

EFFECTO DE BIOFERTILIZANTES SOBRE LA TOLERANCIA DE BANANO A LA DESINFECCIÓN E INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS

Gabriela Sandoval-Cancino^{1,2*}; Leobardo Iracheta-Donjuan^{1,3};
Carlos Iván Cruz-Cárdenas^{1,2}; María de Lourdes Adriano-Anaya³;
Pablo López-Gómez¹; Alfredo Sandoval-Esquivel¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Rosario Izapa. km 18 carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico, Chiapas. MÉXICO. C.P. 30870. Tel. 01 (962) 110 0271.

Correo-e: g.sandoval.cancino@gmail.com (*Autor para correspondencia)

²Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43 Núm. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán. MÉXICO. C.P. 97200.

³Universidad Autónoma de Chiapas. Centro de Biociencias. Carretera a Puerto Madero km 2, Tapachula, Chiapas. MÉXICO. C.P. 30700

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de biofertilizantes y medios de cultivo sobre la tolerancia al establecimiento aséptico y la inducción de la organogénesis en banano. Se utilizaron explantes de hijuelos de dos genotipos de *Musa cavendish* AAA, cultivares 'Clon Francés' y 'Clon Oaxaqueño'. Se evaluaron tres aplicaciones de biofertilizante (1 g de *Glomus intraradices*, 1 ml de la bacteria diazotrófica 11B y la interacción de ambos microorganismos) y una sin biofertilizantes. Se sembraron los ápices en tres medios de cultivo: MS sin reguladores de crecimiento, MS adicionado con 22.2 µM de bencilaminopurina (BAP) y MS adicionado con 11.4 µM de ácido indolacético (AIA) y 22.2 µM de BAP. Se midieron las relaciones hídricas, el contenido de catalasa y peroxidasa, los explantes con brotes y los brotes por explante. En ambos clones se elevó la inducción de la organogénesis con la adición de BAP y por la biofertilización previa de los hijuelos. En el 'Clon Oaxaqueño' los tratamientos 6, 8 y 11 indujeron mayor organogénesis, con promedios entre 66 y 71 % de explantes con brotes y entre 3.16 y 2.28 brotes por explante. Para el 'Clon Francés' los tratamientos 8 y 9 elevaron la inducción de la organogénesis con promedios de 66 hasta 83 % de explantes con brotes y 1.83 a 2.16 brotes por explante. En ambos genotipos, los biofertilizantes propiciaron mayor porcentaje de supervivencia, mayor tolerancia a la oxidación y menor contaminación. En los dos genotipos, los tratamientos 1 (*Glomus intraradices*) y 4 (Testigo) produjeron menos estrés en las plantas.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Musa cavendish*, *Glomus intraradices*, diazótrofo, morfogénesis.

EFFECT OF BIOFERTILIZERS ON TOLERANCE OF BANANA TO DISINFECTION AND INDUCTION OF ORGANOGENESIS

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of biofertilizers and culture media on the tolerance to aseptic establishment and induction of organogenesis in banana tree. Explants from suckers of two genotypes of *Musa cavendish* AAA, cultivars 'French Clone' and 'Oaxaqueño Clone', were used. Three applications of biofertilizer were evaluated (1 g of *Glomus intraradices*, 1 ml of diazotrophic bacterium 11B and the interaction of both microorganisms) and one without biofertilizers. The apices were disinfected and sown in the three culture media: MS without growth regulators, MS added with 22.2 µM of indolacetic acid (IAA) and 22.2 µM of benzylaminopurine (BAP). Measurements were made of the water relations, the content of catalase and peroxidase, the explants with shoots and shoots per explant. In both clones the induction of organogenesis was increased with the addition of BAP and by previous biofertilization of the suckers. In the Oaxaqueño clone, treatments 6, 8 and 11 induced greater organogenesis, with averages between 66 and 71 % of explants with shoots and between 3.16 and 2.28 shoots per explant. For the French clone, treatments 8 and 9 increased the induction of organogenesis with the addition of BAP with averages of 66 to 83 % of explants with shoots and 1.83 to 2.16 shoots per explant. In both genotypes, the biofertilizers propitiated higher percentage of survival, higher tolerance to oxidation and less contamination. In the two genotypes, treatments 1 (*Glomus intradices*) and 4 (Control) produced less stress in the plants.

ADDITIONAL KEYWORDS: *Musa cavendish*, *Glomus intraradices*, diazotrophs, morphogenesis.

INTRODUCCIÓN

El banano (*Musa cavendish* AAA) es un cultivo de importancia en México y en el mundo. En la actualidad enfrenta múltiples problemas que impactan en los costos de producción, rendimiento y calidad del producto, lo cual genera pérdida de competitividad y, por lo tanto, de mercados (Rosales, 2008).

Para atender dicha problemática, se han desarrollado diversas alternativas, como el uso de genotipos con alto rendimiento, aunque se necesita gran cantidad de propágulos sanos de estos materiales. Para lograr esto último, el mejor método es la micropropagación de plantas por cultivo de tejidos vía organogénesis (García *et al.*, 2002; Peres *et al.*, 2008).

A pesar de los beneficios que presenta esta herramienta, existen factores que impiden la estandarización de un protocolo para la micropropagación de banano, tales como el genotipo, la tolerancia de los explantes al proceso de desinfección y a la inducción de brotes, así como un medio de cultivo inapropiado. Al no tener estos factores controlados, se promueve gran porcentaje de oxidación, contaminación y baja actividad morfogénica en los explantes (Canchignia *et al.*, 2008; Villegas *et al.*, 2008). Lo anterior también podría asociarse a las condiciones fisiológicas de las plantas madre en campo, por lo que el estado nutricional y de estrés en que se encuentren podrían afectar la respuesta morfogénica de los explantes.

Para atenuar el efecto de la falta de nutrientes y el estrés hídrico por sequía en plantas de banano, una alternativa es el uso de biofertilizantes, que se refiere al uso de microorganismos del suelo, como las micorrizas y las bacterias diazotróficas, para aumentar la disponibilidad y absorción de nutrientes minerales para las plantas (Vessey, 2003). Ambos tipos de microorganismos presentan múltiples beneficios para las plantas hospedero, como aumento en la eficiencia en la absorción de nutrientes y agua (Ramírez y Rodríguez, 2012) y protección a las raíces (Augé, 2004). El diazotrofo facilita el desarrollo de la raíz y del follaje. Dicha estimulación puede incluir la fijación de nitrógeno (Sessitsch *et al.*, 2002), la producción de enzimas tales como ACC de aminasa, la cual reduce la concentración de etileno en la planta sin retardar el crecimiento radicular (Mayak *et al.*, 2004), sideróforos (Aliasgharzad *et al.*, 2009; Aguado-Santacruz, *et al.*, 2012; Carson *et al.*, 2000) y solubilización de fosfatos (Roy-Bolduc y Hijri, 2010). Estos beneficios se reflejarían en mayor tolerancia del explante extraído del hijuelo ante la manipulación durante el establecimiento aséptico, debido a que estará en mejores condiciones nutrimentales y sin estrés hídrico.

Otro factor que influye en la respuesta morfogénica del explante son los componentes del medio de cultivo. Uno de éstos son las fitohormonas, como la bencilaminopurina y el ácido indolacético (García *et al.*, 2002; Canchignia *et al.*, 2008), así como los agentes antioxidantes adicio-

INTRODUCTION

Banana (*Musa Cavendish* AAA) is an important crop in Mexico and the world. Presently it faces multiple problems that have impact on production costs, yield and quality of the product, generating loss of competitiveness, and therefore, of markets (Rosales, 2008).

To attend these problems, diverse alternatives have been developed, such as the use of high yield genotypes, although a large quantity of healthy propagules of these materials is required. To achieve this amount, the best method is the micropropagation of plants by tissue culture via organogenesis (García *et al.*, 2002; Peres *et al.*, 2008).

Despite the benefits presented by this tool, there are factors that impede the standardization of a protocol for the micropropagation of banana, such as genotype, tolerance of the explants to the disinfection process and to shoot induction, as well as an appropriate culture medium. If these factors are not controlled, a great amount of oxidation is promoted, as well as contamination and low morphogenic activity in the explants (Canchignia *et al.*, 2008; Villegas *et al.*, 2008). The above could be associated with the physiological conditions of the mother plants in the field, thus the nutrimental state and of stress in which they are found could affect the morphological response of the explants.

In order to attenuate the lack of nutrients and water stress from drought in banana plants, one alternative is the use of biofertilizers, which refers to the use of soil microorganisms, such as the mycorrhizae and diazotrophic bacteria, to increase availability and absorption of mineral nutrients for the plants (Vessey, 2003). Both types of microorganisms present multiple benefits for the host plants, such as the increase of efficiency of absorption of nutrients and water (Ramírez and Rodríguez, 2012) and protection of roots (Augé, 2004). The diazotrophs facilitate the development of roots and foliage. This stimulation may include the fixing of nitrogen (Sessitsch *et al.*, 2002), production of enzymes such as ACC of aminase, which reduces the concentration of ethylene in the plant without delaying root growth (Mayak *et al.*, 2004), siderophores (Aliasgharzad *et al.*, 2009; Aguado-Santacruz *et al.*, 2012; Carson *et al.*, 2000) and solubilization of phosphates (Roy-Bolduc and Hijri, 2010). These benefits will be reflected in higher tolerance of the explants extracted from the sucker to manipulation during the aseptic establishment, due to the fact that it will be in better nutrimental conditions and without water stress.

Another factor that influences the morphological response of the explants are the components of the culture medium. Among these are the phytohormones, such as benzylaminopurine and indolacetic acid (García *et al.*, 2002; Canchignia *et al.*, 2008), as well as the antioxidant agents added to the culture medium, such as ascorbic acid (Sánchez-Cuevas and Salaverría, 2004).

nados al medio de cultivo, tales como el ácido ascórbico (Sánchez-Cuevas y Salaverría, 2004).

Ya que los biofertilizantes aportan diferentes beneficios, se considera que su uso en hijuelos de banano destinados al cultivo *in vitro* podría contribuir a mejorar la tolerancia a la desinfección e incrementar la respuesta morfogénica en las etapas de inducción de la organogénesis. Actualmente no hay estudios en cuanto a los beneficios del uso de biofertilizantes para el acondicionamiento de plantas madre destinadas a ser micropropagadas. Por esto resulta importante el estudio de la respuesta de los genotipos de interés a los microorganismos y a los diferentes componentes del medio de cultivo.

Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de biofertilizantes y componentes del medio de cultivo sobre la tolerancia a la desinfección y la inducción de la organogénesis en banano.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología e invernaderos del Campo Experimental Rosario Izapa (CERI), perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), situado en el municipio de Tuxtla Chico, Chiapas, México (14° 58' 28.97" N, 92° 09' 20.48" O, 443 msnm).

Material vegetal

Los explantes que se usaron provinieron de hijuelos en espada, cuya primera hoja aún no se ha desplegado pero ya es visible, pertenecientes a dos genotipos de *Musa cavendish* AAA: 'Clon Francés' y 'Clon Oaxaqueño'.

Recolección de hijuelos

Los hijuelos se obtuvieron de la plantación de banano y plátano establecida en el campo "Los Alpes", propiedad de la Asociación Agrícola de Productores de Plátano del Soconusco, Chiapas, México (14° 50' 12.29" N, 92° 19' 00.76" O, 61 msnm).

Los hijuelos colectados fueron de altura promedio de 58.8 cm y diámetro del pseudotallo de 4.3 cm (Figura 1a). El material vegetal se separó de la planta madre con un pala recta, enseguida se eliminó el exceso de tierra y se transportó al Laboratorio de Biotecnología del INIFAP.

Acondicionamiento de hijuelos

Se obtuvieron 80 hijuelos por genotipo, los cuales se sembraron en 1.5 kg de sustrato conformado por una mezcla esterilizada de suelo: turba de esfagno (v/v). Se usaron macetas previamente lavadas con agua y detergente líquido, que fueron posteriormente sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.2 % durante tres minutos, después de lo cual se dejaron secar.

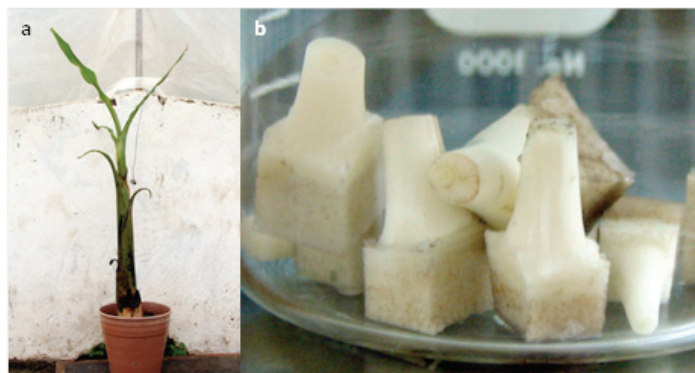


FIGURA 1. Hijuelos de banano. a) Hijuelo de espada establecido en sustrato de turba y b) ápice de plántula de banano desarrollada después de 30 días a partir de hijuelos de espada.

FIGURE 1. Suckers of banana. a) Tiller blade established in peat substrate and b) apex of banana shoot developed after 30 days from tiller shoots.

As the biofertilizers supply different benefits, it is considered that their use in banana suckers destined for *in vitro* cultivation could contribute to improving tolerance to disinfection and increasing the morphogenic response in the stages of induction of organogenesis. Presently, there are no studies with respect to the benefits of the use of biofertilizers for the conditioning of mother plants destined for micropropagation. Therefore, it is important to carry out studies of the response of the genotypes of interest to the microorganisms and the different components of the culture medium. The objective of the present study was to evaluate the effect of biofertilizers and components of the culture medium on tolerance to disinfection and induction of organogenesis in banana.

MATERIALS AND METHODS

The present investigation was carried out in the Biotechnology Laboratory and greenhouses of the Rosario Izapa Experimental Field (CERI), of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), located in the municipality of Tuxtla Chico, Chiapas, Mexico (14° 58' 28.97° N, 92° 09' 20.48° W, 443 masl).

Plant material

The explants that were used came from tiller blades, whose first leaf has still not unfolded but is already visible, belonging to two genotypes of *Musa Cavendish* AAA: 'French clone' and 'Oaxacan clone'.

Collection of suckers

The suckers were obtained from the banana and plantain plantation established in the "Los Alpes" field, property of the Agricultural Association of Banana Producers of the Soconusco, Chiapas, Mexico (14° 50' 12.29" N, 92° 19' 00.76" W, 61 masl).

The suckers collected had an average height of 58.8 cm and pseudostem diameter of 4.3 cm (Figure 1a). The plant

En el momento de la siembra, los hijuelos fueron inoculados de acuerdo a cuatro tratamientos previamente establecidos, los cuales consistieron en 1 g de *Glomus intraradices* (390 esporas·g⁻¹), 1 ml de la bacteria diazotrófica *Rhizobium* 11B (1x10⁶ células·ml⁻¹), la interacción de ambos microorganismos y la ausencia de biofertilizantes. Cabe mencionar que la concentración de esporas de *Glomus intraradices* del inóculo usado fue determinada mediante el conteo de esporas realizado según la metodología descrita por Gerdemann y Nicolson (1963). *Rhizobium* ha sido reportada por Vázquez-Ovando *et al.* (2012) como biofertilizante que aumenta la calidad sensorial y fisicoquímica en el banano en campo.

El acomodo de los tratamientos fue con base en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2 y 20 repeticiones por tratamiento para cada genotipo, tomando en cuenta que un hijuelo fue una repetición y la unidad experimental. Los hijuelos permanecieron en condiciones de invernadero durante un mes con una temperatura promedio de 32.8 °C y humedad relativa de 79.9 %. La humedad del sustrato se mantuvo a capacidad de campo de acuerdo al método gravimétrico.

Después de un mes se retiraron los hijuelos de la maceta con sustrato y se tomaron las muestras necesarias de raíz para la determinación del porcentaje de colonización tanto de hongo micorrízico *Glomus intraradices* como de bacteria diazotrófica 11B. También se tomaron muestras de hojas y raíces para la evaluación de las relaciones hídricas y la actividad de las catalasas y peroxidasas.

La colonización de *Glomus intraradices* se confirmó mediante el método de Giovannetti y Mosse (1960), para lo cual previamente se realizó la tinción de las raíces mediante la técnica de Phillips y Hayman (1970). En tanto, el nivel de colonización bacteriano (Bacteria diazotrófica 11B) interno de la raíz se determinó usando la técnica del número más probable de Döbereiner (1992).

Inducción de organogénesis

Después de que se tomaron las muestras para las evaluaciones en cada hijuelo, éstos se lavaron con agua para eliminar el sustrato adherido y se redujo su tamaño hasta que se obtuvieron hijuelos de 40 cm de alto y 30 cm de diámetro del cormo.

Posteriormente, se eliminaron las hojas que recubrían el ápice del hijuelo para obtener un explante inicial de 10 cm de alto y 5 cm de ancho (Figura 1b), el cual se colocó en una solución antioxidante/antifúngica (0.1 g de ácido ascórbico, 0.15 g de ácido cítrico, 30 g de sacarosa y 1 g de azoxystobin al 30 % por cada litro de solución). Enseguida, se lavó la base del explante con la ayuda de un cepillo dental de cerdas suaves y detergente líquido.

Luego se realizó otro corte, de tal manera que el explante tuviera 4 cm de alto y de 2 a 3 cm de ancho. Este

material was separated from the mother plant with a straight spade, then the excess earth was eliminated and was transported to the Biotechnology Laboratory of the INIFAP.

Conditioning of suckers

Eighty suckers were obtained per genotype, which were sown in 1.5 kg of substrate comprised of a sterilized soil mixture: sphagnum peat (v/v). Pots that had been previously washed with water and liquid detergent were used, which were later submerged in a solution of sodium hypochlorite (NaClO) at 1.2 % during three minutes, after which they were left to dry.

At the moment of sowing, the suckers were inoculated according to four previously established treatments, which consisted in 1 g of *Glomus intraradices* (390 spores·g⁻¹), 1 ml of the diazotrophic bacteria *Rhizobium* 11B (1x10⁶ cells·ml⁻¹), the interaction of both microorganisms and the absence of biofertilizers. It should be mentioned that the concentration of spores of *Glomus intraradices* of the inoculum used was determined through the use of spore count carried out according to the methodology described by Gerdemann and Nicolson (1963). *Rhizobium* has been reported by Vázquez-Ovando *et al.* (2012) as biofertilizer that increases the sensorial and physicochemical quality in the banana in the field.

The accommodation of the treatments was based on a completely randomized design with a factorial arrangement of 2 x 2 and 20 replicates per treatment for each genotype, considering that a sucker was a replicate and the experimental unit. The suckers remained under greenhouse conditions during one month with an average temperature of 32.8 °C and relative humidity of 79.9 %. The humidity of the substrate was maintained at field capacity according to the gravimetric method.

After one month the suckers were removed from the pot with substrate and the necessary samples were taken by the root to determine the percentage of colonization both of mycorrhizal *Glomus intraradices* and diazotrophic bacteria 11B. Samples of leaves and roots were also taken for the evaluation of the water relations and the activity of the catalases and peroxidases.

The colonization of *Glomus intraradices* was confirmed through the method of Giovannetti and Mosse (1960), for which the staining of the roots was previously carried out using the technique of Phillips and Hayman (1970). The level of internal bacterial colonization (Diazotrophic bacterium 11B) of the root was determined using the technique of the most probable number of Döbereiner (1992).

Induction of organogenesis

After the samples were taken for the evaluations in each sucker, they were washed with water to eliminate the adhered substrate and their size was reduced until suckers of 40 cm high and 30 cm of corm diameter were obtained.

explante se colocó en la solución antioxidante/antifúngica esterilizada y se le dio un tratamiento de ocho minutos en bomba de vacío.

Después del tratamiento anterior, el explante se desinfectó mediante su inmersión en una solución de NaClO al 4 % durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se enjuagó con agua destilada esterilizada y se realizó un corte adicional para obtener el explante final de 1 cm de alto y 0.8 cm de ancho. Este explante final se desinfectó nuevamente en una solución de NaClO al 4 % durante cinco minutos y se realizaron cuatro enjuagues con agua destilada esterilizada.

Con la finalidad de inducir la organogénesis, los explantes de los cuatro tratamientos de biofertilización se sembraron en tres medios de cultivo: medio MS (Murashige y Skoog, 1962; M1), medio MS adicionado con 22.2 μM de bencilaminopurina (BAP; M2) y medio MS adicionado con 11.4 μM de ácido indolacético (AIA) y 22.2 μM de BAP (M3). Cada medio base fue adicionado con 0.1 g·litro⁻¹ de inositol, 0.5 mg·litro⁻¹ de ácido nicotínico, piridoxina y tiamina, 2 mg·litro⁻¹ de glicina y 30 g·litro⁻¹ de sacarosa. En los tres medios de cultivo el pH se ajustó a 5.6.

Se tuvo un total de 12 tratamientos. Por cada uno de ellos se usaron entre seis y siete repeticiones, tomando en cuenta que un hijuelo representa una repetición. Los tratamientos se acomodaron de acuerdo a un diseño completamente al azar con arreglo factorial, y la incubación se llevó a cabo a 26 °C \pm 1 y 16 horas luz.

Evaluación

Después del proceso de desinfección de los hijuelos se evaluó el grado de oxidación, con base en el porcentaje de tejido necrosado que se observaba en los explantes finales, así como las relaciones hídricas (potencial hídrico, osmótico y de turgencia), de acuerdo con la metodología descrita por Chandler y Thorpe (1987) modificada durante el presente trabajo. Se tomaron muestras de aproximadamente 5 mm de diámetro de tejido vegetal (hoja o cormo), se colocaron en cámaras psicrométricas previamente calibradas y se dejaron estabilizar durante 30 minutos, después de lo cual se midió el potencial hídrico con la ayuda de un microvoltímetro, al cual estaban conectadas las cámaras psicrométricas. Las muestras se congelaron en viales durante 24 horas, después de lo cual se volvieron a colocar en las cámaras psicrométricas y se midió el potencial osmótico de la misma forma en que se midió el potencial hídrico.

De igual manera, antes de la desinfección se determinó la actividad de las enzimas de estrés peroxidadas y catalasas mediante el método colorimétrico de Kar y Mishra (1976). Para las determinaciones colorimétricas de ambas enzimas, las muestras de raíz y hoja se maceraron con nitrógeno líquido. De este macerado se tomaron 100 mg y se colocaron en tubos eppendorf. Para la determinación de catalasas, se agregó 1 ml de buffer HEPES pH 7.8 a las

Later, the leaves covering the apex of the sucker were removed in order to obtain an initial explant of 10 cm height and 5 cm width (Figure 1b), which was placed in an antioxidant/antifungal solution (0.1 g ascorbic acid, 0.15 g citric acid, 30 g saccharose and 1 g azoxystobin at 30 % for every liter of solution). Immediately afterwards, the base of the explants was washed with the aid of a soft bristle toothbrush and liquid detergent.

Later another cut was made, so that the explant had 4 cm height and 2 to 3 cm width. This explant was placed in the sterilized antioxidant/antifungal solution and it was given a treatment of eight minutes in a vacuum pump.

After the above treatment, the explant was disinfected by immersion in a solution of NaClO at 4% during 15 minutes. Then it was rinsed with sterilized distilled water and an additional cut was made to obtain the final explant of 1 cm height and 0.8 cm width. This final explant was disinfected again in a solution of NaClO at 4 % during five minutes and four rinses were made with sterilized distilled water.

In order to induce organogenesis, the explants of the four biofertilization treatments were sown in three culture mediums: MS medium (Murashige and Skoog, 1962; M1), MS medium added with 22.2 μM of benzylaminopurine (BAP; M2) and MS medium added with 11.4 μM of indolacetic acid (IAA) and 22.2 μM of BAP (M3). Each base medium was added with 0.1 g·liter⁻¹ of glycine and 30 g·liter⁻¹ of saccharose. In the three culture media the pH was adjusted to 5.6.

There were a total of 12 treatments. For each of them between six and seven replicates were used, considering that one sucker represents a replicate. The treatments were accommodated in a completely randomized design with factorial arrangement, and the incubation took place at 26 °C \pm 1 and 16 hours of light.

Evaluation

After the process of disinfection of the suckers, an evaluation was made of the degree of oxidation, based on the percentage of necrotic tissue observed in the final explants, as well as the water relations (water, osmotic and turgidity potential), according to the methodology described by Chandler and Thorpe (1987) modified during the present work. Samples were taken of approximately 5 mm of diameter of plant tissue (leaf or corm), were placed in psychrometric chambers that had been previously calibrated and left to stabilize during 30 minutes, after which the water potential was measured with the aid of a microvoltmeter, to which the psychrometric chambers were connected. The samples were frozen in vials during 24 hours, after which they were placed again in the psychrometric chambers and the osmotic potential was measured in the same form in which the water potential was measured.

Similarly, prior to disinfection the activity was determined of the stress enzymes of peroxidases and catalases

muestras ya mencionadas. Después, la mezcla se centrifugó a 11600 rpm durante 20 minutos. Se tomaron 100 µl del sobrenadante y se colocaron en tubo de ensayo, en el cual se agregaron previamente 1,900 µl de buffer HEPES pH 7.8. El resultado de lo anterior fue el extracto enzimático. En otro tubo se agregaron 1500 µl de buffer de fosfato sódico a 25 mM, pH 7 y 1500 µl de EDTA-Na 0.8 mM. Después, justo antes de medir la absorbancia de cada muestra, se agregaron 2 ml de H_2O_2 a 20 mM y 1 ml de extracto enzimático. Una vez que se midió la absorbancia, cada muestra se regresó al tubo de origen, el cual se colocó en el termoblock a 37 °C durante 30 minutos y se cubrió con papel aluminio. Ya que transcurrieron los 30 minutos, se volvió a leer cada muestra en el espectrofotómetro UV a 240 nm.

En el caso de las peroxidasas, a cada tubo que contenía muestra se le agregó 1 ml de buffer de fosfato de potasio a 100 mM y pH 6.8. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 12,600 rpm durante 15 min; luego se tomaron 100 µl del sobrenadante y se agregaron en un tubo de ensayo con 1,900 µl de buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.8. Esto correspondió al extracto enzimático. Posteriormente en otro tubo eppendorf se agregaron 1,350 µl de agua destilada, 125 µl de buffer de fosfato de potasio a 100 mM y pH 6.8, 25 µl de H_2O_2 al 30 % (v/v), 500 µl de pirogalol y 500 µl de extracto enzimático. Se agitaron los tubos durante 10 minutos y se detuvo la reacción agregando 250 µl de H_2SO_4 al 5 % (v/v) justo antes de leer en el espectrofotómetro a 420 nm.

Después del establecimiento aséptico y la desinfección de los explantes, así como a los 3, 10, 20, 30, 40 y 60 días, se evaluó la supervivencia, la cual consistió en el número de explantes turgentes y con actividad morfogénica después de los 60 días, el grado de oxidación y el porcentaje de contaminación. De igual forma, a los 30 y 60 días se evaluó el número de explantes con brotes y número de brotes por explante. A los 30 días se realizó un subcultivo en medio de cultivo fresco de los explantes no contaminados y a los 60 días se evaluaron nuevamente las relaciones hídricas.

Para el procesamiento estadístico de los datos se hicieron análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el programa estadístico SAS 6.12.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ápices del 'Clon Oaxaqueño', una vez establecidos *in vitro* e incubados durante 60 días, presentaron diferencias significativas para las variables de número de explantes con brotes y número de brotes por explante. En el caso del 'Clon Francés' se observaron diferencias significativas en supervivencia, oxidación, contaminación y número de explantes con brotes (Cuadro 1). Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre tratamientos para las variables de supervivencia, oxidación y contaminación en el caso del 'Clon Oaxaqueño'. Para la variable número de brotes por explante no

using the colorimetric method of Kar and Mishra (1976). For the colorimetric determinations of both enzymes, the samples of root and leaf were macerated with liquid nitrogen. From this macerate, 100 mg were taken and placed in Eppendorf tubes. For the determination of catalases, 1 ml of HEPES buffer pH 7.8 was added to the previously mentioned samples. Then, the mixture was centrifuged at 11600 rpm during 20 minutes. 100 µl of the supernatant were taken and placed in a test tube, to which 1,900 µl of HEPES buffer pH 7.8 had been previously added. The result of the above was the enzymatic extract. In another tube 1500 µl of sodium phosphate buffer were added to 25 mM, pH 7 and 1500 µl of EDTA-Na 0.8 Mm. Afterwards, just before measuring the absorbance of each sample, 2 ml of H_2O_2 at 20 mM and 1 ml of enzymatic extract were added. Once the absorbance had been measured, each sample was returned to the original tube, which was placed in the thermoblock at 37 °C during 30 minutes and covered with aluminum foil. After 30 minutes, each sample was read again in the UV spectrophotometer at 240 nm.

In the case of the peroxidases, to each tube containing sample 1 ml of potassium phosphate buffer at 100mM and pH 6.8 was added. Afterwards the tubes were centrifuged at 12,600 rpm during 15 minutes; then 100 µl of the supernatant were taken and were added in a test tube with 1,900 µl of potassium phosphate buffer 100 mM pH 6.8. This corresponded to the enzymatic extract. Later in another Eppendorf tube 1,350 µl of distilled water were added, along with 125 µl of potassium phosphate buffer at 100 mM and pH 6.8, 25 µl of H_2O_2 at 30 % (v/v), 500 µl of pirogalol and 500 µl of enzymatic extract. The tubes were agitated during 10 minutes and the reaction was detained adding 250 µl of H_2SO_4 at 5% (v/v) just before reading in the spectrophotometer at 420 nm.

After the aseptic establishment and disinfection of the explants, and at 3, 10, 20, 30, 40 and 60 days, survival was evaluated, which consisted of the number of turgid explants and with morphogenic activity after the 60 days, the degree of oxidation and the percentage of contamination. Similarly, at 30 and 60 days an evaluation was made of the number of explants with shoots and number of shoots per explants. At 30 days a subculture was made in fresh culture medium of the uncontaminated explants and at 60 days the water relations were evaluated again.

For the statistical processing of the data an analysis of variance was made along with the Tukey comparison of means ($P \leq 0.05$) using the SAS 6.12 statistical program.

RESULTS AND DISCUSSION

The apices of 'Oaxaqueño clone', once established *in vitro* and incubated during 60 days, presented significant differences for the variables of number of explants with shoot and number of shoots per explant. In the case of 'French clone', significant differences were observed in

hubo diferencias significativas en el 'Clon Francés' cuando se hizo el análisis de varianza. Sin embargo, con estadística no paramétrica (Kruskal-Wallis), el número de brotes por explante sí registró diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($Pr \geq \chi^2 = 0.01$).

En el caso del número de explantes con brotes y el número de brotes por explante, los tratamientos 3, 6, 8 y

survival, oxidation, contamination and number of explants with shoots (Table 1). On the other hand, there were no significant differences between treatments for the variables of survival, oxidation and contamination in the case of 'Oaxaqueño clone'. For the variable number of shoots per explant, there were no significant differences in the 'French clone' when the analysis of variance was made. However, with non-parametric statistics (Kruskal-Wallis), the number

CUADRO 1. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre ápices del 'Clon Oaxaqueño' y del 'Clon Francés' provenientes de hijuelos inoculados con diversos biofertilizantes a los 60 días después del establecimiento *in vitro*. Valores promedio de 6 a 7 repeticiones por tratamiento.

TABLE 1. Effect of different culture media on apices of 'Oaxaqueño clone' and of 'French clone' from suckers inoculated with diverse biofertilizers 60 days after the establishment *in vitro*. Average values of 6 to 7 replicates per treatment.

Genotipo / Genotype	Tratamiento / Treatment	Supervivencia / Survival (%)	Oxidación / Oxidation (%)	Contaminación / Contamination (%)	Explantes con brotes / Explants with shoots (%)	Brotes por explante / Shoots per explant (Núm / Num)
Clon Oaxaqueño / Oaxaqueño Clone	1.Gi ^y /M1 ^x	71 a ^z	36.42 a	14 a	0 c	0 d
	2.Gi/M2 ^w	50 a	59.16 a	33 a	33 abc	0.66 bcd
	3.Gi/M3 ^v	66 a	45.00 a	16 a	66 a	0.83 abcd
	4.11B ^u /M1	85 a	33.14 a	0 a	14 bc	0.14 cd
	5.11B/M2	66 a	55.00 a	0 a	50 ab	1.00 abcd
	6.11B/M3	71 a	50.00 a	28 a	71 a	3.14 ab
	7.Gi+11B/M1	100 a	45.71 a	0 a	14 bc	0.14 cd
	8.Gi+11B/M2	66 a	45.83 a	0 a	66 a	3.16 a
	9.Gi+11B/M3	57 a	62.85 a	14 a	57 ab	3.57 a
	10.Testigo/M1	42 a	62.14 a	57 a	0 c	0 d
	11.Testigo/M2	71 a	45.00 a	0 a	71 a	2.28 ab
	12.Testigo/M3	50 a	62.50 a	16 a	50 ab	2.16 abc
	CV	61.6	41.2	130.5	86.3	40.1
	Pr \geq Chi ²	0.67	0.77	0.08	0.01	0.006
Clon Francés / French Clone	1.Gi/M1	50 abcd ^z	56.16 abc	50 abc	16 c	0.16 a
	2.Gi/M2	57 abcd	60.00 abc	14 cd	28 bc	1.71 a
	3. Gi/M3	100 a	18.33 c	0 d	16 c	0.33 a
	4.11B/M1	85 ab	25.00 c	14 cd	14 c	0.14 a
	5.11B/M2	33 cd	70.00 ab	16 cd	16 c	1.66 a
	6.11B/M3	66 abcd	45.83 abc	16 cd	66 ab	1.83 a
	7.Gi+11B/M1	42 bcd	65.71 ab	57 abc	0 c	0 a
	8.Gi+11B/M2	66 abcd	45.00 abc	33 bcd	66 ab	2.16 a
	9.Gi+11B/M3	83 abc	30.00 bc	0 d	83 a	1.83 a
	10.Testigo/M1	16 d	85.00 a	83 a	0 c	0.00 a
	11.Testigo/M2	16 d	83.66 a	66 ab	16 c	0.16 a
	12.Testigo/M3	16 d	82.50 a	66 ab	16 c	1.66 a
	C.V. ⁱ	70.8	43.2	93.1	101.7	43.3
	Pr \geq Chi ²	0.02	0.11	0.01	0.008	0.01

^zValores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo con la prueba Tukey a una $P \leq 0.05$. Valor de significancia y coeficiente de variación se determinaron después de una transformación con . Pr \geq Chi² = Nivel de significancia que indica diferencia estadística por Kruskal-Wallis.

^y*Glomus intraradices* (1 g), ^xMedio de cultivo MS, ^wMedio de cultivo MS+ bencilaminopurina (22.2 μ M), ^vMedio de cultivo MS + bencilaminopurina (22.2 μ M) + Ácido indolacético (11.4 μ M), ^uBacteria diazotrófica 11B (1x10⁶ células), ⁱCoefficiente de variación.

^zValues with the same letter within each column are equal according to the Tukey test at $P \leq 0.05$. Value of significance and coefficient of variation were determined after a transformation with. Pr \geq Chi² = Significance level that indicates statistical difference by Kruskal-Wallis.

^y*Glomus intraradices* (1 g), ^xCulture medium MS, ^wCulture medium MS + benzylaminopurine (22.2 μ M) + Indolacetic acid (11.4 μ M), ^vDiazotrophic bacterium 11B (1x10⁶ cells), ⁱCoefficient of variation.

11 para la primera variable y 6, 8, 9 y 11 para la segunda, resultaron los mejores para la inducción de organogénesis en el 'Clon Oaxaqueño' (Cuadro 1). Lo anterior se debió al efecto ejercido por los medios de cultivo M2 y M3, ya que los biofertilizantes, a pesar de haber colonizado las raíces de las plantas inoculadas, no tuvieron efectos significativamente diferentes entre los tratamientos (Cuadro 2). Esto se debió a que los medios M2 y M3 contenían reguladores del crecimiento, a diferencia del medio M1.

Para el número de explantes con brotes y el número de brotes por explante del 'Clon Oaxaqueño', los tratamientos 1 y 10 resultaron menos favorables para la inducción de brotes. Lo anterior se debe a la influencia que ejercen los reguladores de crecimiento auxinas y citocininas, los cuales tienen efecto en el alargamiento y la división celular. Además, su interacción muestra expresiones diferentes del crecimiento: en este caso la citocinina BAP está en mayor proporción con respecto a la auxina AIA, lo cual se ve reflejado en el desarrollo de las yemas y brotes (Calva y Pérez, 2005).

En el Cuadro 1 también se puede ver que el tratamiento 3, correspondiente a hijuelos del 'Clon Francés' inoculados con *Glomus intraradices* y sembrados en medio M3 (Sales MS + 22.2 μ M de BAP + 11.4 μ M de AIA), presentó el mayor porcentaje de supervivencia, la menor oxidación y la menor incidencia de contaminación, seguido por el tratamiento 4 (Bacteria 11B + M1 Sales MS) y el 9 (Interacción *Glomus intraradices* con la bacteria 11B + M3 consistente en Sales MS, 22.2 μ M de BAP y 11.4 μ M de AIA). Por otro lado, los tratamientos 10, 11 y 12 – los cuales corresponden a los ápices provenientes de hijuelos sin tratamiento previo con biofertilizantes sembrados en medio M1 (Sales MS), M2 (Sales MS + 22.2 μ M de BAP) y M3 (Sales MS + 22.2 μ M de BAP + 11.4 μ M de AIA) – presentaron el menor porcentaje de supervivencia, la mayor oxidación y la mayor incidencia de contaminación. Esto último se atribuye al efecto de los biofertilizantes, ya que en el Cuadro 2 se puede observar que existe diferencia significativa entre el testigo y los demás tratamientos con biofertilizantes.

Como ya se indicó, el biofertilizante que propició mejor supervivencia fue *Glomus intraradices* en combinación con el medio M3 (Sales MS + 22.2 μ M de BAP + 11.4 μ M de AIA), lo cual fue resultado de la interacción de la previa inoculación de *Glomus* sp y la auxina AIA. Esto se explica porque uno de los beneficios que aporta el hongo al hospedero es el aumento de la eficiencia para absorción de nutrimentos, principalmente P y Zn. Se ha demostrado que estos elementos son transportados por las hifas del hongo y que el P es un nutrimento que interviene en los procesos energéticos de la planta (López-Moctezuma *et al.*, 2005), y que el Zn interviene en la estabilización de la clorofila, en la actividad de al menos 80 enzimas de cuya estructura forma parte, y es un precursor de AIA (Salisbury y Ross, 2000).

En el caso del número de explantes con brotes y del número de brotes por explante, los tratamientos 9, 8 y 6, correspondientes a la interacción de *Glomus intraradices*

of shoots per explant registered highly significant differences among the treatments ($Pr \geq \chi^2 = 0.01$).

In the case of the number of explants with shoots and the number of shoots per explant, treatments 3, 6, 8 and 11 for the first variable and 6, 8, 9 and 11 for the second, resulted the best for the induction of organogenesis in the 'Oaxaqueño clone' (Table 1). The above was due to the effect exerted by culture media M2 and M3, given that the biofertilizers, despite having colonized the roots of the inoculated plants, did not have effects that were significantly different among the treatments (Table 2). This was due to the fact that the media M2 and M3 contained growth regulators, in contrast with medium M1.

For the number of explants with shoots and the number of shoots per explant of 'Oaxaqueño clone', treatments 1 and 10 were less favorable for the induction of shoots. This is due to the influence exerted by the growth regulators auxins and cytokinins, which have an effect on cell lengthening and division. Furthermore, their interaction shows different expressions of growth: in this case the cytokinin BAP is in higher proportion with respect to the auxin IAA, which is reflected in the development of the buds and shoots (Calva and Pérez, 2005).

Table 1 also shows that treatment 3, corresponding to suckers of 'French clone' inoculated with *Glomus intraradices* and sown in M3 medium (Sales MS + 22.2 μ M of BAP + 11.4 μ M of IAA), presented the highest percentage of survival, the lowest oxidation and the lowest incidence of contamination, followed by treatment 4 (Bacterium 11B + M1 Sales MS) and 9 (Interaction *Glomus intraradices* with the bacterium 11B + M3 consisting of Sales MS, 22.2 μ M of BAP and 11.4 μ M of IAA). On the other hand, treatments 10, 11 and 12 – which correspond to the apices from suckers without previous treatment with biofertilizers sown in M1 medium (Sales MS), M2 (Sales MS + 22.2 μ M of BAP) and M3 (Sales MS + 22.2 μ M of BAP + 11.4 μ M of IAA) – presented the lowest percentage of survival, the highest oxidation and the highest incidence of contamination. The latter is attributed to the effect of the biofertilizers, given that in Table 2 it can be observed that there is significant difference between the control and the other treatments with biofertilizers.

As previously indicated, the biofertilizer that propitiated best survival was *Glomus intraradices* in combination with the M3 medium (Sales MS + 22.2 μ M of BAP + 11.4 μ M of IAA), which was result of the interaction of the previous inoculation of *Glomus* sp and the auxin IAA. This is explained because one of the benefits supplied by the fungus to the host is the increase of efficiency for absorption of nutrients, principally P and Zn. It has been demonstrated that these elements are transported by the fungal hyphae and that P is a nutrient that intervenes in the energetic processes of the plant (López-Moctezuma *et al.*, 2005), and that the Zn intervenes in the stabilization of the chlorophyll, in the activity of at least 80 enzymes of whose structure it forms part, and is a precursor of IAA (Salisbury and Ross, 2000).

con la bacteria 11B y medios de cultivo M3 (Sales MS + 22.2 μ M de BAP + 11.4 μ M de AIA) y M2 (Sales MS + 22.2 μ M de BAP), así como la interacción de la 11B con el medio M3, respectivamente, provocaron mayor respuesta morfológica. Como puede apreciarse, el tratamiento con ápices sometidos previamente a *Glomus intraradices* y cultivados *in vitro* en medio M3 (Sales MS + 22.2 μ M de BAP + 11.4 μ M de AIA) no fue suficiente para inducir una caulogénesis elevada. En este caso, los beneficios de la bacteria 11B pueden deberse a que esta induce la producción de flavonoides en la planta hospedera, los cuales desempeñan un papel importante en la regulación del crecimiento y el control de plagas. Además mejora la asimilación de nutrientes y la relación con el agua (Madigan *et al.*, 2006). Los beneficios mencionados se reflejaron en mayor inducción de brotes, ya que los ápices provenientes de hijuelos previamente tratados con la bacteria 11B probablemente estuvieron protegidos contra plagas, además de contar con gran número de precursores y moléculas involucradas en su metabolismo (Aroca *et al.*, 2008).

En el Cuadro 2 se aprecia que el porcentaje de supervivencia de los explantes de ambos genotipos fue afectado de forma positiva por la inoculación de biofertilizantes, ya que dicho porcentaje fue significativamente

In the case of the number of explants with shoots and the number of shoots per explant, treatments 9, 8 and 6, corresponding to the interaction of *Glomus intraradices* with the bacterium 11B and culture media M3 (Sales MS + 22.2 μ M of BAP + 11.4 μ M of IAA) and M2 (Sales MS + 22.2 μ M of BAP), as well as the interaction of the 11B with medium M3, respectively, provoked higher morphogenic response. As can be observed, the treatment with apices previously subjected to *Glomus intraradices* and cultivated *in vitro* in medium M3 (Sales MS + 22.2 μ M of BAP + 11.4 μ M of IAA) was not sufficient to induce an elevated caulogenesis. In this case, the benefits of the bacterium 11B may be due to the fact that it induces the production of flavonoids in the host plant, which play an important role in the regulation of growth and pest control. Furthermore, it improves the assimilation of nutrients and the relations with water (Madigan *et al.*, 2006). The aforementioned benefits were reflected in higher induction of shoots, given that the apices from suckers previously treated with the bacterium 11B were probably protected against other pests, as well as having a great number of precursors and molecules involved in their metabolism (Aroca *et al.*, 2008).

Table 2 shows that the percentage of survival of the explants of both genotypes was positively affected by the

CUADRO 2. Efecto del genotipo, biofertilizantes y medios de cultivo sobre las variables de respuesta de ápices de banano a los 60 días después del establecimiento.

TABLE 2. Effect of genotype, biofertilizers and culture media on the response variables of banana apices 60 days after establishment.

Fuente de variación / Source of variation	Supervivencia / Survival (%)	Oxidación / Oxidation (%)	Contaminación / Contamination (%)	Explantes con brotes / Explants with shoots (%)	Brotes por explante / Shoots per explant (Núm / Num)
Genotipo / Genotype					
Clon Oaxaqueño / Oaxaqueño Clone	67 a ^z	50.02 a	15 b	40 a	1.41 a
Clon Francés / French Clone	53 a	55.38 a	34 a	28 a	0.96 a
Biofertilizante / Biofertilizer					
Gj ^y	65 a	45.97 a	21 b	26 a	0.63 a
11B ^x	69 a	45.69 a	12 b	38 a	1.30 a
Gi+11B	69 a	49.87 a	17 b	46 a	1.76 a
Testigo / Control	36 b	69.26 a	47 a	26 a	1.05 a
Medio de cultivo / Culture medium					
M1 ^w	62 a	50.44 a	33 a	7 b	0.07 b
M2 ^v	54 a	57.74 a	20 a	44 a	1.62 a
M3 ^u	64 a	49.90 a	20 a	54 a	1.98 a
CV ^t	65.3	42.30	107.8	92.9	41.63

^zValores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$. Valor de significancia y coeficiente de variación se determinaron después de una transformación con $\sqrt{x+1}$.

^y*Glomus intraradices* (1 g), ^xBacteria diazotrófica 11B (1x10⁶ células), ^wMedio de cultivo MS, ^vMedio de cultivo MS+ bencilaminopurina (22.2 μ M), ^uMedio de cultivo MS + bencilaminopurina (22.2 μ M) + Ácido indolacético (11.4 μ M), ^tCoeficiente de variación.

^zValues with the same letter within each column are equal according to the Tukey test at $P \leq 0.05$. Value of significance and coefficient of variation were determined after a transformation with $\sqrt{x+1}$.

^y*Glomus intraradices* (1 g), ^xDiazotrophic bacterium 11B (1x10⁶ cells), ^wCulture medium MS, ^vCulture MS + benzylaminopurine (22.2 μ M) + Indolacetic acid (11.4 μ M), ^tCoefficient of variation.

mayor cuando se llevó a cabo una biofertilización previa al establecimiento aséptico.

Por otro lado, en el mismo Cuadro 2 se puede observar que ninguno de los factores (genotipo, biofertilizante y medio de cultivo) afectó significativamente al porcentaje de oxidación. Por el contrario, la contaminación fue menor de forma significativa en el caso del 'Clon Oaxaqueño' y de aquellos tratamientos inoculados con biofertilizantes. A pesar de esto, cabe mencionar que la calidad de los brotes del 'Clon Francés' fue superior a la de los brotes del 'Clon Oaxaqueño', ya que los brotes provenientes de ápices del 'Clon Francés' fueron más firmes y presentaron hojas, lo cual significa un mayor desarrollo en menor tiempo.

En el caso del número de explantes con brotes y el número de brotes por explante, estos sólo se vieron afectados por el medio de cultivo. Los medios con reguladores del crecimiento propiciaron mayor respuesta morfogénica (Cuadro 2).

En el Cuadro 3 se consignan diferencias significativas en los potenciales de turgencia en hojas antes de la desinfección, tanto para el 'Clon Oaxaqueño' como para el 'Clon Francés'. También hubo diferencias significativas entre los potenciales hídricos de las hojas del 'Clon Francés' antes de la desinfección, mientras que entre los potenciales hídricos de las hojas del 'Clon Oaxaqueño' y los potenciales osmóticos de las hojas de ambos genotipos antes de la desinfección no se observaron diferencias significativas. Tampoco se registraron diferencias entre los potenciales hídrico, osmótico y de turgencia en cormos de los dos genotipos después de la desinfección. Esto último posible-

inoculation of the biofertilizers, given that this percentage was significantly higher when a biofertilization was carried out prior to the aseptic establishment.

On the other hand, in Table 2 it can also be observed that none of the factors (genotype, biofertilizer and culture medium) significantly affected the percentage of oxidation. On the contrary, contamination was significantly lower in the case of the 'Oaxaqueño clone' and of those treatments inoculated with biofertilizers. In spite of this, it should be mentioned that the quality of the shoots of 'French clone' was higher than that of the shoots of 'Oaxaqueño clone', given that the shoots from the apices of the 'French clone' were firmer and presented leaves, which means greater development in a shorter period of time.

In the case of the number of explants with shoots and the number of shoots per explant, these were only affected by the culture medium. The media with growth regulators propitiated a higher morphogenic response (Table 2).

Table 3 presents significant differences in the potentials of turgidity in leaves prior to disinfection, both for the 'Oaxaqueño clone' and for the 'French clone'. There were also significant differences between the water potentials of the leaves of the 'French clone' prior to disinfection, whereas between the water potentials of the leaves of the 'Oaxaqueño clone' and the osmotic potentials of the leaves of both genotypes prior to disinfection no significant differences were observed. There were also no significant differences registered among the water, osmotic and turgidity potentials in corms of the two genotypes after disinfection. The latter was possibly due to the fact that the corm is a storage organ, and therefore seldom presents water stress.

CUADRO 3. Efecto de biofertilizantes sobre las relaciones hídricas antes y después de la desinfección en hijuelos y ápices de dos genotipos de banano. Promedio de tres repeticiones.

TABLE 3. Effect of biofertilizers on water relations before and after disinfection in suckers and apices of two genotypes of banana. Average of three replicates.

Tratamiento / Treatment		Antes de desinfección (hoja) / Before disinfection (leaf)			Después desinfección (cormo) / After disinfection (corm)		
Genotipo / Genotype	Biofertilizante / Biofertilizer	Ψ_w^*	Ψ_{π}^w	Ψ_p^v	Ψ_w	Ψ_{π}	Ψ_p
		(bares) / (bars)			(bares) / (bars)		
Clon Oaxaqueño / Oaxaqueño Clone	1. Gi ^u	-7.81 a ^z	-10.28 a	2.46 a	-9.05 a	-10.04 a	0.99 a
	2. 11B ⁱ	-11.22 a	-9.73 a	-1.48 ab	-7.51 a	-7.51 a	0.00 a
	3. Gi+11B	-9.54 a	-7.07 a	-2.47 b	-8.80 a	-9.30 a	0.42 a
	4. Testigo / Control	-7.76 a	-9.24 a	1.48 ab	-9.49 a	-9.98 a	0.85 a
Clon Francés / French Clone	1. Gi	-6.33 ab ^z	-9.79 a	3.46 ab	-5.84 a	-6.33 a	0.49 a
	2. 11B	-8.01 ab	-9.73 a	1.72 ab	-5.29 a	-6.03 a	0.74 a
	3. Gi+11B	-9.29 b	-7.07 a	-2.22 b	-5.09 a	-6.33 a	1.23 a
	4. Testigo / Control	-5.29 a	-11.71 a	6.42 a	-5.78 a	-6.28 a	0.49 a

^zValores con la misma letra dentro de cada columna y por genotipo son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

*Potencial hídrico, ^wPotencial osmótico, ^vPotencial de turgencia, ^u*Glomus intraradices* (1 g), ⁱBacteria diazotrófica 11B (1x10⁶ células).

^zValues with the same letter within each column and per genotype are equal according to the Tukey test at $P \leq 0.05$.

*Water potential, ^wOsmotic potential, ^vTurgidity potential, ^u*Glomus intraradices* (1 g), ⁱDiazotrophic bacterium 11B (1x10⁶ cells).

mente se debió a que el cormo es un órgano de almacenamiento, y por lo tanto difícilmente sufre estrés hídrico.

En ambos genotipos, los tratamientos 1 y 4 (*Glomus intraradices* y el testigo, respectivamente) indujeron los potenciales de turgencia más altos, y los tratamientos 2 y 3, los más bajos (Cuadro 3). Lo anterior coincide con el comportamiento de la enzima peroxidasa (Cuadro 4), ya que los tratamientos 1 y 4 presentaron el menor número de unidades de peroxidasa por gramo de tejido, mientras que los tratamientos 2 y 3 tienen los valores más altos. Tomando en cuenta lo anterior, se puede decir que los tratamientos 1 y 4 producen menos estrés en las plantas, mientras que los tratamientos 2 y 3 inducen mayor producción de la enzima peroxidasa como una respuesta al estrés al que fueron sometidas (Ramírez y Rodríguez, 2012).

En el caso de la enzima catalasa, su actividad en hojas del 'Clon Oaxaqueño' provenientes de hijuelos inoculados con *Glomus intraradices* fue significativamente mayor a la de aquellas hojas provenientes de hijuelos tratados con la bacteria 11B y la interacción de *Glomus intraradices* con la bacteria 11B y los que no fueron tratados con biofertilizantes. Por otro lado, no hubo diferencias significativas en la actividad de esta enzima en hojas de 'Clon Francés' ni en las raíces de ambos genotipos (datos no mostrados).

En el Cuadro 5, se observa que en el 'Clon Oaxaqueño' el potencial de turgencia de los ápices sin previo tratamiento con biofertilizantes fue superior al de aquellos previamente tratados con los mismos. Para el 'Clon Francés' se observó lo contrario: el potencial de turgencia de los ápices con tratamiento previo de biofertilizantes fue superior al del testigo. Lo anterior se debió al efecto del

In both genotypes, treatments 1 and 4 (*Glomus intraradices* and the control, respectively) induced the highest turgidity potentials, and treatments 2 and 3, the lowest (Table 3). The above coincides with the behavior of the enzyme peroxidase (Table 4), given that treatments 1 and 4 presented the lowest number of units of peroxidase per gram of tissue, while treatments 2 and 3 have the highest values. Considering the above, it can be said that treatments 1 and 4 produce less stress in the plants, while treatments 2 and 3 induce higher production of the enzyme peroxidase as a response to the stress to which they were subjected (Ramírez and Rodríguez, 2012).

In the case of the enzyme catalase, its activity in leaves of 'Oaxaqueño clone' from suckers inoculated with *Glomus intraradices* was significantly higher than that of leaves from suckers treated with bacterium 11B and the interaction of *Glomus intraradices* with bacterium 11B and those that were not treated with biofertilizers. On the other hand, there were no significant differences in the activity of this enzyme in leaves of 'French clone' nor in the roots of both genotypes (data not shown).

In Table 5, it is observed that the 'Oaxaqueño clone' the turgidity potential of the apices without prior treatment with biofertilizers was higher than that of those treated with them. For the 'French clone' the contrary was observed: the turgidity potential of the apices with prior treatment of biofertilizers was higher than that of the control. The above was due to the effect of the genotype, given that the 'Oaxaqueño clone' did not require biofertilizers for osmotic regulation, in contrast to the 'French clone', which obtained benefits from the symbiosis in the water relations.

CUADRO 4. Actividad de las enzimas peroxidasa y catalasa en tejidos foliares y radicales de dos genotipos de banano un mes después de la inoculación de biofertilizantes. Promedio de tres repeticiones.

TABLE 4. Activity of the enzymes peroxidase and catalase in leaf and root tissue of two genotypes of banana one month after the inoculation of biofertilizers. Average of three replicates.

Genotipo / Genotype	Tratamiento / Treatment	Actividad peroxidasa / Peroxidase activity		Actividad catalasa / Catalase activity	
		Hoja / Leaf	Raíz / Root	Hoja / Leaf	Raíz / Root
		U Px / g de tejido ^a / U Px / g of tissue ^a		μKt / g de tejido ^a / μKt / g of tissue ^a	
Clon Oaxaqueño / Oaxaqueño Clone	1. Gi ^w	1416.95 b ^z	1306.30 a	0.06 a ^z	0.02 a
	2. 11B ^v	1577.35 ab	1662.43 a	0.02 b	0.01 a
	3. Gi+11B	1733.01 a	1955.89 a	0.03 b	0.01 a
	4. Testigo / Control	1436.49 b	1914.70 a	0.01 b	0.01 a
Clon Francés / French Clone	1. Gi	1207.89 b ^z	1695.72 a	0.02 a ^z	0.02 a
	2. 11B	1541.53 a	1673.38 a	0.03 a	0.01 a
	3. Gi+11B	1501.86 ab	1288.24 b	0.02 a	0.02 a
	4. Testigo / Control	1320.26 ab	1655.50 a	0.02 a	0.02 a

^aValores con la misma letra dentro de cada columna y por genotipo son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

^vUnidades de peroxidasa por gramo de tejido, ^wMicro katalas por gramo de tejido, ^x*Glomus intraradices* (1 g), ^yBacteria diazotrófica 11B (1x10⁶ células).

^aValues with the same letter within each column and per genotype are equal according to the Tukey test at $P \leq 0.05$.

^vUnits of peroxidase per gram of tissue, ^wMicro katalas per gram of tissue, ^x*Glomus intraradices* (1 g), ^yDiazotrophic bacterium 11B (1x10⁶ cells).

CUADRO 5. Efecto de biofertilizantes y medios de cultivo sobre las relaciones hídricas a los 60 días después del establecimiento *in vitro* de ápices de dos genotipos de banano. Promedio de tres repeticiones.

TABLE 5. Effect of biofertilizers and culture media on water relations 60 days after the *in vitro* establishment of apices of two banana genotypes. Average of three replicates.

Tratamiento / Treatment			Ψ_w^y	Ψ_{π}^x	Ψ_p^w
Genotipo / Genotype	Biofertilizante / Biofertilizer	Medio de cultivo / Culture medium	(bares) / (bars)		
Clon Oaxaqueño / Oaxaqueño Clone	Gi ^v	M1 ^t	-9.51 b ^z	-17.41 bc	7.90 ab
		M2 ^s	-7.34 ab	-7.59 a	0.24 b
		M3 ^r	-4.83 a	-8.53 a	3.70 ab
	11B ^u	M1	-9.57 b	-13.51 abc	3.94 ab
		M2	-6.66 ab	-6.55 a	-0.00 b
		M3	-8.33 ab	-8.82 ab	0.49 b
	Gi+11B	M1	-8.53 ab	-11.49 abc	2.96 ab
		M2	-5.61 ab	-11.05 abc	5.43 ab
		M3	-4.33 a	-7.54 a	3.20 ab
	Testigo / Control	M1	-8.58 ab	-18.46 c	9.88 a
		M2	-6.55 ab	-14.45 abc	7.89 ab
		M3	-5.61 ab	-12.78 abc	7.16 ab
	Gi	M1	-4.58 ab ^z	-15.44 c	10.86 a
		M2	-4.87 abc	-9.07 abc	4.19 abc
		M3	-5.56 abc	-8.52 abc	2.95 abc
	11B	M1	-8.33 bc	-15.00 bc	6.66 abc
		M2	-4.58 ab	-14.69 abc	0.11 ab
		M3	-6.11 abc	-11.05 abc	4.93 abc
Clon Francés / French Clone	Gi+11B	M1	-8.77 c	-15.44 c	6.66 abc
		M2	-5.61 abc	-9.81 abc	4.19 abc
		M3	-6.55 abc	-10.75 abc	4.19 abc
	Testigo / Control	M1	-7.56 abc	-10.94 abc	3.37 abc
		M2	-5.59 abc	-7.15 ab	1.56 c
		M3	-4.01 a	-6.47 a	2.46 bc

^zValores con la misma letra dentro de cada columna y por genotipo son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

^yPotencial hídrico, ^xPotencial osmótico, ^wPotencial de turgencia, ^v*Glomus intraradices* (1 g), ^uBacteria diazotrófica 11B (1×10^6 células), ^tMedio de cultivo MS, ^sMedio de cultivo MS+ benzilaminopurina (22.2 μ M), ^rMedio de cultivo MS + benzilaminopurina (22.2 μ M) + Ácido indolacético (11.4 μ M).

^zValues with the same letter within each column and per genotype are equal according to the Tukey test at $P \leq 0.05$.

^yWater potential, ^xOsmotic potential, ^wTurgidity potential, ^v*Glomus intraradices* (1 g), ^uDiazotrophic bacterium 11B (1×10^6 cells), ^tCulture medium MS, ^sCulture medium MS + benzylaminopurine (22.2 μ M), ^rCulture medium MS + benzylaminopurine (22.2 μ M) + Indolacetic acid (11.4 μ M).

genotipo, ya que el 'Clon Oaxaqueño' no necesitó de biofertilizantes para la regulación osmótica, a diferencia del 'Clon Francés', que obtuvo beneficios de la simbiosis en las relaciones hídricas.

CONCLUSIONES

Se logró elevar la inducción de la organogénesis en explantes de *Musa cavendish* AAA, cultivares 'Clon Francés' y 'Clon Oaxaqueño', mediante la adición de bencilami-

CONCLUSIONS

Induction of organogenesis was raised in explants of *Musa cavendish* AAA, cultivars 'French clone' and 'Oaxaqueño clone', with the addition of benzylaminopurine combined or not with indolacetic acid in the culture medium, and by the previous biofertilization of the suckers, from which the explants were extracted.

In the case of the 'Oaxaqueño clone', neither the treatments prior to the *in vitro* establishment with bioferti-

nopurina combinada o no con ácido indolacético en el medio de cultivo, y por la biofertilización previa de los hijuelos, de los cuales se extrajeron los explantes.

En el caso del 'Clon Oaxaqueño', ni los tratamientos previos al establecimiento *in vitro* con biofertilizantes ni la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo tuvieron influencia sobre la supervivencia, contaminación y oxidación. Sin embargo, la adición de bencilaminopurina, interactuando o no con ácido indolacético y la biofertilización previa, indujeron mayor número de explantes con brotes y brotes generados por explante.

Para el 'Clon Francés', el tratamiento previo de hijuelos con *Glomus intraradices* y el establecimiento de dichos explantes en medio de cultivo adicionado con reguladores de crecimiento propiciaron mayor supervivencia, así como menor contaminación y oxidación. Por otro lado, la adición de ambos biofertilizantes y la presencia de bencilaminopurina combinada o no con ácido indolacético elevaron la inducción de la organogénesis en los explantes por encima de los testigos sin biofertilización previa.

Para ambos genotipos, la biofertilización no se vio reflejada directamente sobre la actividad morfogénica de los explantes. Sin embargo, el uso de biofertilizantes propició mayor porcentaje de supervivencia, menor porcentaje de oxidación y menor contaminación.

Tomando en cuenta que los potenciales de turgencia coincidieron con el comportamiento de la enzima peroxidasa en ambos genotipos, el tratamiento con *Glomus intraradices* y el testigo produjeron menos estrés en las plantas.

lizers nor the presence of growth regulators in the culture medium had influence on survival, contamination and oxidation. However, the addition of benzylaminopurine, interacting or not with indolacetic acid and the previous biofertilization, induced a higher number of explants with shoots and shoots generated per explant.

For the 'French clone', the prior treatment of suckers with *Glomus intraradices* and the establishment of these explants in culture medium added with growth regulators provided higher survival as well as lower contamination and oxidation. On the other hand, the addition of both biofertilizers and the presence of benzylaminopurine combined or not with indolacetic acid elevated the induction of organogenesis in the explants above the controls without previous biofertilization.

For both genotypes, biofertilization was not directly reflected on the morphogenic activity of the explants. However, the use of biofertilizers propitiated a higher percentage of survival, lower percentage of oxidation and lower contamination.

Considering that the turgidity potentials coincided with the behavior of the enzyme peroxidase in both genotypes, the treatment with *Glomus intraradices* and the control produced less stress in the plants.

End of English Version

LITERATURA CITADA

- AGUADO-SANTACRUZ, G. A.; MORENO-GÓMEZ, B.; JIMÉNEZ-FRANCISCO, B.; GARCÍA-MOYA, E.; PRECIADO-ORTIZ R. E. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35(1): 9-21. <http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/35-1/2a.pdf>
- ALIASGHARZAD, N.; SHIRMOHAMADI, E.; OUSTAN, S. 2009. Siderophore production by mycorrhizal sorghum roots under micronutrient deficient condition. *Soil & Environment* 28(2): 119-123. <http://www.se.org.pk/File-Download.aspx?archivedpaperid=110>
- AROCA, R.; VERNIERI, P.; RUIZ-LOZANO, J. M. 2008. Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. *Journal of Experimental Botany* 59(8): 2029-2041. doi: 10.1093/jxb/ern057
- AUGÉ, R. M. 2004. Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Canadian Journal of Soil Science* 84(4): 373-381. doi: 10.4141/S04-002
- CALVA-CALVA, G.; PÉREZ-VARGAS, J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria* 6(11): 1-16. http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf
- CANCHIGNIA M., H. F.; SIGCHA S., L. E.; TOAQUIZA S., J. P.; RAMOS G., L. E.; SAUCEDO A., S. G.; CARRANZA P., M. S.; CEVALLOS F., O. F. 2008. Alternativas para la propagación *in vitro* de plátano variedad Maqueño (*Musa balbisiana* AAB). *Ciencia y Tecnología* 1(1): 43-48. <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4045248.pdf>
- CARSON, K. C.; MEYER, J. M.; DILWORTH, M. J. 2000. Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 32(1): 11-21. doi: 10.1016/S0038-0717(99)00107-8
- CHANDLER, S. F.; THORPE, T. A. 1987. Characterization of growth, water relations and proline accumulation in sodium sulfate tolerant callus of *Brassica napus* L. cv Westar (Canola). *Plant Physiology* 88(1): 106-111. doi: 10.1104/pp.84.1.106
- DÖBEREINER, J. 1992. History and new perspectives of diazotrophs in association with non leguminous plants. *Symbiosis* 13: 1-13.
- GARCÍA Á., L.; PÉREZ M., B.; SARRÍA H., Z.; CLAVERO G., J. 2002. Alternativas para la propagación *in vitro* del cultivar híbrido FHIA-20. *Infomusa* 11(1): 35-38. http://www.musalit.org/pdf/IN020035_es.pdf
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. 1963. Spores of mycor-

- rhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society 46(2):235-244. doi: 10.1016/S0007-1536(63)80079-0.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. 1960. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol. 84: 489-500.
- KAR, M.; MISHRA, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology 57(2): 315-319. doi: 10.1104/pp.57.2.315
- LÓPEZ-MOCTEZUMA, H.; FERRERA-CERRATO, R.; FARIAS-LARIOS, J.; AGUILAR-ESPINOSA, S.; BELLO, M. R.; LÓPEZ-AGUIRRE, J. G. 2005. Micorriza arbuscular, *Bacillus* y sustrato enriquecido con vermicomposta en el desarrollo de plantas de papayo. Terra Latinoamericana 23(4): 523-531. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57311146011>
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. 2004. Plant growth promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiology and Biochemistry 42(6): 565- 572. doi: 10.1016/j.plaphy.2004.05.009
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. 2006. Brock Biología de los microorganismos. Traducido al español por GACTO F., F.; GONZÁLEZ V., T.; GUERRERO M., R.; JIMÉNEZ J., J.; LARRIBA C., G.; RODRÍGUEZ F., C.; SÁNCHEZ P., M. Editorial Pearson Education. Madrid. 1011 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia. Plantarum. 15(3): 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- PERES DE O., J.; SILVA C., F. H.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. 2008. Micropropagación y estimativa de producción de mudas de bananos para la Amazonia Occidental. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 43(10):1429-1432. <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/941/5533>
- PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55(1): 158-161. doi: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- RAMÍREZ G., M.; RODRÍGUEZ, A. 2012. Plant defense mechanisms and responses in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: a review. Revista Colombiana de Biotecnología 14(1): 271-284. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/viewFile/32888/32936>
- ROSALES, F. E.; POCASANGRE, L. E.; TREJOS, J.; SERRANO, E.; PEÑA, W. 2008. Guía de diagnóstico de la calidad y salud de suelos bananeros. Ed. Rosales, F. E. Biodiversity International 78 p.
- ROY-BOLDUC, A.; HIJRI, M. 2010. The Use of Mycorrhizae to Enhance Phosphorus Uptake: A Way Out The Phosphorus Crisis. Biofertilizers and Biopesticides 2(1): 1-5. doi: 10.4172/2155-6202.1000104
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. 2000. Fisiología de las plantas. Editorial Paraninfo. 1000p.
- SÁNCHEZ-CUEVAS, M. C.; SALAVERRÍA, J. L. 2004. Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). Revista UDO Agrícola 4(1): 21-26. <http://udoagricola.udo.edu.ve/V4UDOAgr/V4Sanchez21.pdf>
- SESSITSCH, A.; HOWIESON, J. G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTINEZ-ROMERO, E. 2002. Advances in *Rhizobium* Research. Critical Reviews in Plant Sciences. 21(4): 323-378. doi: 10.1080/0735-260291044278
- VÁZQUEZ-OVANDO, J. A.; ANDRINO-LÓPEZ, D. K.; ADRIANO-ANAYA, M. L.; SALVADOR-FIGUEROA, M.; OVANDO-MEDINA, I. 2012. Sensory and physico-chemical quality of banana fruits "Grand Naine" grown with biofertilizer. African Journal of Agricultural Research 7(33): 4620-4626. doi: 10.5897/AJAR11.2334
- VESSEY, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255(2):571-586. doi: 10.1023/A:1026037216893
- VILLEGAS, Z.; GIMÉNEZ, C.; VÍLCHEZ, J.; MORENO, M.; SANDOVAL, L.; COLMENARES, M. 2008. Oxidación en la inducción de la embriogénesis somática a partir de flores masculinas inmaduras de Gran Enano (*Musa* AAA), Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia 25(3): 570-588. <http://revistas.luz.edu.ve/index.php/fagro/article/viewFile/2482/2409>