3), en la evaluación realizada a los 30 y 60 DDT, mostró una ligera tendencia al incremento poblacional de esta bacteria en la rizosfera del cultivo en los estadios fisiológicos estudiados; no obstante, se demuestra la necesidad de un aporte inicial de fuentes nitrogenadas que le permitan disminuir su etapa de latencia, para lograr una mayor agresividad en el proceso de colonización.

La alta población encontrada (10⁸), en el tratamiento inoculado con *A. brasilense* +120 kg N.ha⁻¹, indica el grado positivo de quimiotaxis entre los exudados radicales y la bacteria. Al respecto, Velazco (2001) plantea que la presencia o no en la rizosfera de un cultivo conformando un ecosistema dado, está influido por diferentes factores abióticos como son el tipo de suelo, el grado de humedad, la fertilización aplicada y la temperatura. También influyen marcadamente la composición del hábitat como una unidad biológica de las relaciones microbianas que se establecen ya que puede existir afinidad o no, así como dependiendo de los exudados radicales existirá quimiotaxis positiva o negativa de las RPCV. Estudios realizados por Bashan y Mitiku (1991), demuestran que la población de esta rizobacteria en las raíces de tomate, está concentrada en la zona de elongación y pelos radicales, siendo esta última la de mayor concentración y que la colonización de las raíces es el factor clave en el éxito de la interacción de las plantas con *Azospirillum* sp; las especies de este género son conocidas por colonizar las superficies de las raíces de algunas especies de plantas (Basteau, 1998b), siendo esta interacción esencial para obtener una respuesta de las plantas a la presencia de la bacteria.

El hecho de que este resultado haya sido reproducible en el tiempo, explica el éxito de la inoculación lo que hace que se corrobore la eficiencia de *Azospirillum brasilense* como rizobacteria que estimula positivamente el crecimiento, desarrollo y rendimiento en el cultivo del tomate (var. 'Amalia') a partir de una alta colonización. Este resultado apoya el criterio de selección de esta especie como una alternativa eficiente, por lo que de acuerdo a los resultados alcanzados en la etapa de semillero y plantación, se seleccionó esta especie para dar continuidad a las investigaciones.

4.2. Evaluación de la coinoculación HMA - RPCV en el crecimiento, desarrollo, rendimiento y colonización en el cultivo del tomate (var. 'Amalia').

Una vez conocida la efectividad de las especies de *G. clarum* y *A. brasilense* en el estímulo del crecimiento de las plántulas de tomate en su primera etapa de desarrollo (semillero), así como su eficiencia a partir del efecto ejercido sobre la producción del cultivo en el período óptimo de siembra (plantación), se procedió a estudiar estos microorganismos en coinoculaciones, evaluándose la compatibilidad entre ellos así como la potencialidad y eficiencia

de su acción conjunta, sobre este cultivo, realizándose los experimentos en el período temprano y óptimo de siembra.

4.2.1. Evaluación de la coinoculación *Glomus clarum* + *Azospirillum brasilense* en plántulas de tomate.

Tomando como criterio de selección la mayor efectividad mostrada por las especies *G. clarum* y *A. brasilense* en el estímulo del rendimiento del cultivo, respecto a las restantes especies estudiadas; se evaluó la respuesta que sobre el crecimiento de las plántulas provoca la inoculación mixta de estos microorganismos. Por ser la altura una de las variables de crecimiento más práctica para ser medida *in situ*, se siguió una dinámica semanal durante los primeros 51 días posteriores a la germinación, en aras de conocer el momento preciso en que se alcanza el valor de la altura requerida por las plántulas para realizar el trasplante.

En la Figura 7, se observa que a los 10 días después de la germinación, no se presentan diferencias estadísticas entre los cuatro tratamientos evaluados; sin embargo, a partir de los 17 días, comienza a incrementarse la altura de las plántulas destacándose los tratamientos de inoculación simple con *A. hrasilense* y el tratamiento coinoculado, mostrando diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) con los restantes tratamientos.

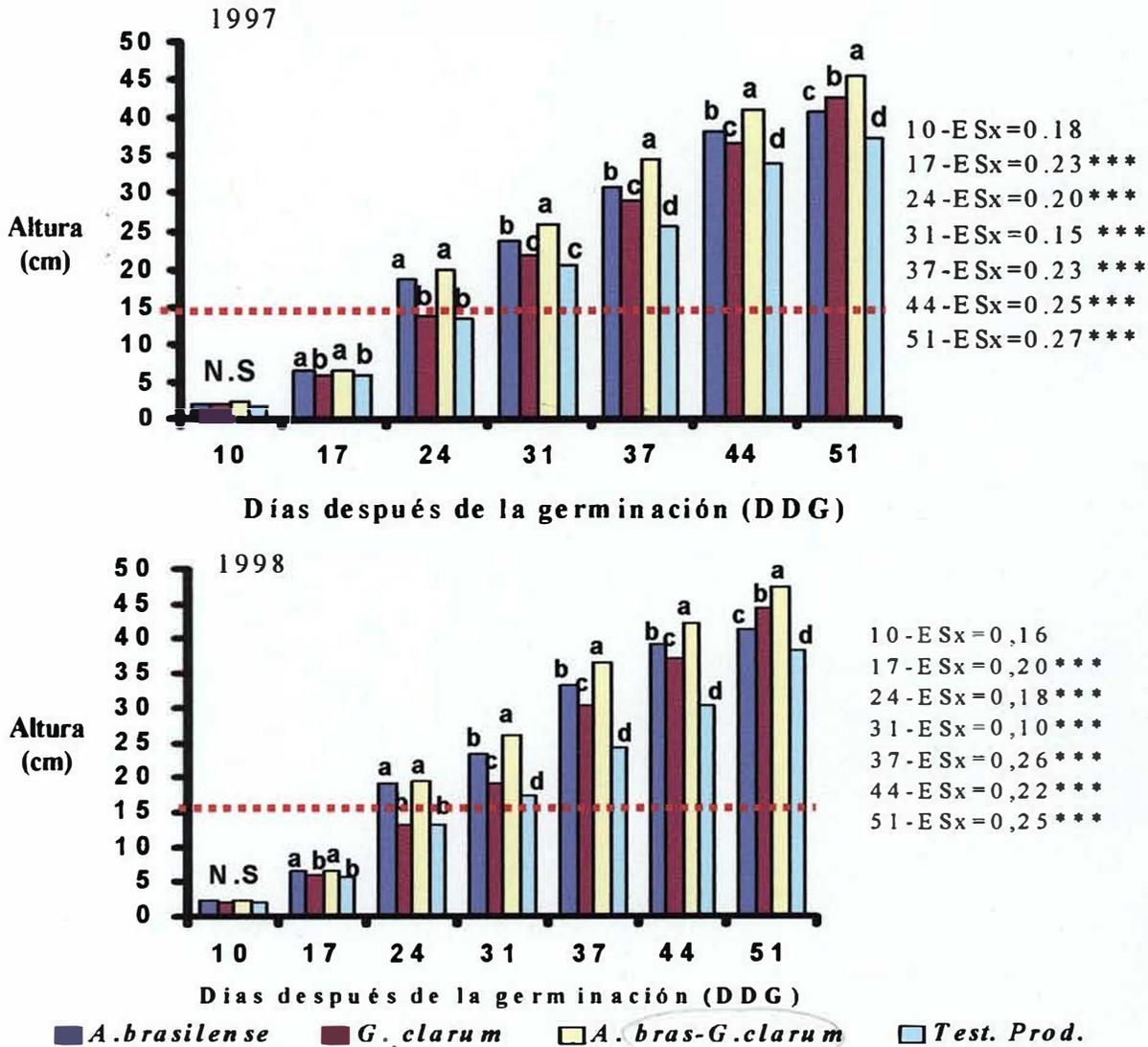
La altura de 15 cm, considerada la mínima requerida para el trasplante dentro de los parámetros de calidad (Cuba, MINAGRI, 1984) aproximadamente a los 25-30 días después de la germinación, fue sobrepasada en estos tratamientos, antes de los 24 días posteriores a la germinación (línea discontinua en el gráfico).

En cambio, no ocurrió así con los tratamientos de inoculación simple con *G. clarum* y el testigo de producción que aún, en ese momento de realizada la evaluación no rebasan los 15 cm de altura, llegando a sobrepasar este valor posterior a los 24 días después de la germinación. En el caso de la inoculación simple con *A. hrasilense*, se obtuvo un resultado similar al de los años 1995 y 1996, lo que permite corroborar la efectividad de esta rizobacteria en la fase de semillero del cultivo.

Se demuestra como la acción de los HMA es a mediano plazo y que el efecto de las RPCV es más rápido y evidente, ya que a partir de los 17 días después de la germinación, comienza a observarse su influencia positiva en la altura de las plantas. A partir de los 51 días, el tratamiento con HMA supera a la inoculación simple con la RPCV, donde supera el efecto en la altura de las plantas.

Para las evaluaciones siguientes (pasado los 24 días), el tratamiento coinoculado sigue siendo el que presentó la mayor altura en las plantas, diferenciándose estadísticamente de los restantes tratamientos, demostrándose de esta manera, la simbiosis mutualista entre ambos

microorganismos donde ambos se benefician a partir de que una especie puede proveer una fuente de energía y la otra aportar algún nutriente esencial.



(Medias con letras iguales no difieren significativamente, según Duncan para $p < 0.001$)

Figura 7. Dinámica de la altura de las plantas durante dos años.

De este resultado se deriva además, que existe una tendencia a acortar el período de semillero (6 días) tanto con la coinoculación *G. clarum* + *A. brasilense* o con sólo la inoculación simple de *A. brasilense*, constituyendo ambas variantes una alternativa para la producción de plántulas de tomate (var. 'Amalia'), en menor tiempo y con la calidad requerida que se exige en las normas técnicas del cultivo. Por otra parte, acortar el tiempo de semillero podría resultar un

ahorro de recursos en esta etapa del crecimiento y desarrollo del cultivo y quizás, también un adelanto de la cosecha y con ella la llegada más temprana de esta demandada hortaliza al mercado; sin embargo, esta hipótesis tendrá que ser demostrada en investigaciones específicas dirigidas especialmente al estudio de ese proceso, durante la etapa de plantación.

En el análisis de las variables de crecimiento, evaluadas simultáneamente en el semillero temporal, a los 30 días posteriores a la germinación (**Figura 8**), se observó que en cada año, tanto la altura, el diámetro del tallo, la longitud radical así como la masa seca de las plántulas, fueron estimuladas en el tratamiento de la inoculación dual de la rizobacteria *A. brasilense* con la micorriza *G. clarum* con una mayor efectividad. Bajo estas condiciones se lograron incrementos con respecto al testigo de producción de un 18-42% en la altura, un 27- 28% en el diámetro, un 51% en la longitud radical, de un 79-84%, en la masa seca de las plántulas; evidenciándose de esta manera la contribución de la coinoculación al estímulo del crecimiento, manifestado por el mayor porcentaje de incremento en la masa seca indicador de vital importancia para el crecimiento de las plantas.

No obstante, haciendo un análisis específicamente de la altura de las plántulas, la cual se evaluó en dos condiciones diferentes (macetas y semillero temporal), se observó que en ambas condiciones, la evaluación realizada a los 30 días posteriores a la germinación, tanto las plantas coinoculadas como las que recibieron la inoculación simple *A. brasilense*, sobrepasan el tamaño óptimo requerido para el trasplante (15-18 cm), permitiendo inferir que con estas variantes pueda reducirse el período de semillero, lo cual resultaría económicamente ventajoso.

Por otra parte, los incrementos que produjo la coinoculación con respecto a las inoculaciones individuales, en cada una de las variables de crecimiento que definen la calidad de las plántulas, a los 31 días posteriores a la germinación (Tabla 13), demuestran que la inoculación mixta superó los efectos de las inoculaciones simples de *G. clarum* y *A. brasilense*, propiciándose los mayores incrementos en la variable masa seca de las plántulas. Este resultado indica que el efecto individual de los microorganismos fue potenciado con la inoculación conjunta de ambos, funcionando exitosamente la trilogía simbiótica hongo - bacteria- planta. Por otra parte, la coinoculación con respecto a la inoculación con *A. brasilense* brindó los porcentajes más bajos con respecto a *G. clarum*, lo que evidencia el mayor efecto de esta rizobacteria en esta fase del crecimiento del cultivo.