

54

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EFEECTO DE LA INOCULACION DE *Azospirillum* y  
HONGOS MICORRIZICO ARBUSCULARES EN EL  
CRECIMIENTO DE *Lycopersicon esculentum*.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
DANTE GONZALEZ SALMORAN

298271



MEXICO, D F



LIBRARY OF THE FACULTY OF CHEMISTRY  
UNIVERSITY OF MEXICO

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente      Profa. GUADALUPE VELEZ PRATT  
Vocal            Profa. ROSA MARÍA RAMÍREZ GAMA  
Secretario      Profa. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ  
1er. Suplente   Profa. NORMA TREJO MEDINA  
2º. Suplente    Profa. MA. DE LOS DOLORES CAMPOS ECHEVERRÍA

Sitio donde se desarrolló el Tema:

Laboratorio de Microbiología Experimental. Facultad de Química, UNAM

Asesor del Tema :

  
M. en C. Rosa Ma. Ramirez Gama

Supervisor Técnico:

  
María Guadalupe Tsuzuki Reyes

Sustentante:

  
Dante González Salmorán

Dedico este trabajo a la memoria de mi abuelo:

**Agustín Juárez González**

Fuente de honestidad, perseverancia y trabajo.

Agradezco a mis padres :

**Felipe González Pérez y Efigenia Salmorán López**

Por su apoyo moral y económico que me brindaron para lograr una formación profesional.

A mis hermanos : **Sair y Alma**

A mis: **Tíos y Primos**

A mis abuelos: **María, Leopoldo, Elvia**

Por su apoyo moral.

Agradezco el apoyo, punto de vista, críticas y consejos de mis maestras:

**Rosa María Ramírez Gama**  
**Guadalupe Tsuzuki Reyes**  
**Beatriz Luna Millán**  
**María de los Dolores Campos Echeverría**

Agradezco a todos mis amigos con los cuales compartí mi formación académica

**Cómicos**  
**Mario Alberto**  
**Rosalba**  
**Anel**  
**Elena**  
**Verónica**  
**Guadalupe**  
**María Elena**  
**Violeta**  
**Carmen**  
**Hilda**  
**Mónica**

Un agradecimiento especial para **Tonantzin Zapata Lilly** (Mi esposa) por el apoyo moral y cariñoso que me brindo en momentos difíciles, por compartir muchos momentos especiales y por el **regalo**, ya que son la inspiración para seguir superándome en todos los aspectos.

**Este trabajo es símbolo del esfuerzo y dedicación de muchas personas, las cuales ven reflejado el granito de arena que pusieron y con lo que se deben sentir orgullosos.**

**Este trabajo es también símbolo del querer es poder, y espero sirva como un ejemplo para aquellas personas que tienen talento pero les da temor la luz del éxito.**

**Gracias a mis Padres y hermanos.**

## Índice

	Paginas
roducción	1
objetivos	5
Antecedentes	6
1) <i>Azospirillum</i>	6
1.1) Colonización de la raíz por <i>Azospirillum</i>	8
1.2) Efecto de la inoculación de <i>Azospirillum</i> en plantas.	10
1.3) <i>Modo de acción propuesto para Azospirillum en el crecimiento de las plantas.</i>	12
2) Sustancias reguladoras del crecimiento de la planta.	12
2.1) Auxinas	15
2.2) Giberelinas	16
2.3) Citocininas	18
2.4) Abscisinas	19
2.5) Óxido de etileno	19
3) Micorrizas	21
3.1) Micorrizas Arbusculares (Endomicorrizas)	24
3.1.1) <i>Ecología</i>	25
3.1.2) <i>Características</i>	26
3.1.3) <i>Taxonomía</i>	27
3.1.4) <i>Formación de simbiosis</i>	29
3.1.5) <i>Efecto de Hongos micorrizico arbusculares en el ecosistema planta-suelo.</i>	30
3.1.6) <i>Interacción de Hongos micorrizico arbusculares con componentes de la microbiota del suelo</i>	31
3.1.7) <i>Efecto de los fertilizantes en la actividad de Micorrizas arbusculares</i>	32
3.1.8) <i>Micorrizas en horticultura</i>	33
3.1.9) <i>Manejo de interacciones de la micorrizosfera en horticultura</i>	34
4) <i>Jitomate (Lycopersicon esculentum)</i>	35
Material y Métodos	41
Resultados y Discusión	58

Conclusiones	82
Recomendaciones	83
Bibliografía	84
ANEXO 1 Medios de cultivo	88
ANEXO 2 Preparación de reactivos	90
ANEXO 3 Resultados de comparaciones múltiples de DUNCAN	92

## Introducción

En la carrera de Química Farmacéutico Biológica, el conocimiento de los microorganismos es de particular importancia, debido a que éstos afectan a la sociedad humana de diversas maneras. Numerosos microorganismos son agentes causales de múltiples enfermedades por lo que se consideran perjudiciales, pero otros muchos son productores de gran cantidad de metabolitos de interés industrial y la gran mayoría de ellos participan en las transformaciones de los ciclos biogeoquímicos lo que los hace componentes indispensables del ecosistema, en donde se encargan de regular y mantener el equilibrio del medio ambiente.

Desafortunadamente, la actividad del hombre ha provocado que en los ecosistemas acuáticos y terrestres se hayan acumulado compuestos químicos de naturaleza variada contaminando el medio ambiente y el consiguiente desequilibrio ecológico, que en la actualidad constituye un grave problema, en donde una de las alternativas para su solución corresponde al uso de microorganismos, los que al ser parte del ecosistema natural y ser manipulados adecuadamente ofrecen la posibilidad de restaurar, recuperar o por lo menos mantener el medio ambiente. En el caso del ecosistema suelo el problema de contaminación deriva del uso de agroquímicos.

Respecto a la microbiota, gran parte de la población microbiana del suelo se encuentra preferentemente alrededor de las raíces de los vegetales y la mayoría de

estos microorganismos a través de su actividad metabólica favorecen el crecimiento y rendimiento de las plantas; por lo que la atención se ha centrado en el estudio de microorganismos capaces de formar asociaciones simbióticas con las plantas.

Entre las simbiosis más utilizadas y estudiadas se encuentran *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*-leguminosas, que representa un importante aporte de nitrógeno para la planta. Sin embargo, por la especificidad de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* su uso tiene limitaciones ya que no forman simbiosis con todas las especies de plantas, por lo que en la actualidad se buscan otros microorganismos que sean capaces de producir mejoras con un mayor campo de acción, tal es el caso de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) entre las cuales se encuentran: *Pseudomonas*, bacterias solubilizadoras de fósforo, fijadoras de nitrógeno y *Azospirillum*, algunas de éstas producen fitohormonas por lo que ayudan al desarrollo de la planta. *Azospirillum* es probablemente la más estudiada de una gran variedad de bacterias asociadas a la rizosfera por tener un potencial significativo como biofertilizante.

Existe además la posibilidad de utilizar otras asociaciones mutualistas naturales; una de ellas es la establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas (tanto cultivadas como silvestres) y ciertos hongos del suelo, esta asociación conocida como micorrizas es una simbiosis prácticamente universal porque casi todas las

especies vegetales son susceptibles de formarlas y también porque pueden estar presentes en la mayoría de los hábitats naturales.

Esta asociación mutualista supone una relación benéfica para los dos organismos implicados, y tanto el hongo como la planta se ven favorecidos por la asociación: el hongo coloniza la raíz de la planta y le proporciona nutrientes ( P, Zn, Mg, Cu, Fe, Mn), que extrae del suelo por medio de su red externa de hifas, mientras que la planta suministra al hongo sustratos energéticos y carbohidratos que elabora a través de la fotosíntesis.

También se ha demostrado que la coinoculación *Azospirillum*-micorrizas favorece el desarrollo y productividad de plantas monocotiledóneas (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

Considerando lo anterior, así como la importancia que tiene el cultivo de jitomate en México y para el que se utilizan dosis muy altas de fertilizantes químicos, en este estudio se busca una alternativa para disminuir el uso de fertilizantes químicos y asegurar un buen desarrollo de la planta de jitomate, con tal fin se evaluó el efecto de la inoculación de *Azospirillum* y hongos micorrízico arbusculares en el crecimiento de *Lycopersicon esculentum* y se comparó con el efecto producido por la aplicación de fitohormonas puras.

Este trabajo forma parte del proyecto 27972 B "Estudio comparativo del efecto de bacterias promotoras del desarrollo vegetal sobre el crecimiento y rendimiento del jitomate" patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, en la Universidad Nacional Autónoma de México

## Objetivos

- **Objetivo General**

Evaluar y comparar el efecto de la inoculación de *Azospirillum* y hongos micorrízico arbusculares en el crecimiento de *Lycopersicon esculentum*.

- **Objetivos Particulares**

Comparar el efecto de fitohormonas puras con la inoculación de *Azospirillum* en el crecimiento de *Lycopersicon esculentum*.

Evaluar el efecto de HMA en el crecimiento de *Lycopersicon esculentum*.

Evaluar el crecimiento de *Lycopersicon esculentum* inoculadas con *Azospirillum* más un HMA.

Cuantificar las fitohormonas (Ácido indol acético, ácido giberélico) producidas por *Azospirillum brasilense* utilizando el método de HPLC.

Relacionar las concentraciones de fitohormonas producidas por *Azospirillum in vitro* con el efecto sobre el crecimiento de *Lycopersicon esculentum*.

## 1.0) Antecedentes

### 1.1) *Azospirillum*

La primera especie de *Azospirillum* fue aislada por Beijerinck en 1925, en suelos pobres de nitrógeno en Holanda y fue originalmente llamada *Spirillum lipoferum*. Scroder en 1932 la aisló del suelo y de algas marinas en Indonesia y tiempo después se describió como una bacteria de la filosfera de plantas tropicales (Becking 1982). Döbereiner y Day en 1976 fueron los primeros en reportar que estaba ampliamente distribuida en la rizosfera de varios pastos tropicales. Desde entonces *Azospirillum* se ha aislado de las raíces de numerosos pastos silvestres y cultivados, cereales, leguminosas de suelos tropicales, subtropicales y templados de todo el mundo (Bashan y Levanony, 1990).

Tarrand y colaboradores en 1978 basados en las diferencias fisiológicas y morfológicas entre varias cepas y en estudios de homología de DNA propusieron el género *Azospirillum* y distinguieron dos especies: *A. brasilense* y *A. lipoferum*, más tarde se describieron tres especies más: *A. amazonense*, aislada de pastos del área Amazónica del Brasil, las especies *A. halopraefens* y *A. irakense* aisladas de suelos alcalinos y *A. largimobile*, *A. dobereineriae* (Ben Dekhil et al. 1997; Eckert et al. 2001).

Las bacterias del género *Azospirillum* son fijadoras de nitrógeno de vida libre, de forma bacilar vibrioide, cuyo diámetro oscila de 0.9 a 1.2  $\mu\text{m}$ , gram negativo.

Presentan en su interior gránulos de poli β-hidroxibutirato (PHB), un flagelo polar (figura 1) y movimiento típico helicoidal o vibratorio en medio líquido. Su temperatura óptima de crecimiento es de 32-35 °C. Algunas cepas crecen bien a un pH de 7 mientras que otras prefieren condiciones más ácidas, fijan nitrógeno únicamente en condiciones microaeróbicas. En condiciones aeróbicas crecen únicamente en presencia de una fuente de nitrógeno fijado como cloruro de amonio.

Las vías metabólicas mediante las que *Azospirillum* aprovecha el C y N son diversas y dependen de las condiciones ambientales. Esta versatilidad hace que se adapte con facilidad y se establezca en el ambiente competitivo de su hábitat, la rizosfera. (Tarrand, Krieg y Döbereiner, 1978; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

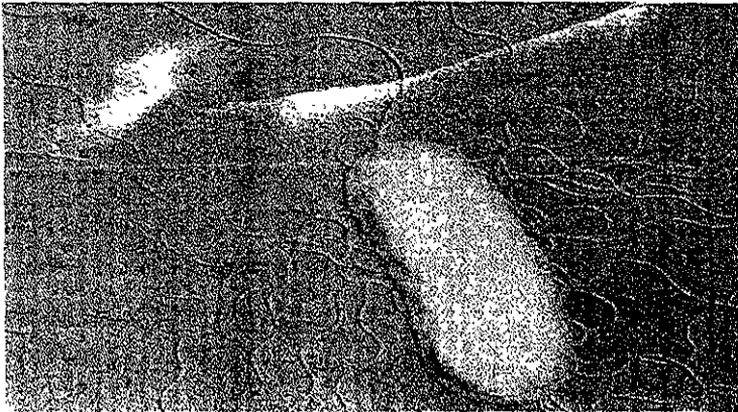


Figura 1. *Azospirillum*

### 1.1.1) Colonización

*Azospirillum* ha sido localizada en la superficie de las raíces, en las células corticales y el xilema de las mismas, lo que indica que coloniza la parte externa e interna de la raíz y las variaciones son dadas por el tipo de cepa, especie vegetal, condiciones ambientales y otros factores no identificados, lo que en conjunto determina diferentes grados y patrones de colonización, así como distintos tamaños de población y sitios de colonización (Bashan y Levanony, 1990).

En la colonización externa las bacterias forman pequeños agregados y se esparcen a lo largo de la raíz, preferentemente se localizan en las zonas de elongación y de surgimiento de pelos radicales (Bashan, 1986; Okon y Kapulnik, 1986).

La adhesión de *Azospirillum* a las superficies ocurre rápidamente (segundos o minutos) después de la exposición de la planta a la bacteria. El movimiento de algunas cepas de *A. brasilense* a lo largo de raíz es mínimo debido a la formación de fibrillas multiramificadas (Bashan y Levanony 1989; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

La colonización interna se ha demostrado mediante: la desinfección externa de las raíces y su posterior inoculación en medios selectivos en donde se registro desarrollo. Con el microscopio óptico se observó que *Azospirillum* ocupa los espacios intercelulares de la corteza, las células corticales y el xilema, (Patriquin y Döbereiner, 1978; Baldani et al. 1986). Con microscopio electrónico se confirmó la

colonización vascular por *A. lipoferum* (Levanony et al. 1989) y mediante técnicas inmunológicas y anticuerpos monoclonales se demostró que sólo algunas cepas de *A. brasilense* (Sp 245) invaden el xilema de la raíz de trigo brasileño, mientras que *A. brasilense* Sp7 únicamente coloniza la superficie de la raíz (Schloter et al. 1994).

Monitoreando el patrón de colonización de *Azospirillum brasilense* Sp245 en las raíces del trigo, utilizando un gen *gusA* de *E. coli* se demostró que los sitios de colonización primaria de la raíz son los puntos laterales en donde emergen las raíces secundarias y las zonas de los pelos de la raíz (Van de Broek et al. 1993).

La forma en que penetra *Azospirillum* en los espacios intercelulares es desconocida, algunas teorías sugieren que:

- La invasión bacteriana se da en la pérdida de continuidad de tejidos corticales por ramas o raíces laterales que emergen de las raíces principales (Bashan y Levanony, 1990).
- Por la invasión a través de pelos radicales lisados y dañados ocurrida durante el crecimiento de la planta.
- Por penetración directa a través de la lámina central seguida de actividad pectinolítica una vez que la bacteria entra a las hendiduras de la epidermis que cubre la raíz lateral emergente (Bashan y Levanony, 1990).

### 1.1.2) Efecto de la inoculación de *Azospirillum* en plantas.

La inoculación de plantas con *Azospirillum* puede resultar con cambios significativos en varios parámetros del crecimiento de la planta, los cuales pueden o no afectar el rendimiento de la cosecha (Bashan y Levanony, 1990).

Los efectos más marcados de la inoculación de *Azospirillum* en plantas corresponden a cambios morfológicos en el sistema de la raíz, tales como:

- Incremento en la elongación de la raíz
- Aumento en el número de las raíces laterales, lo cual aumenta el volumen y longitud de las raíces.
- Aumento en el peso seco de la raíz.
- Aumento en el número y aparición temprana de los pelos de la raíz.
- Aumento en el área superficial de la raíz.
- Estimulación del exudado de la raíz.

Además también induce

- Incremento en el peso seco de la parte aérea
- Incremento en la cantidad de nitrógeno en hojas y granos
- Incremento en la altura de la planta
- Porcentajes mayores de germinación
- Incremento en el número de espigas y granos (Bashan y Levanony, 1990).

En experimentos de campo se ha demostrado que la inoculación de *Azospirillum* sobre la producción de gramíneas da como resultado un aumento en el rendimiento total del 10 al 30 % (Kapulnik et al. 1981). Algunos informes indican valores extremadamente altos 50-270% sobre controles no inoculados. También se han reportado incrementos moderados en la producción (20%) atribuidos a la inoculación con *Azospirillum* y algunos otros no han registrado respuesta (Kapulnik, 1987; Bashan y Levanony, 1990). Razón por la cual se requiere de una mayor investigación para su posible utilización como biofertilizantes.

La inoculación de *Azospirillum* fue considerada como un sustituto parcial de fertilización con nitrógeno. Sin embargo, datos contradictorios de Bashan y colaboradores en 1989 mostraron que la producción fue justo debajo de los niveles altos de fertilización con nitrógeno.

Un problema crucial de cualquier invernadero o experimento de campo llevado a cabo es la inconsistencia en la respuesta de las plantas a la inoculación, por lo que los resultados de experimentación en el campo no pueden ser reproducibles (Bashan y Levanony, 1990).

### 1.1.3) Modo de acción propuesto para *Azospirillum* en el crecimiento de las plantas.

El mecanismo principal por el cual, *Azospirillum* aumenta el crecimiento de las plantas es indeterminado. De cualquier manera se han propuesto los siguientes modos de acción:

- La fijación de nitrógeno que es aportado a la planta.
- Efectos hormonales que alteran el metabolismo y el crecimiento de la planta, aumento en el tamaño del sistema radicular, favoreciendo la absorción y transporte de agua y minerales.
- La actividad de la nitrato reductasa bacteriana en las raíces, lo que aumenta la acumulación de nitrógeno en las plantas inoculadas (Bashan y Levanony, 1990).

Uno de los modos de acción mas estudiados para estimular el crecimiento de la planta por la inoculación de *Azospirillum*, involucra la producción de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas producidas por la bacteria.

### 1.2) Sustancias reguladoras del crecimiento vegetal.

El término “sustancias reguladoras del crecimiento” (conocidas también como fitohormonas) es muy general y abarca a las sustancias tanto de origen natural como sintéticas que determinan respuestas en el crecimiento, metabolismo o desarrollo de la planta (Rojas y Ramírez, 1993).

Durante muchos años se creyó que las hormonas determinaban directamente los procesos del desarrollo y que actuaban sobre los grandes fenómenos como la emisión de raíces y de flores, etc.

En la actualidad existen evidencias suficientes para postular dos hechos básicos sobre la acción fundamental de las fitohormonas.

Las fitohormonas no actúan directamente a nivel del organismo sino de la célula, por ejemplo sobre la mitosis, el alargamiento celular, de modo que sus efectos se hacen sentir en todos los fenómenos citológicos afectados.

La acción básica de las hormonas ocurre sobre los ácidos nucleicos a nivel de la transcripción del mensaje (DNA→RNA) o de su traducción (RNA→Aminoácido).

Hay firmes evidencias de que las auxinas, giberelinas, citocininas, abscísinas (ABA) y óxido de etileno son producidas por las plantas, y son esenciales para su crecimiento y desarrollo. Además son producidas también por varias bacterias que viven en asociación con la planta a excepción del óxido de etileno y abscisinas (Rojas y Ramírez, 1993).

Una de esas bacterias es *Azospirillum*, en la que se han detectado auxinas, giberelinas, citocininas en el sobrenadante del medio de cultivo (Tien et al. 1979; Fulchieri et al. 1993).

La fitohormona producida en mayor cantidad por *Azospirillum* es el ácido indolacético (AIA). Las otras que se han detectado en baja concentración, pero en niveles biológicamente significativos son: ácido indol 3-butírico (IBA), indol 3-etanol, indol 3-metanol, varias giberelinas, y citocininas (Tien et al. 1979; Horemans et al. 1986; Crozier et al. 1988; Bottini et al. 1989).

La producción de fitohormonas bacterianas provoca cambios en la morfología de la raíz, después de la inoculación con *Azospirillum* (Barbieri y Galli, 1993; Dobbelaere et al. 1999).

Se ha reportado que *Azospirillum brasilense* sintetiza el AIA mediante tres vías metabólicas, dos vías dependientes de triptófano: indol 3-acetamida (IAM) e indol 3-piruvato (IpyA), y un paso independiente de triptófano. Datos recientes indican que la indol-3-piruvato descarboxilasa es una enzima común de ambas vías IAM e IpyA, en tanto que en la vía independiente de triptófano, el precursor aun se desconoce (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Lambrecht et al. 2000).

La cantidad de AIA producido depende de la especie y tipo de cepa así como de sus condiciones de cultivo, mejorándose con la adición de una fuente de nitrógeno, como  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , así como de triptófano (Omay et al. 1992).

## 2.1) Auxinas

El nombre auxina significa en griego crecer y es dado a un grupo de compuestos que estimulan el crecimiento, en los que están incluidos AIA, ácido indolbutírico (AIB), ácido indol láctico (AIL), indol 3-etanol e indol 3-metanol. El AIA es la forma predominante en las plantas. Las auxinas se encuentran a lo largo de toda la planta, pero altas concentraciones se han localizado en las regiones meristemáticas, en crecimiento activo (<http://www.plant-hormones>).

Las auxinas se localizan como moléculas libres o en formas conjugadas inactivas. Cuando se encuentran conjugadas, están metabólicamente unidas a otros compuestos de bajo peso molecular, este es un fenómeno que dificulta el análisis de su contenido. El AIA se ha reportado ligado como: AIA-éster, AIA-amida, AIA-glucosa y AIA-inositol, que es la forma como se transporta en la planta.

### *Efectos característicos*

El efecto principal de las auxinas corresponde a la estimulación del alargamiento celular o su inhibición según la concentración del producto, éste fue el efecto que más llamó la atención de los investigadores y se han utilizado incluso como herbicidas.

Los efectos de las auxinas en la planta son los siguientes:

- Aumentan el crecimiento de los tallos

- Promueven la división celular en el cambio vascular y diferenciación del xilema secundario
- Estimulan la formación de raíces adventicias
- Estimulan el desarrollo de frutos (partenocárpicos en ocasiones)
- Incrementa el fototropismo
- Promueven la división celular
- Promueven la floración en algunas especies
- Promueven la síntesis de etileno (influye en los procesos de maduración de los frutos)
- Favorecen el cuaje y la maduración de los frutos
- Inhiben la abscisión ó caída de los frutos

La concentración de auxina libre en plantas varía de 1 a 100 mg/Kg peso fresco. En contraste, la concentración de auxina conjugada es sustancialmente más elevada (Rojas y Ramírez, 1993).

### 1.2.2) Giberelinas

La información sobre la biosíntesis de giberelinas proviene principalmente de estudios sobre el hongo *Gibberella fujikuroi*, el que se descubrió en Japón en la década de los 30's, a partir de estudios de plantas de arroz enfermas que

alcanzaban grandes alturas. Los Japoneses llamaban a la enfermedad *bakanac* (plántula tonta), la cual era causada por el hongo *Gibberella fujikuroi* (<http://www.plant-hormones>).

Las giberelinas representan un grupo de diterpenoides acídicos encontrados en angiospermas, gimnospermas, helechos, algas y hongos.

Se han aislado más de 68 giberelinas libres siendo las más comunes: GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> y GA<sub>9</sub> y 16 conjugadas, muchas de las cuales representan intermediarios en la ruta sintética y carecen de actividad hormonal (<http://www.plant-hormones>).

Las giberelinas se ligan con azúcares, la molécula GA-azúcar representa una forma de almacenamiento que se encuentra en los cotiledones y se hidroliza en la germinación.

Las formas conjugadas pueden servir como medio de almacenaje y transporte, o bien para dar un balance entre forma activa y forma inactiva que permita la homeostasis o equilibrio orgánico.

### *Efectos característicos*

Los efectos que producen en la planta, se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Incrementan el crecimiento de tallos
- Interrumpen el período de latencia de las semillas, haciéndolas germinar y movilizan las reservas en azúcares

- Inducen la brotación de yemas
- Promueven el desarrollo de los frutos
- Estimulan la síntesis de RNA mensajero.

(Rojas y Ramírez, 1993).

### 1.2.3) Citocininas

Las citocininas se sintetizan en los meristemos apicales de las raíces, aunque también se producen en los tejidos embrionarios y en las frutas. Se han encontrado algunos tipos como: Zeatina, Kinetina y Benziladenina (BAP).

#### *Efectos característicos*

Los efectos que producen en la planta, se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Estimulan la división celular y el crecimiento
- Inhiben el desarrollo de raíces laterales
- Rompen la latencia de las yemas axilares
- Promueven la organogénesis en los callos celulares
- Retrasan la senescencia ó envejecimiento de los órganos vegetales
- Promueven la expansión celular en cotiledones y hojas
- Promueven el desarrollo de los cloroplastos.

(Rojas y Ramírez, 1993).

### 1.2.4) Abscisina

La principal abscisina es el ácido abscísico (ABA) que se sintetiza en la planta a partir del farnesilpirofosfato.

#### *Efectos característicos*

En ciertos aspectos el ABA es un antigiberélico, pero no bloquea o inactiva el AG que actúa sobre los ácidos nucleicos probablemente al nivel de transcripción.

ABA y AG parecen actuar con el fitocromo, ya que adaptan a la planta al cambio estacional (Rojas y Ramírez, 1993).

El ABA se consideraba como un inhibidor del desarrollo y no un estimulante, hoy se sabe que estimula procesos fisiológicos aparentemente negativos que implican una suspensión del desarrollo pero que son del todo necesarios para la sobrevivencia de la planta.

Típicamente y de ahí su nombre él ABA promueve la abscisión o caídas de hojas, flores y frutos en interacción con otras hormonas. Otra característica de este ácido es inducir el letargo pues, al agregarlo a yemas de manzano *in vitro*, inhibe la apertura de la yema y el alargamiento del tallo (Rojas y Ramírez, 1993).

### 1.2.5) Óxido de etileno

Es otra hormona que se produce en las plantas pero no en bacterias. El etileno se produce en gran cantidad en los tejidos de los frutos carnosos al madurar, pero

también se ha comprobado su síntesis en el tallo y flores; se forma a partir del aminoácido metionina (Rojas y Ramírez, 1993).

### *Efecto característico*

Induce la síntesis de RNA y de proteínas. Se cree que ejerce su acción a través de un receptor, pero se discute si se liga con el etileno como tal o con un metabolito como etilenglicol. El etileno induce cambios en la expresión génica probablemente a través de una etilen-proteína.

El efecto característico es promover la maduración de los frutos lo que incluye el paso de almidones a azúcares.

El etileno interacciona en otros procesos orgánicos tales como la formación de raíces adventicias, la diferenciación del tallo y la raíz y en algunas especies en la inducción floral, apertura de la flor y cambio de sexo (Rojas y Ramírez, 1993).

### **Efecto de los reguladores del crecimiento en el desarrollo vegetativo del jitomate.**

El crecimiento de las yemas axilares puede eliminarse con la aplicación de ácido indolacético.

Las giberelinas se producen en las raíces y desempeñan un papel importante en la elongación del tallo. La aplicación de giberelinas exógenas provocan la elongación

entrenados, produciendo plantas más altas con tallos más delgados y con mayor peso seco (Nuez, 1995).

Para la identificación y cuantificación de fitohormonas se han utilizado tres métodos: la prueba de colorimetría con el reactivo de Salkowski, cromatografía de alta resolución (HPLC) y la técnica conjunta de cromatografía de gases (CG) y espectrometría de masas (EM), la cual ofrece mayor ventaja de los demás ya que pueden separar las muestras, permite conocer directamente el tipo específico y cantidad hasta en partes por millón (Hernández, 1997).

### b) Micorrizas

El término micorriza se refiere a la asociación entre hongos y raíces. Esta asociación es considerada como una simbiosis mutualista, donde la planta hospedero recibe nutrientes minerales por medio del micelio del hongo y el hongo obtiene compuestos de carbono de la fotosíntesis (Azcón-Aguilar y Bago, 1994; Durranco et al. 1999). Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas, sino también porque puede estar presente en la mayoría de los hábitats naturales (Sieverding, 1991).

Durante el proceso de formación de micorrizas, en el cual la planta acepta la colonización del hongo sin alguna reacción de rechazo, se lleva a cabo una serie

de interacciones de raíz-hongo lo que culmina en la integración de ambos, lo que facilita la adaptación de esta unidad en el contexto de suelo-planta ecosistema (Azcón-Aguilar y Barea, 1997).

El término fue acuñado por Frank en 1885 quién a la vez clasificó a las micorrizas en dos tipos: ectotrofa y endotrofa (Ferrera Cerrato, 1989).

Esta terminología fue modificada por Peyronel, Fassi, Fontana y Trappe, quienes introdujeron el término ectomicorriza, endomicorriza y ectoendomicorriza. Lewis en 1973 propone el cambio de ectomicorriza por micorriza envainada y propone dividir la endomicorriza en tres categorías por considerar estos grupos mas uniformes: a) micorriza vesículo arbuscular, b) micorriza ericaceae, c) otros (Ferrera Cerrato, 1989).

Actualmente las micorrizas se agrupan en siete tipos que se han clasificado, con base en criterios estructurales, funcionales y taxonómicos:

1) ectomicorrizas, 2) ecto-endomicorrizas, 3) ericoides, 4) orquidioides, 5) monotropoides, 6) arbutoides, 7) endomicorrizas o micorrizas arbusculares (Sieverding, 1991).

Las ectomicorrizas se caracterizan porque los hongos forman un manto compacto de varias capas alrededor de la raíz, pero sólo a una profundidad de una o dos capas celulares, creciendo entre las células corticales del hospedero para formar la llamada red de Hartig. Esta penetración entre las células corticales y no a través

ellas da lugar al término ectotrofo, que significa que se alimentan en el exterior. Las ectomicorrizas se encuentran en árboles de hoja ancha como el roble y en coníferas como el pino y el abeto, e incluyen a miembros del grupo *Ascomycotina* y con mayor frecuencia, de los *Basidiomycotina*. Los cuerpos fructíferos de los últimos se ven comúnmente en el suelo de los bosques; por ejemplo: las setas de las especies *Boletus*, *Leccinum*, *Amanita*, *Russula* y *Lactarius* (Deacon, 1988).

Las ecto-endomicorrizas colonizan superficialmente formando un manto de impacto de varias capas alrededor de la raíz, pero sólo a una profundidad de unas pocas capas celulares, creciendo entre las células corticales del hospedero para formar la llamada red de Hartig, pero también crecen a través de las células corticales de la raíz.

Las micorrizas arbutoides, monotropoides, ericoides, y orquídioides se asocian con plantas que carecen de clorofila como las *ericaceas*, *orquídeas*, y *monotropa* que es una angiosperma no fotosintetizadora. El último caso es de particular interés porque uno de los hongos simbioses es una especie de Basidiomyceto que también forma ectomicorrizas típicas en árboles forestales, el hongo parece actuar como puente entre el árbol y *monotropa*, suministrando a ésta los carbohidratos obtenidos del árbol (Deacon, 1988).

En virtud de que en este trabajo se emplearon Hongos Micorrízico Arbusculares (HMA), a continuación se expone información más detallada de este tipo de hongos.

### 1.3.1) Micorrizas Arbusculares (Endomicorrizas)

La historia de la micorriza arbuscular se remonta a hace 400 millones de años, en el periodo Devónico, evidencias fósiles y moleculares apuntan a esta época como el principio de la asociación entre antecesores de las actuales plantas terrestres y de los actuales hongos formadores de micorrizas arbusculares Zigomicota, orden Glomales (<http://invam.caf.wvu.edu/mycinfo/taxonomy/glomaceae/vesicles>).

Desde entonces, los HMA y plantas han evolucionado conjuntamente hasta hoy día, esto constituyó un hecho importante en la evolución de los seres vivos. Los vegetales mediante su capacidad fotosintética, transforman la energía solar en energía química, utilizable por otros organismos.

La planta fósil más antigua que ha podido ser estudiada pertenece al género *Rhynia* y data de hace 370 millones de años, de ella se han obtenido microfotografías de las raíces en donde se aprecia claramente la presencia de una formación fúngica en su interior de gran similitud con las especies de hongos formadores de micorrizas arbusculares actuales.

La universalidad de esta simbiosis implica una gran diversidad en las características taxonómicas de los hongos y las plantas implicadas. Hay efectivamente una gran diferencia en la morfología del tipo de micorrizas y esto es reflejado en el resultado de las relaciones fisiológicas (Gianinazzi-Pearson, 1984; Alcázar-Aguilar y Bago, 1994; Smith et al. 1994).

### 3.1.1) Ecología

Estos microorganismos son de distribución mundial y se encuentran en diferentes ecosistemas. Las micorrizas son muy comunes en una amplia gama de plantas herbáceas y también en algunos árboles (sicomoro, álamo), tanto en el medio agrícola como en el natural (Deacon, 1988).

En cuanto a las estructuras formadas, el tipo de colonización y la cantidad de especies vegetales y fúngicas se considera que los HMA son los de mayor importancia y los que más ampliamente se encuentran distribuidas tanto a nivel geográfico como dentro del reino vegetal. Este tipo de micorrizas se encuentra en condiciones naturales en la mayoría de los cultivos tropicales y subtropicales de interés agronómico. Se estima que aproximadamente el 95% de las especies vegetales conocidas establecen de forma natural y constante este tipo de simbiosis con hongos del suelo (Sieverding, 1991).

Las plantas no micotróficas pertenecen a la familia de las *Crucíferas*, *Chenopodiaceae*, *Cyperaceae*, *Caryophyllaceae* y *Juncaceae* (Azcón-Aguilar y Bago, 1994).

### 1.3.1.2) Características

Los hongos micorrízicos arbusculares al asociarse con las raíces presentan las siguientes características:

- Crecen a lo largo de las raíces, pero no forman un manto externo, lo que permite el desarrollo normal de las raíces.
- Crecen entre y dentro de las células corticales en donde forman dos tipos de estructuras que son los arbusculos y las vesículas y a veces esporas.

Los arbusculos son estructuras típicas de todos los HMA estos presentan un sistema de ramificación parecido a un árbol (figura 2c) y son los responsables de la transferencia bidireccional de nutrientes entre los simbioses.

Las vesículas no se encuentran en todos los HMA, estas son estructuras globosas e irregulares con diámetros de 100-800  $\mu\text{m}$  (figura 2b) que actúan como órganos de reserva de lípidos (<http://www.ffp.csiru.au/research/mycorrhiza/vam.html>).

Estas en ocasiones pueden contener una especie de espora de paredes delgadas, pero no se conoce la naturaleza de las mismas.

Las verdaderas esporas tienen diferentes tamaños (180 a 500  $\mu\text{m}$ ) y presentan formas diferentes pero típicas (figura 2a), lo que permite distinguirlas de las esporas formadas por otro tipo de hongos, tales como clamidosporas o zigosporas.

El color de las esporas de los HMA va del amarillo al negro, pasando por café (Azcón-Aguilar y Barea, 1997).

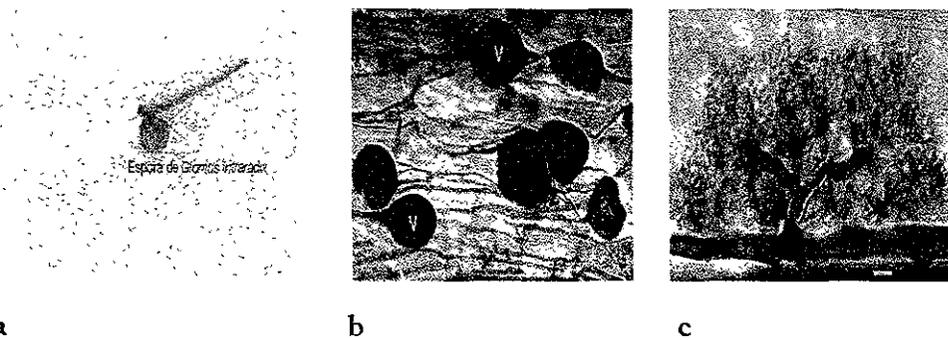


Figura 2. a = espora, b = vesícula, c = arbúsculo

La demostración de que no todos los HMA forman vesículas, determinó que se cambiara el nombre micorrizas vesículo arbusculares por el de micorrizas arbusculares.

### 3.1.3) Taxonomía

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares se encuentran dentro de la siguiente clasificación Taxonómica.

Reino:	Mycetae
Subreino:	Thallophyta
División:	Eumycota
Subdivisión:	Zigomicotina
Clase:	Zigomicetos
Orden:	Mucorales
Familia:	Endogonaceae

Dentro de la familia *Endogonaceae* se propuso el orden Glomales el cual se subdivide en varios grupos ver figura 3.

<http://invam.caf.wvu.edu/mycinfo/taxonomy/glomaceae/vesicles>.

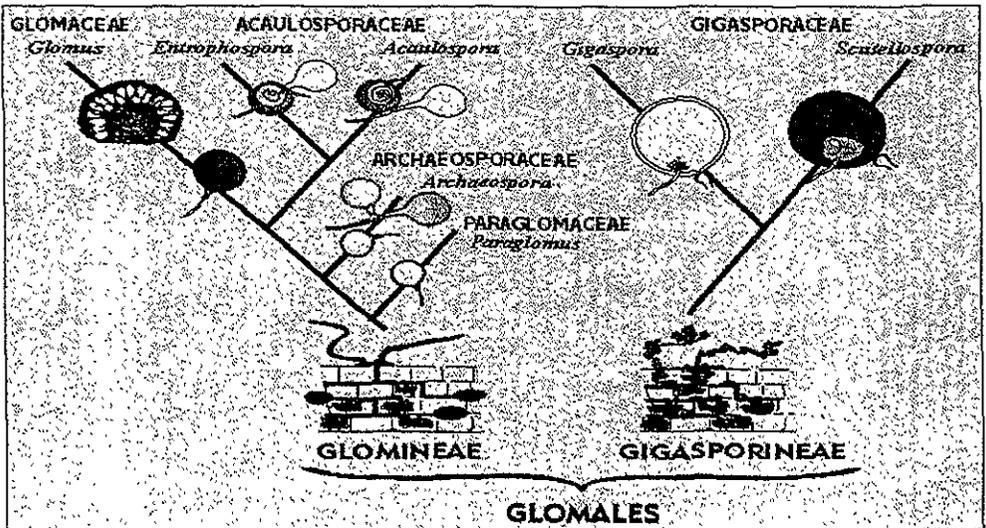


Figura 3. Orden Glomales

### 3.1.4) Formación de simbiosis

A pesar de la escasez de información sobre experimentos, ha sido aceptado que el establecimiento de la simbiosis debería ser el resultado de un continuo diálogo molecular entre la planta y el hongo, que se da a través del intercambio de señales químicas. El resultado de este diálogo finalmente dependerá de la expresión del genoma de ambos hongo-planta (Azcón-Aguilar y Barea, 1997).

Las hifas al llegar a la superficie de la raíz, usualmente forman un apresorio en las células epidermales llamados "pass" y se extienden a través de espacios intercelulares de las células corticales de las raíces hasta alcanzar la corteza interior en donde crecen dentro de las células y desarrollan los arbusculos, los cuales tienen un tiempo de vida de 4 a 14 días. El contacto de las hifas internas favorecen el desarrollo por lo que las hifas crecen a lo largo de la superficie de la raíz formando mas puntos de penetración y creando una red tridimensional de micelio que interacciona con partículas del suelo.

Los hongos en la colonización intracelular, como en el caso de arbusculos están siempre rodeados por células hospedero, además, la formación de arbusculos representa la superficie celular que está en contacto con los simbiotes. Estas facilidades permiten el intercambio de metabolitos entre el hospedero y el hongo. De hecho, los arbusculos son el principal sitio de transferencia de nutrientes

minerales, del hongo para la planta y compuestos carbonados, de la planta al hongo (Azcon-Aguilar y Barea, 1997).

El registro de datos por Smith y Gianinazzi-Pearson en 1988 indican que la longitud de las hifas en la raíz externa que está creciendo en el suelo alcanzan un promedio de 1 m/cm de raíz, pero estos valores pueden alcanzar hasta 10-14 m/cm de raíz. Este micelio se extiende varios centímetros fuera de la superficie de la raíz y actúa como puente en la zona de depleción de nutrientes alrededor de la raíz y absorbe iones poco móviles del suelo. Las hifas extraradicales también interaccionan con componentes de la rizosfera, y junto a ellos contribuyen para la formación de agregados estables, lo que mejora la estructura del suelo y consecuentemente la aireación y drenaje en el mismo. citado por Bethlenfalvay y Linderman, 1992.

#### 1.3.1.5) Efecto de HMA en el ecosistema planta suelo.

Se ha demostrado que las plantas micorrizadas absorben agua, nitrógeno y minerales particularmente fósforo de manera más eficiente que las no micorrizadas (Deacon, 1988).

Otras actividades de los HMA corresponden a la protección de la planta contra estrés biótico, protege a la planta de la invasión de hongos patógenos, tales como:

*Phytophthora, Gacumanomyces, Fusarium, Thielaviopsis, Phythium, Rhizoctonia, etc.*

Los mecanismo sugeridos para explicar la acción benéfica del hongo en la simbiosis micorrízica arbuscular incluye: el mejoramiento de la nutrición de la planta, competencia y desplazamiento de microorganismos patógenos de los sitios de infección y colonización de las raíces, inducción de cambios en la morfología y anatomía del sistema de la raíz, además de inducir cambios en la población microbiana y activación de mecanismos de defensa de la planta (Linderman, 1994).

Los HMA también cooperan con la planta contra el estrés abiótico a través de aligerar las deficiencias de nutrientes y mejorar la tolerancia a la desecación y al efecto de salinidad, y un aumento de la tolerancia a la contaminación (Barea et al. 1993).

### 1.3.1.6) Interacción de hongos MA con componentes de la microbiota del suelo.

Las interacciones microbianas envuelven a los HMA, que parecen jugar un papel importante en ecología y aprovechamientos biotecnológicos, para mejorar sistemas sostenibles de planta-suelo (Tabla 1).

La simbiosis MA puede modular la actividad y el número de componentes microbianos en los alrededores del suelo, dando el camino para formar la micorrizosfera (Azcón-Aguilar y Barea, 1997).

**Tabla 1. Interacción de MA con microorganismos benéficos del suelo.**

Tipos de microorganismos	Resultado de la interacción
Bacterias fijadoras de nitrógeno (Biofertilizante)	Fijación de nitrógeno, transferencia de nitrógeno
Solubilizadores de fósforo (Biofertilizante)	Uso de roca fosfórica y fosfatos orgánicos como una fuente alternativa de fósforo
Fitoestimuladores (Productores de hormonas)	Establecimiento de las plantas tiernas, raíces fuertes
Biopesticidas y Bioprotectores	Incremento de la resistencia, tolerancia a la enfermedad de la raíz
Bacterias y hongos relacionados con la formación de agregados estables (ecosistemas biorremediadores)	Mejorando la calidad del suelo

(Azcón-Aguilar y Barea, 1997)

### 1.3.1.7) Efectos de los fertilizantes en la actividad de HMA.

Hay muchas publicaciones que muestran que al incrementar la fertilización con fosfatos solubles usualmente se disminuyen los niveles de colonización de HMA, la cantidad de micelio externo, la densidad del desarrollo arbuscular y el número de puntos de entrada de micorrizas (Barea, 1991).

Los fertilizantes de nitrógeno disminuyen la formación de HMA, así como su actividad, pero como en el caso con fósforo, la respuesta en campo no es predecible porque ellos dependen del nivel inicial de nutrientes en suelo y en la propiedad de adaptación endófito. El efecto de fertilizantes N, P, K, son obviamente complejos y dependen de muchas variables (Azcón-Aguilar y Barea, 1997).

### 1.3.1.8) Micorrizas en Horticultura

El interés de los horticultores en los hongos micorrízico arbusculares es debido a que mejora el transporte de agua, fósforo, Zn, Fe, Mg, Cu, S, Ca en situaciones de deficiencia (Tobar et al. 1994; Biró et al. 2000).

La primera evidencia de la influencia positiva de la simbiosis MA en la producción hortícola fue proporcionada por Menge y colaboradores (1977). Los que demostraron que la inoculación del propágulo de MA fue un prerrequisito para lograr el establecimiento de plantas cítricas en tratamientos con biocida.

El efecto benéfico de la inoculación con HMA se ha demostrado en:

- Cultivos tales como lechuga, ajo, espárrago, pimienta, fríjol, tomate, fresa, papas, sandías.
- Plantaciones tropicales: café, cacao, papaya, piñas, chirimoya.
- Floricultura, plantas de follaje, flores, tal como rosas, crisantemo.

Los efectos de la inoculación de HMA en la cosecha de horticultura incluyen:

- Aumento del desarrollo de plantas tiernas
- Reducción de los requerimientos de fosfatos
- Incremento de la sobrevivencia y desarrollo de plántulas
- Incremento de la resistencia a hongos patógenos
- Incremento de la resistencia a estrés abiótico

- Tolerancia a cambios de temperatura en cultivo de las frutas: manzana, durazno, aceituna, pera etc.
- Floración precoz
- Incremento de la uniformidad de la cosecha
- Mejora la raíz
- Incremento de la producción de frutas (Barea et al, 1993; Chang, 1994) (Azcón-Aguilar y Barea, 1997).

#### 1.3.1.9) Manejo de interacciones de la micorrizosfera en horticultura.

Algunos experimentos evidencian que algunas PGPR, como *Pseudomonas spp*, y *Bacillus spp*; al interactuar con HMA desarrollan una actividad sinérgica, lo cual mejora el crecimiento y nutrición de la planta (Azcón-Aguilar y Barea, 1992; Linderman, 1992; Hodge, 2000).

Las combinaciones compatibles de bacterias inoculadas, tales como *Rhizobium* fijadora de nitrógeno y HMA, puede resultar en un efecto mayor en el desarrollo de la planta en varios sistemas de microsimbiontes-leguminosas (Ames y Bethlenfalvay, 1987; Barea et al. 1988; Biró et al. 1993).

Influencia positiva de la asociación de *Azospirillum* y HMA ha sido reportada especialmente en plantas monocotiledóneas (Subba Rao, 1985; Garbaye, 1994 y Vázquez et al. 2000).

*Azospirillum* a través de la producción de fitohormonas favorece la colonización de HMA en *Lavandula*, *Lycopersicon esculentum* y *Medicago* (Satpal Singh y Kapoor, 1998).

Un efecto sinérgico de la inoculación de *Azospirillum* y HMA resulta en incrementos significativos en crecimiento y contenido de fósforo de las plantas, esta aplicación dual podría reemplazar la aplicación de fertilizantes de nitrógeno y fósforo y realzar la colonización de plantas por HMA (Bashan y Levanony, 1990; Trionfi, et al. 1999).

#### 1.4) Jitomate (*Lycopersicon esculentum*)

##### Historia.

Con la llegada de los españoles a América, el tomate formaba parte de los pequeños huertos de hortalizas del área mesoamericana, sin que su importancia económica fuera grande ya que era una hierba de las milpas.

El centro de origen del género *Lycopersicon* es la región andina que hoy comparten Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile. En esta área crecen espontáneamente las diversas especies de *L. esculentum* (Nuez, 1995).

Aún todavía son muchos los aspectos poco claros con respecto al origen y la domesticación del tomate cultivado. Sin embargo, hay algunos puntos con grado razonable de certeza.

- El tomate cultivado tuvo origen en el Nuevo mundo. No era conocido en Europa ni en el resto del Viejo Mundo antes del descubrimiento de América.
- El tomate había alcanzado una fase avanzada de domesticación antes de su llegada a Europa y Asia. Había ya una variedad de tipos caracterizados por la forma, acostillado, tamaño y color de los frutos.
- El antepasado más probable del tomate cultivado es el tomate pequeño silvestre (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) que crece espontáneamente en las regiones tropicales y subtropicales de América y se ha extendido a lo largo de los trópicos del Viejo Mundo.

#### Características.

El tomate es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva anualmente. La planta puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta, y el crecimiento es limitado en las variedades determinadas e ilimitado en las variedades indeterminadas, pudiendo llegar, en estas últimas, a 10 m en un año.

El fruto es una baya de forma globular, ovoide o aplastada cuyo peso oscila entre 5 y 500 g

Cuando la planta crece directamente de la semilla sin sufrir trasplantes desarrolla una potente raíz principal que le permite adaptarse a ecosistemas semidesérticos,

pero cuando la raíz principal se daña, como consecuencia del trasplante se desarrolla un sistema de raíces laterales llamadas raíces adventicias (Nuez, 1995).

La planta se desarrolla bien en un amplio rango de latitudes, tipo de suelos, temperaturas y métodos de cultivo, y es moderadamente tolerante a la salinidad. Prefiere ambientes cálidos, con buena iluminación y drenaje. La exposición prolongada a temperaturas inferiores a 10 °C, la escarcha, una iluminación diurna inferior a las 12 horas, un drenaje deficiente o un abono nitrogenado excesivo le afecta desfavorablemente (Nuez, 1995).

#### Situación taxonómica

El jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas.

Seguando a Hunzike (1979), la taxonomía generalmente aceptada es:

Clase:	Dicotiledóneas
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Subfamilia:	Solanoideae
Tribu:	Solaneae
Género:	<i>Lycopersicon</i>
Especie:	<i>esculentum</i>

(Nuez, 1995).

### **Consumo de jitomate.**

En cuanto al consumo se destacan los países de Centroamérica como grandes consumidores, México, Cuba, y la Republica Dominicana sobre todo, al igual que los del extremo sur, como Argentina y Uruguay. Los países centro andinos, como Perú y Bolivia, no son grandes consumidores, pese a estar en el centro de origen de la especie, con menos de 6 Kg por habitante/año. El resto de los países latinoamericanos presentan en la actualidad un consumo medio de 7 a 18 Kg.

Del total de la producción de tomate en América latina, los cuatro principales países productores son: Brasil (35.8%), 2. México (22.5%), 3. Argentina (11.7%) y 4. Chile (6.2%) (Nuez, 1995).

### **Importancia Nutricional**

El valor nutritivo del tomate no es muy elevado (Tabla 2). Según un estudio realizado por Stevens 1974 sobre las principales frutas y hortalizas de EE.UU, el tomate ocupa el lugar 16 en cuanto a concentración relativa de un grupo de 10 vitaminas y minerales (Nuez, 1995).

Tabla 2. Valor nutritivo medio del tomate por 100 g de producto comestible

(Nuez, 1995).

Residuos	6.0%	Caroteno	0.5mg
Materia seca	6.2g	Tiamina	0.06mg
Energía	20.0Kcal	Riboflavina	0.04mg
Proteínas	1.2g	Niacina	0.6mg
Fibra	0.7g	Vitamina C	23.0mg
Calcio	7.0mg	Valor nutritivo medio	2.39
Hierro	0.6mg	VNM por 100g de materia seca	38.5

#### Requerimientos nutritivos del cultivo del jitomate.

El fósforo, calcio, potasio y nitrógeno tiene efectos marcados en el crecimiento y en la producción de la planta de tomate (Nuez,1995)

La deficiencia de fósforo se manifiesta primero en las hojas mas bajas y progresa hacia las hojas más jóvenes de la parte superior (Núez, 1995).

La deficiencia de nitrógeno en el tomate reduce el crecimiento, ocasiona amarillamiento uniforme en las hojas inferiores y reducción en la producción (Mueller, 1996).

#### Plagas que afectan el jitomate en invernadero.

La principal plaga es la mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) que es la plaga más común en el cultivo del tomate en invernadero. Este insecto excreta una sustancia azucarada y pegajosa sobre la cual crece un hongo de color negro.

Los pulgones son otra plaga que se encuentra en invernadero. Estos insectos chupan la savia de las hojas, lo que determina el enrollamiento de la misma, además de cubrirlas con una mezcla pegajosa y transmite diversas virosis (Nuez, 1995).

## 2.0) Material y Métodos

- **Origen de las cepas de *Azospirillum* y hongos micorrízico arbusculares.**

En el presente estudio se utilizaron las siguientes cepas:

*A. brasilense* Cd, Cepa de referencia donada por el Doctor Y. Okon. (ATCC 29710).

*A. brasilense* VS9, Cepa de colección de la Facultad de Química. Aislada de sorgo en Valle de Santiago, Gto.

Los inóculos de hongos micorrízicos fueron proporcionados por el Doctor Ronald Ferrera Cerrato del Colegio de Postgraduados.

*Glomus sp.* Zacatecas 19, Aislada de frijol doméstico de Zacatecas, México

*Glomus intraradix*, Cepa procedente de Estados Unidos.

- **Verificación de actividad de cepas de *Azospirillum*.**

Se observaron las características macroscópicas y microscópicas en medio Nfb semisólido.

- **Control de calidad del inóculo fúngico.**

Para determinar la presencia de esporas, se empleó el método de Gerdeman y Nicolson (Ferrera Cerrato, 1989):

a) En un vaso agregar 10 g de inóculo y 100 ml de agua

- b) Agitar mecánicamente durante 5 minutos
- c) Dejar reposar 3 minutos, con la finalidad de eliminar las partículas grandes por sedimentación
- d) Pasar la suspensión a través de una columna de tamices colocados en orden decreciente (375, 150, 44  $\mu\text{m}$  )
- e) Agregar nuevamente agua al decantado y repetir los pasos (a) al (c)
- f) La fracción de inóculo obtenida en cada tamiz se pasa a papel filtro cuadrículado para su posterior cuantificación.

*Para determinar la presencia de hongos micorrízico arbusculares se empleó la técnica de Phillips y Hayman, 1970, modificada por Kormanik y Mc Graw, 1982:*

- a) Cosechar las raíces.
- b) Cortar segmentos de raíz (corona, media, distal).
- c) Lavar con abundante agua para eliminar partículas de agrolita.
- d) Calentar las raíces en una solución de KOH al 10%, 10 minutos a 10 libras de presión (clareo).
- e) Eliminar la solución de KOH con agua destilada.
- f) Aplicar peróxido de hidrógeno al 10% por 3 minutos (blanqueo).
- g) Enjuagar con agua destilada para eliminar el peróxido de hidrogeno
- h) Sumergir en HCl al 10% y agitar por 3 minutos (acidificación), no enjuagar.

- i) Agregar la solución colorante( Azul tripano 0.05% en lactoglicerol) y calentar por 10 minutos a 10 libras de presión (tinción).
- j) Eliminar el exceso de colorante con lactoglicerol limpio (decoloración).

*Determinación del porcentaje de colonización micorrízico.*

Se requiere el montaje de raíces teñidas en portaobjetos para posteriormente evaluarse al microscopio óptico.

- a) Colocar las raíces clareadas y teñidas en cajas Petri con suficiente lactoglicerol.
- b) En un portaobjetos y con agujas de disección, colocar 10 segmentos de raíz de aproximadamente 1 cm, paralelamente unos a otros. Sobre las raíces adicionar gotas de lactoglicerol y colocar un cubreobjetos, teniendo cuidado de eliminar las burbujas.
- c) Para realizar la evaluación observar al microscopio con el aumento de 100X.
- d) De cada segmento observar 10 campos en los cuales si se observa la presencia de hifas, arbusculos y/o vesículas se considera como colonización.
- e) El porcentaje de colonización total se obtiene de la siguiente forma:

$$\% \text{ infección total} = \frac{\text{No. de campos infectados}}{\text{No. total de campos observados}} * 100$$

- Determinación del efecto de la inoculación de *Azospirillum* y hongos micorrízico arbusculares en *Lycopersicon esculentum*.

Para determinar el efecto de *Azospirillum* y hongos micorrízico arbusculares sobre el crecimiento de *Lycopersicon esculentum*, se realizó un bioensayo bajo condiciones de invernadero. Empleando un modelo unifactorial completamente aleatorizado con 11 tratamientos y 5 repeticiones.

Tratamiento
1. T (H <sub>2</sub> O)
2. T (Nfb líquido)
3. VS9
4. Cd
5. Acido Indolacético (AIA)
6. Acido giberelico (AG)
7. AIA+AG
8. <i>Glomus</i> sp. Zac 19
9. <i>Glomus intraradix</i>
10. <i>Glomus</i> sp. Zac 19+VS9
11. <i>Glomus intraradix</i> +VS9

#### *Obtención del inóculo bacteriano.*

La activación de *Azospirillum* se hizo en medio Nfb semisólido (Anexo 1) a 32°C y 72 horas de incubación, de estos cultivos se transfirió una asada a un matraz con medio Nfb líquido más cloruro de amonio (Anexo 1), el cual se incubó a 32°C, 200 rpm, 72 horas. Transcurrido este tiempo se tomó un mililitro de este cultivo y se

llevó a otro matraz con medio de cultivo Nfb líquido más  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se incubó a las condiciones anteriores.

En cada cultivo se ajustó la población celular a una absorbancia de 0.008 diluyendo con medio de cultivo estéril. Las lecturas se realizaron a 560 nm en un Espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec 3000.

### *Preparación de las soluciones de AIA, AG, y AIA + AG.*

Para la preparación de soluciones se emplearon reactivos con una pureza de 98%, Marca Sigma, la concentración de las soluciones fue la siguiente:

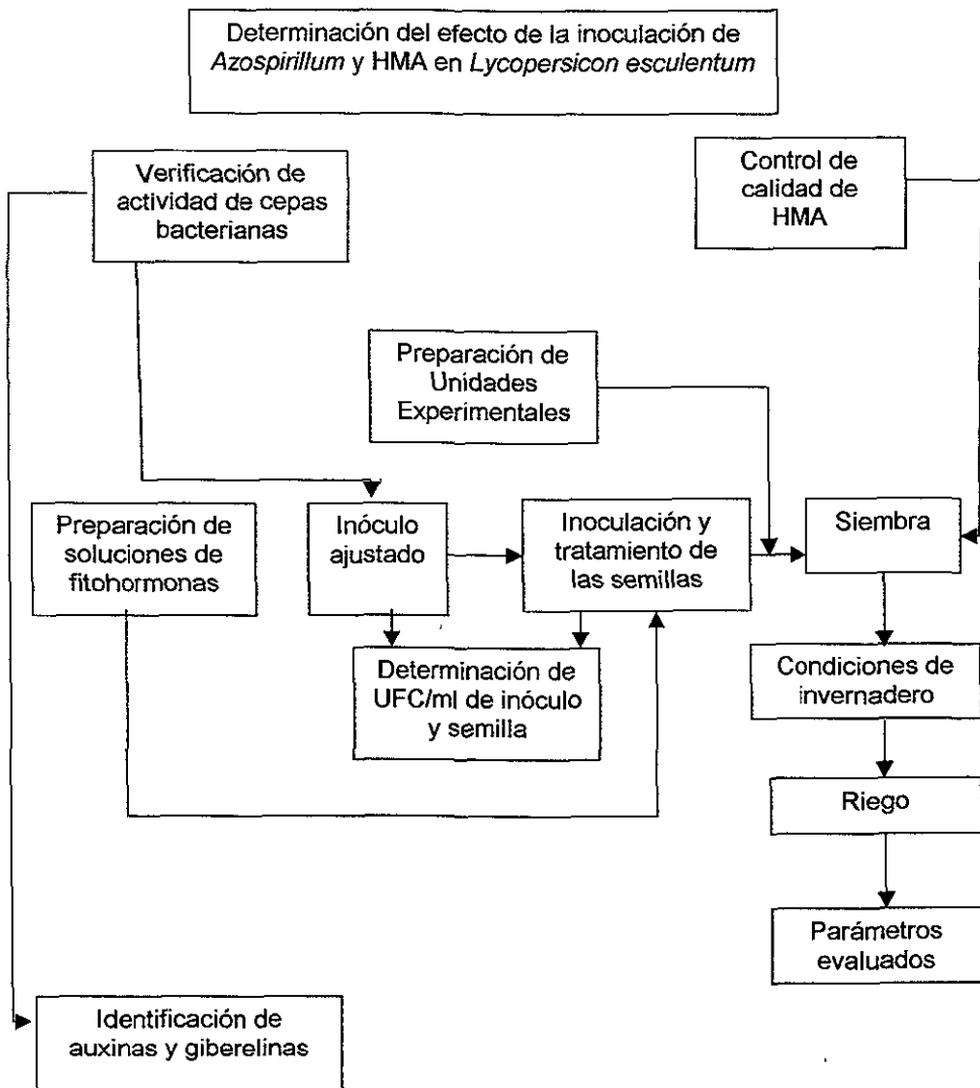
AIA: 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

AG: 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

AIA+AG: 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectivamente (Tien et al. 1979).

Estas soluciones se esterilizaron por filtración en un equipo Millipore con una membrana de 0.22 $\mu\text{m}$ .

## Organigrama general de actividades.



### *Preparación de las unidades experimentales.*

Cada unidad experimental estuvo representada por una maceta de 5 litros, la cual se lavó con agua y jabón y se desinfectó con alcohol al 70%, se llenó con agrolita estéril (sustrato) en condiciones de asepsia. Posteriormente se colocaron 3 pedazos de algodón estéril (aprox. 0.5 g cada uno) en diferente posición de la unidad experimental para que sirva de soporte y evitar el desplazamiento de las semillas.

### *Inoculación y tratamiento de las semillas de *Lycopersicon esculentum*.*

Se utilizaron semillas variedad Lucas tipo Saladette de crecimiento indeterminado.

### *Desinfección de semillas.*

Las semillas se desinfectaron con etanol al 96 % durante 5 segundos y con hipoclorito de sodio durante 5 minutos, después se realizaron 10 lavados con agua destilada estéril.

### *Inoculación de las semillas con *Azospirillum* ( Cd, VS9).*

Las semillas desinfectadas, se sumergieron en 10 mililitros del inóculo previamente ajustado a 0.008 ( $A_{560}$ ) y se dejaron durante una hora a temperatura ambiente. Los testigos se sumergieron en medio de cultivo (Nfb líquido) o agua estéril, durante una hora a temperatura ambiente.

### *Control de calidad del inóculo y del proceso de inoculación*

Se realizó mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de inóculo y por semilla inoculada. Para esta última determinación se utilizaron 10 semillas de cada tratamiento y se determinó con la técnica de dilución y vertido en placa.

### *Tratamiento previo a la inoculación fúngica (*Glomus intraradix* y *Glomus sp.* Zac 19).*

Las semillas desinfectadas, se sumergieron en agua destilada estéril una hora, a temperatura ambiente.

### *Aplicación de las soluciones de fitohormonas (AIA, AG, la mezcla de ambos).*

Las semillas desinfectadas, se sumergieron en las soluciones AIA, AG y AIA+AG, durante una hora a temperatura ambiente.

### *Siembra*

La siembra se realizó en condiciones de asepsia. En cada maceta se colocaron 3 semillas del tratamiento respectivo, a 2 cm de profundidad.

A los tratamientos con micorrizas, se agregó un gramo del inóculo de HMA sobre el algodón y posteriormente se colocaron las semillas tratadas con agua estéril.

A los tratamientos de micorrizas más *Azospirillum* (VS9) se agregó un gramo de inóculo de HMA sobre el algodón y posteriormente se colocaron las semillas inoculadas con VS9.

### *Condiciones de invernadero y cuidados del cultivo.*

El invernadero fue lavado con agua y jabón, posteriormente se limpiaron las mesas con hipoclorito de sodio al 5%. Un día antes de introducir las macetas se desinfectó con una mezcla de permanganato y formaldehído. Las condiciones climáticas se ajustaron a 32/20 °C (día /noche) y 70% de humedad relativa.

### *Riego de unidades experimentales.*

El riego de las macetas se llevó a cabo con agua estéril y la solución nutritiva propuesta por González, 1994 en el orden siguiente:

---

De 1 a 10 días se riega con agua estéril

---

De 10 a 15 días se riega con solución nutritiva al 50% de concentración\*

---

De 15 a 70 días se riega con solución nutritiva concentración completa.\*

---

\*Anexo 1.

Los parámetros evaluados y el periodo en que se llevaron a cabo se muestran a continuación:

Parámetros	7	TIEMPO DESARROLLO (DÍAS)	
		35	70
% Germinación	X		
Colonización de raíces por <i>Azospirillum</i>		X <sup>1</sup>	X <sup>2</sup>
Colonización de HMA		X <sup>3</sup>	X <sup>4</sup>
Altura		X	X
Número de hojas		X	X
Diámetro del tallo		X	X
Peso fresco parte aérea		X	X
Aparición de racimos florales			X
Peso seco de la parte aérea		X	X
Peso fresco de raíz		X	X
Peso seco de raíz			X
Determinación de Nitrógeno y Fósforo			X

### Porcentaje de Germinación.

Se determinó contando el número total de semillas germinadas en maceta a los 7 días por cada tratamiento, utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de Germinación} = \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número de semillas sembradas}} * 100$$

Presencia o ausencia de *Azospirillum* en Nfb  
 Número por gramo de raíz  
 Presencia o ausencia de hongos MA  
 Porcentaje de colonización de hongos MA

*Determinación de presencia o ausencia de Azospirillum en plantas de 35 días de desarrollo.*

Para esta determinación se tomaron 5 plántulas por cada tratamiento una por unidad experimental. Las raíces se lavaron con agua estéril, del sistema radical se cortaron diferentes secciones, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% y se lavaron 10 veces con agua destilada estéril, de aquí se tomó un segmento y se colocó en los tubos con Nfb ss, se incubó a 32 °C durante 72 horas y se observó la formación de la película blanca, el vire del indicador y se realizaron observaciones en el microscopio para ver movilidad y morfología.

*Determinación de presencia o ausencia de hongos micorrízico arbusculares en plantas de 35 días de desarrollo.*

Se hizo de acuerdo a la técnica de Phillips y Hayman, (1970). (Se describe en control de calidad del inóculo fúngico).

*Cuantificación de Azospirillum en plantas de 70 días de desarrollo.*

Se hizo la cuantificación de bacterias (*Azospirillum*) por el método del número más probable (NMP), por lo que se preparó un macerado de 1 g de raíz y se hicieron las diluciones pertinentes para llegar a concentraciones de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y se colocaron en tubos con medio Nfb semisólido por triplicado, se incubó a 32 °C, 72

horas. Se observó la formación de la película blanca, el vire del indicador y se realizaron observaciones al microscopio para ver forma y movilidad.

*Porcentaje de colonización de hongos micorrízico arbusculares en plantas de 70 días de desarrollo.*

Se hizo de acuerdo a la técnica de Phillips y Hayman, (1970). (Se describe en control de calidad del inóculo fúngico).

*Peso fresco de raíz.*

Se eliminó la agrolita sacudiendo 10 veces la raíz y se pesó.

*Peso seco de raíz y parte aérea.*

Las muestras se secaron en horno a 70 °C hasta peso constante.

*Determinación de Nitrógeno (Mitchell, H. L. 1972).*

En matraces de microkjedahl se digirieren 50 mg de muestra con un gramo de catalizador y 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. El digerido se afora con agua destilada a un volumen de 250 ml. Se transfirieren 5 ml del digerido a un matraz de 100 ml, se adicionan 1 ml de la solución de EDTA, 5 ml de la solución A, 10 ml de la solución B y 10 ml de la solución C y se lleva hasta el volumen con agua. La absorbancia se lee

después de una hora a una longitud de onda de 625 nm, en un Espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec 3000

La curva patrón se prepara adicionando cantidades variables de la solución estándar a 5 ml de papel filtro digerido como se indicó anteriormente. Se prepara con concentraciones de 0.0 µg/ml-50 µg/ml de nitrógeno.

➤ *La preparación de los reactivos se indica en el Anexo 2.*

#### *Determinación de fósforo total en plantas (Jackson, 1976)*

➤ *Preparación de la muestra de tejidos vegetales.*

El tejido vegetal fresco se somete a desecación en una estufa a temperatura de 70 a 80 °C. Se colocan 0.2 gramos de tejido vegetal desecado y pulverizado en un matraz de 250 ml se añaden 2 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado. Se agita el matraz con un movimiento giratorio, con el fin de humedecer toda la masa del tejido. Se coloca sobre el baño de vapor de agua durante 10 minutos y a continuación, sobre una placa de calefacción eléctrica a temperatura de 180 a 200 °C, (La reacción se llevó a cabo en una campana de extracción) se hierve la suspensión hasta que se reduce casi a sequedad. Esta predigestión requiere de 45 minutos.

➤ *Digestión de las muestras en HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HClO<sub>4</sub>*

Se enfría ligeramente el matraz en donde se hizo la digestión. Después se agregan 2 ml de la mezcla ternaria de ácidos (HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HClO<sub>4</sub>), la digestión se prolonga

a temperaturas de 180 a 200 °C hasta que aparecen los vapores blancos de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{HClO}_4$  y una espuma parda-verdosa de  $\text{MnO}_2$  para posteriormente quedar como una solución clara después de la volatilización de los ácidos. La digestión se detiene cuando los residuos que quedaron en el matraz son claros y blancos y, están ligeramente húmedos con el  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . El residuo queda así en condiciones adecuadas para la determinación de los constituyentes minerales elementales.

El matraz que contenía el residuo se enfría y se le añaden 5 ml de HCl concentrado. Se agita el matraz con un movimiento giratorio y se limpia las paredes con la varilla de vidrio, la disolución se vierte en un tubo de 22x175 calibrado de 50 ml, posteriormente se hace otro lavado con 10 ml de HCl 6 N y se vierte en el mismo tubo y se lleva al volumen con  $\text{H}_2\text{O}$ . Se deja toda la noche y se decanta para eliminar los residuos.

Se toma una alícuota de 10 ml y se agregan 10 ml de solución de Vanadato-Molibdato en un matraz de 50 ml, se lleva al aforo con agua destilada, se deja reposar 30 minutos y por último se lee la absorbancia a una longitud de onda de 470 nm.

La curva se preparó transfiriendo alícuotas de 0.1 a 1.0 mg de fósforo a un matraz volumétrico de 50 ml. Se añaden 10 ml del reactivo de molibdato de amonio-vanadato de amonio. Se mezcla y diluye al volumen. Después de 30 minutos, se lee

la absorbancia a una longitud de onda de 470 nm, en un Espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec 3000

➤ *Preparación de reactivos* (Anexo 2)

*Análisis Estadístico.*

Para la realización del análisis de los resultados, se utilizó un ANOVA completamente aleatorizado con un nivel de significancia de 0.05. También se hizo un análisis de comparaciones múltiples de DUNCAN en el software SPSS versión 9.0.

- *Cuantificación de Auxinas y Giberelinas producidas por Azospirillum in vitro.*

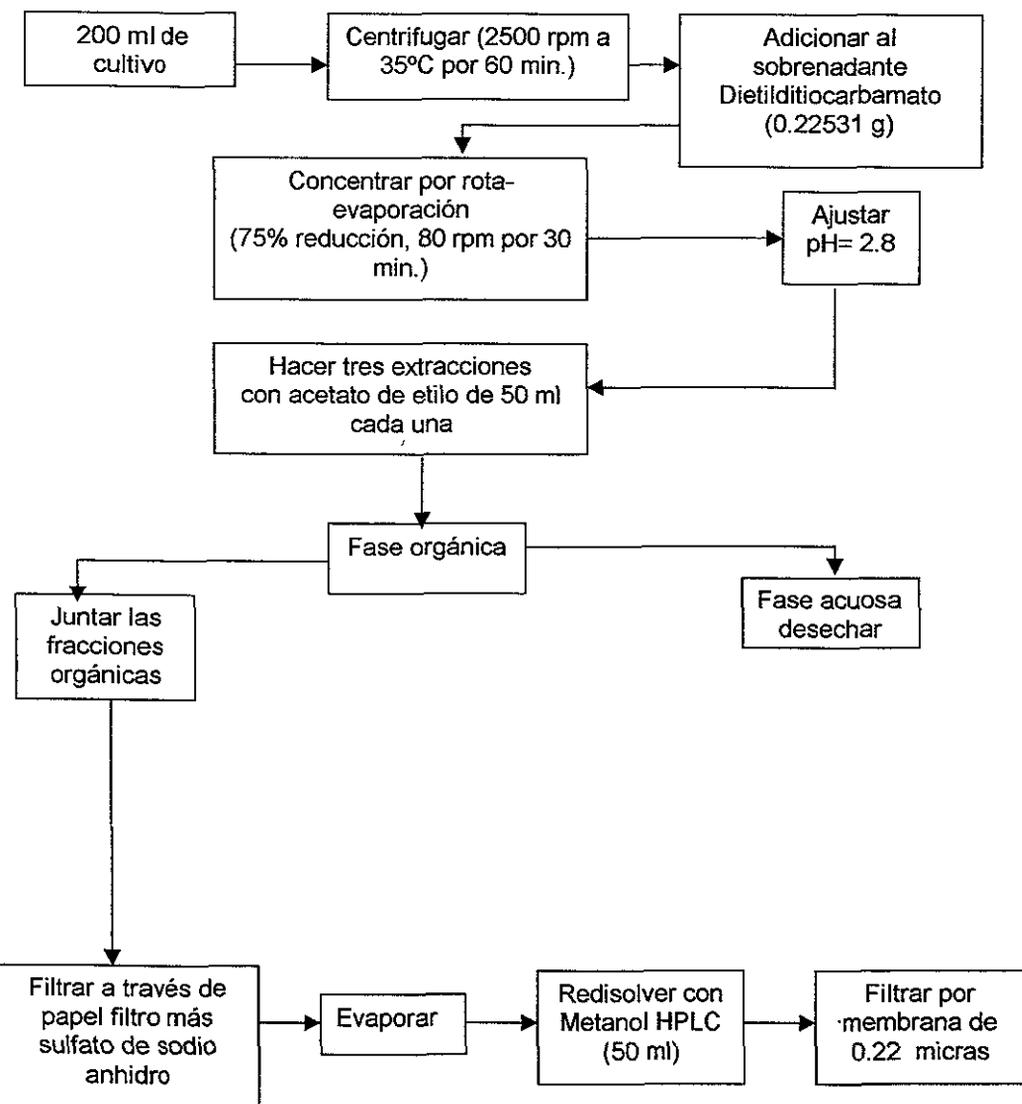
*Obtención de los cultivos de Azospirillum para HPLC.*

La activación de las cepas se llevó a cabo en tubos de ensayo con medio Nfb semisólido y se incubaron a 35 °C durante 72 horas

La adaptación se realizó en medio Tyler líquido (Anexo I) con NH<sub>4</sub>Cl y triptófano (0.1 g/litro) por 72 horas, a 32 °C 125 rpm.

Su propagación se realizó por duplicado en matraces erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de medio Tyler líquido con NH<sub>4</sub>Cl y triptófano. Los matraces se incubaron 3 días a 32°C y 125 rpm.

Diagrama 1. Preparación de los extractos para el análisis por HPLC de las cepas VS9 y Cd (Tien et al. 1979).



### *Determinación de fitohormonas por HPLC.*

Se utilizó un cromatógrafo Beckman con un loop o inyección de 20  $\mu$ l, con una columna C-18 ODS-DAPS Ultraesfera analítica 4.6 mm diámetro interno X 25 cm de largo. Partícula de 5 micrómetro. La velocidad de flujo fue de 1 ml / minuto.

Al inicio la fase móvil fue MeOH : H<sub>2</sub>O (35:65), con un pH de 2.5, a los 20 min. cambia a MeOH puro, todas las muestras fueron analizadas a temperatura ambiente.

Las fitohormonas se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención de estándares de AIA, AG (100 ppm) y la cuantificación se hizo mediante la comparación de las áreas de los estándares con las muestras.

### 3.0) Resultados y Discusión.

- Verificación de actividad.

En los cultivos de *Azospirillum* en Nfb a las 24 horas de incubación se confirmó la formación de una película blanca a 2 ó 3 milímetros abajo de la superficie, la que entre las 48 y 72 horas de crecimiento migró hacia la superficie y se observó el vire del indicador lo que indica que fija nitrógeno en condiciones microaérofílicas. En cuanto a las características microscópicas se observó una bacteria vibrioide con movimiento helicoidal.

- Control de calidad del inóculo de hongos micorrízico arbusculares.

Las raíces del inóculo presentaron una colonización de 90% y se observaron hifas, vesículas y esporas.

- Tabla 3. Estandarización de inóculo bacteriano

Cepa	Absorbancia de inóculo ajustado*	UFC/ml de inóculo	UFC/semilla
VS9	0.008	$9 \times 10^5$	$2 \times 10^2$
Cd	0.008	$1 \times 10^5$	$3 \times 10^3$

\*A<sub>560</sub>

Los resultados de la tabla 3 indican que se logró la concentración que reportan como óptima para la inoculación de cereales y vegetales que corresponde a  $10^5$ -  $10^6$

*Resultados y Discusión*

UFC/ml (Bashan et al. 1989; Okon y Kapulnik, 1986; Morgenstern y Okon, 1987).

En tanto que Hadas y Okón, (1987) indican para tomate *in vitro* concentraciones mayores que  $10^8$  UFC/ml.

En la literatura hay informes en trigo que indican que una concentración de inóculo de  $10^8$ - $10^{10}$  UFC/ml usualmente tienen efecto inhibitorio y bajos niveles no tienen efecto.

En cuanto a las UFC/semilla se observa una mayor adhesión de la cepa Cd respecto a la cepa VS9, debido probablemente a que la primera forma agregados, los cuales ayuden a mejorar la adhesión a la semilla.

- **Efecto de los tratamientos sobre la germinación.**

Los resultados de la **Tabla 4** muestran que el medio de cultivo Nfb y la inoculación con HMA tuvieron un efecto detrimental en la germinación de las semillas. En tanto que la inoculación con la cepa Cd y la adición de AIA aumentaron el porcentaje de germinación. La respuesta variable registrada con las cepas bacterianas coinciden con los informes de Okon y Kapulnik (1986) y Bashan et al 1989. En cambio los resultados obtenidos con la adición de ácido giberélico no corresponden a lo esperado ya que se reporta que una de las funciones de esta fitohormona es la de promover la germinación (Rojas y Ramírez, 1993), por otro lado se observó que en la co-inoculación de *Glomus intraradix* + VS9, *Glomus sp.* Zac19

+ VS9 la germinación fue mayor que cuando se inoculan los hongos solos lo que se atribuye a la presencia de *Azospirillum*, ya que los HMA no producen sustancias que puedan ayudar en la germinación de semillas de *Lycopersicon esculentum* (Azcón-Aguilar y Barea,1997)

Tabla 4. Efecto de los tratamientos en la Germinación.

Tratamiento	% Germinación
Testigo (H <sub>2</sub> O)	93.33
Testigo (Nfb liq)	86.66
Cd	100.00
VS9	93.33
AIA	100.00
AG	93.33
AIA+ AG	100.00
<i>Glomus sp. Zac19</i>	80.00
<i>Glomus intraradix</i>	86.66
<i>Glomus sp. Zac19</i> + VS9	100.00
<i>Glomus intraradix</i> + VS9	100.00

- Colonización de *Azospirillum* y HMA

En cuanto a la presencia de la bacteria, las observaciones realizadas a los 35 días permitieron confirmar la colonización por *Azospirillum* y por los HMA en las raíces de plántulas, así como la ausencia en los tratamientos no inoculados, lo que se confirmó a los 70 días (Tabla 5) periodo en el que se observó que la colonización de

*Azospirillum* está en el orden de  $10^7$ , en tanto que en la co-inoculación *Glomus intraradix* + VS9 está de  $10^5$  y *Glomus sp. Zac19* + VS9  $<10^5$ , lo que se atribuye a la competencia que se establece entre ambos microorganismos por colonizar el interior de las raíces.

Tabla 5. Colonización de *Azospirillum* y HMA

Tratamiento	P/A <i>Azospirillum</i> (35 días)	P/A HMA (35 días)	NMP <i>Azospirillum</i> (70 días)	% Colonización HMA (70 días)
Testigo (H <sub>2</sub> O)	-	-	-	-
Testigo (Nfb liq)	-	-	-	-
Cd	+	-	$1.86 \times 10^7$	-
VS9	+	-	$1.59 \times 10^7$	-
AIA	-	-	-	-
AG	-	-	-	-
AIA+ AG	-	-	-	-
<i>Glomus sp. Zac19</i>	-	+	-	46.4
<i>Glomus intraradix</i>	-	+	-	70.6
<i>Glomus sp. Zac19</i> + VS9	+	+	$<10^5$	42.2
<i>Glomus intraradix</i> + VS9	+	+	$2 \times 10^5$	75.2

P/A = Presencia o Ausencia, +/- crecimiento o no crecimiento

Los resultados de los dos hongos indican que fueron capaces de establecer asociación, pero uno de ellos *Glomus intraradix*, coloniza de manera más eficiente y que esta actividad fue ligeramente aumentada por la presencia de *Azospirillum*. En tanto que *Glomus sp. Zac19* + *Azospirillum* mostró una colonización ligeramente inferior a la que presentó cuando se inoculó sólo. Estos resultados concuerdan con

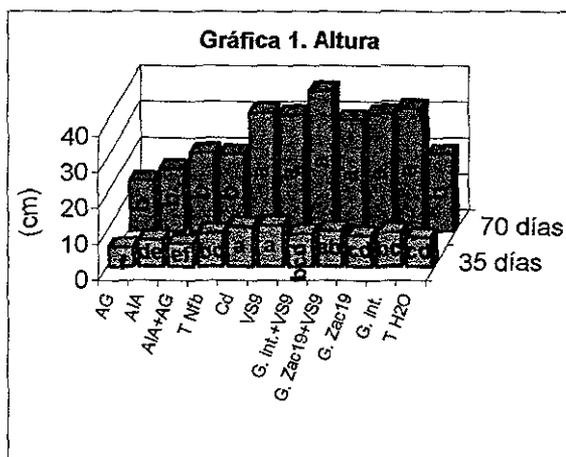
lo reportado por diferentes investigadores quienes indican que *Azospirillum* promueve la colonización micorrízica en *Lycopersicon esculentum* (Balota et al. 1995; Satpal Singh y Kapoor, 1998).

### Altura

En plantas de 35 días de desarrollo, el mayor efecto se observó con las cepas VS9, Cd y *Glomus sp.* Zac 19 + VS9; las dos primeras muestran diferencias significativas respecto a los otros tratamientos. (ver Gráfica 1 y anexo 3)

La inoculación con HMA no muestran diferencias significativas respecto al T(H<sub>2</sub>O), sin embargo cuando se co-inocula con *Glomus sp.* Zac 19 + VS9 se manifiesta diferencia significativa y aún cuando el efecto es menor al registrado con VS9 y Cd no hay diferencia significativa. Respecto a los tratamientos con ácido giberélico hay un efecto detrimental y se registran diferencias significativas con respecto a los testigos. (ver Gráfica 1 y anexo 3)

El análisis de los resultados obtenidos a los 70 días muestra que los tratamientos se distribuyen en dos grupos con diferencias estadísticamente diferentes. El primero incluye a todos los tratamientos inoculados con incrementos de 43 a 80% con respecto al testigo (H<sub>2</sub>O), en donde el mejor tratamiento corresponde a la co-inoculación de *Glomus intraradix* + VS9. el segundo grupo incluye a los testigos y los tratamientos con fitohormonas. (ver Gráfica 1 y anexo 3)



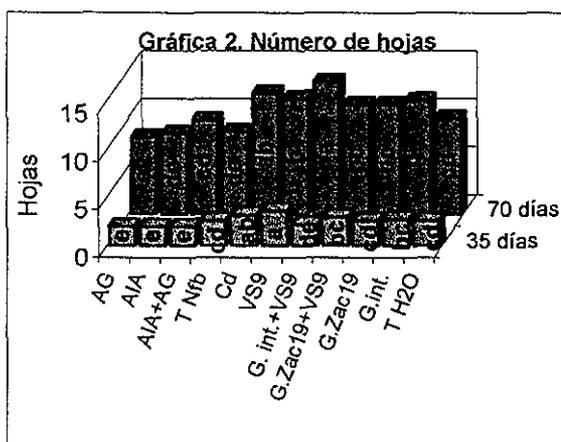
Lo anterior indica que las cepas bacterianas promueven este parámetro desde las primeras fases de desarrollo de la planta, en tanto que los HMA manifiestan este efecto en fases de desarrollo posteriores. Respecto al efecto de las fitohormonas puras, Castro y Malvolta en 1976 reportan que las giberelinas y auxinas puras incrementan la altura de las plantas de jitomate, citado por Rojas y Ramírez, (1993), lo cual no coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que las plantas a las que se les aplicaron fitohormonas puras no mostraron un efecto positivo en su crecimiento.

Nota: En las gráficas 1-10 los tratamientos que comparten alguna letra no presentan diferencias significativas

## Número de hojas

A 35 días de desarrollo las dos cepas de *Azospirillum* tienen efecto positivo sobre este parámetro, ya que presentan diferencias significativas respecto a los tratamientos con fitohormonas, T(H<sub>2</sub>O, Nfb), *Glomus sp. Zac19*, *Glomus intraradix* + VS9 y *Glomus sp. Zac19* + VS9. La inoculación de HMA, no muestran diferencias significativas respecto al T(H<sub>2</sub>O). (ver Gráfica 2 y anexo 3)

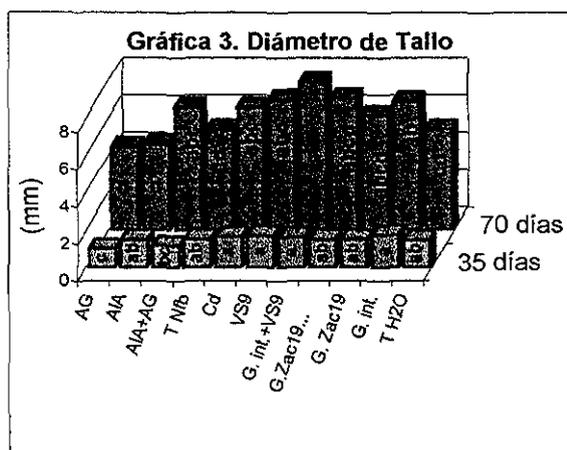
A 70 días, las cepas de *Azospirillum* conservan su efecto positivo. *G. intraradix* expresa efecto significativo al mismo nivel que la cepa VS9, y cuando estos dos se inoculan juntos, se observa un efecto sinérgico, aspecto que coincide con lo reportado por Azcón-Aguilar y Barea, 1997. En este parámetro tampoco se observó efecto de las fitohormonas. (ver Gráfica 2 y anexo 3)



## Diámetro de tallo

A 35 días de desarrollo, no existe diferencia significativa entre tratamientos excepto con la giberelina pura, que presenta acción negativa. (ver Gráfica 3)

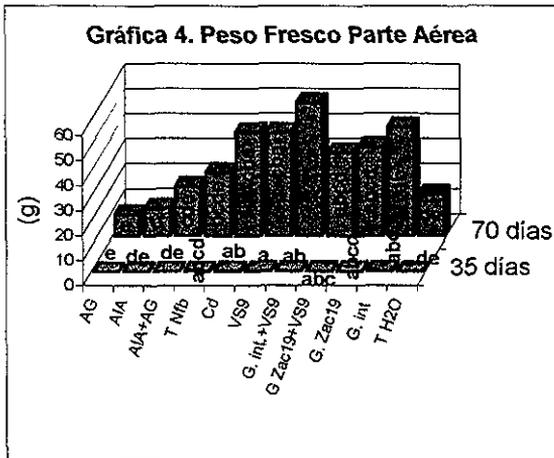
A 70 días, los únicos tratamientos que promueven el incremento del diámetro del tallo corresponden a *G. intraradix* + VS9 y en segundo término *G. Intraradix*. Los demás tratamientos inoculados no difieren significativamente de los testigos y nuevamente se registraron valores más bajos en los tratamientos con ácido giberélico y ácido indolacético lo que no coincide con Rojas y Ramírez, (1993) quienes reportan que las auxinas y giberelinas puras aumentan el crecimiento de tallos. (ver Gráfica 3 y anexo 3)



### Peso fresco de parte aérea

A 35 días de desarrollo, no se observan diferencias significativas entre tratamientos microbianos y el testigo del medio líquido (Nfb), en tanto que si hay diferencias con el testigo ( $H_2O$ ) y los tratamientos con fitohormonas, los que presentan los valores más bajos. (ver Gráfica 4 y anexo 3)

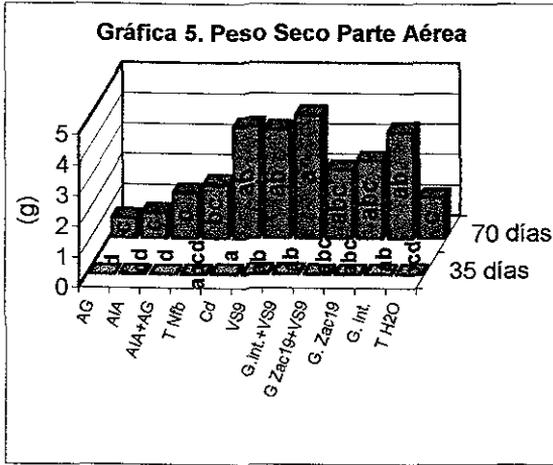
A 70 días, *G. intraradix* conserva su diferencia significativa respecto al T( $H_2O$ ), y en el tratamiento de co-inoculación con la cepa VS9 expresa, además, diferencias significativas contra el T(Nfb). (ver Gráfica 4 y anexo 3)



### Peso seco de parte aérea

A 35 días de desarrollo nuevamente se observa un grupo intermedio que comparte niveles con los grupos extremos. El mejor tratamiento corresponde a Cd, en segundo término VS9 y *G. Intraradix* inoculados solos o mezclados y en tercer término el otro HMA que corresponde a *Glomus sp. Zac19* solo o mezclado con VS9, en tanto que los valores más bajos corresponden a los tratamientos con fitohormonas, los que se encuentran en el mismo nivel de significancia que el testigo (H<sub>2</sub>O). (ver Gráfica 5 y anexo 3)

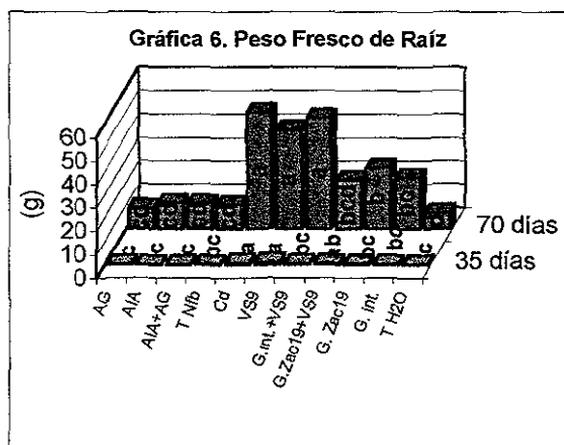
A 70 días, se observa un caso similar al del peso fresco, únicamente VS9, Cd. *G. intraradix* y *G. intraradix* + VS9 presentan diferencias significativas respecto al T(H<sub>2</sub>O), en donde la mayor respuesta corresponde a co-inoculación. Lo anterior coincide con otros reportes que demuestran el incremento de peso seco de la parte aérea en plantas por la inoculación de *Azospirillum* (Bashan y Levanony, 1990) lo que se atribuye a la acumulación de minerales en la parte aérea debido a una mejor absorción en el sistema radical (Bashan y Levanony, 1990). (ver Gráfica 5 y anexo 3)



### Peso fresco de raíz

A 35 días de desarrollo, únicamente los tratamientos inoculados con *Azospirillum* (VS9 y Cd) muestran diferencias significativas respecto a los tratamientos con fitohormonas puras, I(Nfb) y HMA. (ver Gráfica 6 y anexo 3)

A 70 días, el efecto de las cepas Cd y VS9 se mantiene y aumenta en el tratamiento *Glomus intraradix* + VS9, por lo que los valores registrados en estos tratamientos presentan diferencias significativas respecto a los testigos empleados. (ver Gráfica 6 y anexo 3)

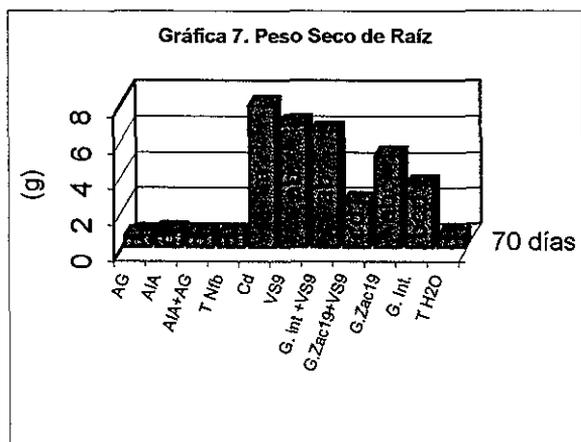


### Peso seco de raíz

A 70 días, las cepas Cd y VS9 muestran diferencias significativas respecto a los testigos; *G. intraradix* no es diferente de manera significativa a los testigos, pero cuando se co-inocula con la cepa VS9 el efecto se incrementa al nivel de la VS9 sola, en tanto que *Glomus sp. Zac 19* sola, es significativamente diferente al T(H<sub>2</sub>O) pero al inocularse en forma conjunta con la cepa VS9 el efecto disminuye drásticamente, al grado de no mostrar diferencia significativa respecto a los T(H<sub>2</sub>O, Nfb). Respecto a la acción de las fitohormonas puras, éstas siguen siendo las de menor efecto con valores similares a los testigos. (ver Gráfica 7 y anexo 3)

Estos resultados apoyan los obtenidos por Azcón-Aguilar y Barea en 1997 quienes indican que los HMA aumentan la longitud de la raíz por la presencia de hifas.

En cuanto a los resultados del efecto de las cepas Cd y VS9 de *Azospirillum* en peso fresco y seco de la raíz, coinciden con la literatura en la que se indica que *Azospirillum brasilense* mejora el crecimiento de la planta por su efecto directo en procesos metabólicos, los cuales inducen la proliferación de raíces laterales y pelos de la raíz e incrementa nutrientes para la planta. En consecuencia *Azospirillum brasilense* incrementa significativamente el peso de la raíz (Tien et al. 1979; Kapulnik et al. 1983 y Bashan, 1986).



Estudios respecto al efecto de esta bacteria en el desarrollo de la raíz han demostrado que esta causa el incremento en la longitud de la raíz, volumen de las raíces laterales, en el peso seco, en el número, volumen y densidad de los pelos de la raíz así como la estimulación del exudado de la raíz (Bashan y Levanony, 1990).

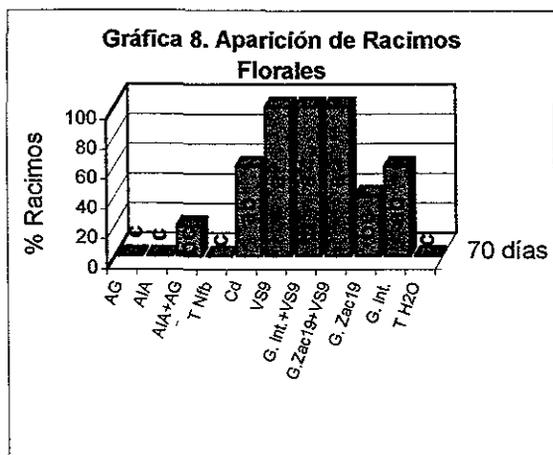
Los resultados sobre el efecto de las auxinas y giberelinas puras no coincide con lo reportado por Rojas y Ramírez, (1993), quienes indican que estas fitohormonas aumentan las raíces adventicias y alargan los tallos.

### Racimos florales

La mejor respuesta se obtuvo nuevamente con la cepa VS9 sola o mezclada con los HMA, tratamientos en los que se registraron diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos, el segundo lugar corresponde a la cepa Cd y a *Glomus intraradix* en los que la cantidad de racimos florales fue menor y en los que se registran diferencias significativas con respecto a los testigos, en tanto que cuando se inoculó con *Glomus sp* o se adicionó la mezcla de AIA y AG, aún cuando se registró la aparición de racimos, los valores obtenidos estadísticamente no son diferentes de los testigos. (ver Gráfica 8 y anexo 3)

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por otros autores, quienes indican que la inoculación con *Azospirillum* o con HMA acelera la floración (Bashan y Levanony 1990; Azcón-Aguilar y Barea 1997). Respecto a *Glomus sp. Zac 19* se tiene que la respuesta registrada en todos los parámetros estudiados fue siempre de las menores lo que se atribuye a que este hongo no es capaz de establecer una asociación eficiente con el cultivo ensayado, ya que en otros estudios al ser inoculado en plantas de café mostró un efecto sobresaliente con respecto a otros

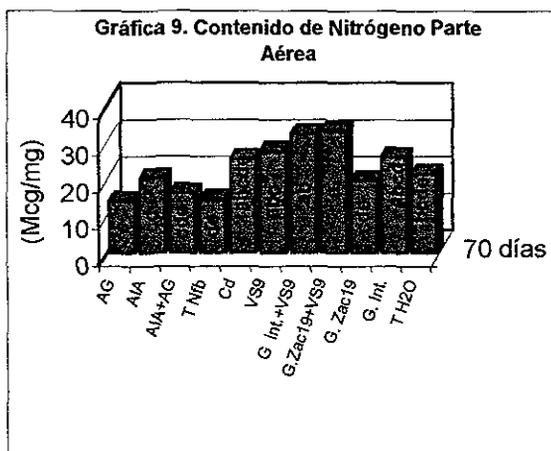
HMA, favoreciendo el aumento de la altura, área foliar, variables de peso seco y volumen de la raíz (Trejo-Aguilar 1997).



### Contenido de nitrógeno en parte aérea

Los resultados indican que los mejores tratamientos corresponden a la co-inoculación de HMA y *Azospirillum* (VS9) con diferencias estadísticas significativas con respecto a los testigos; en segundo término se encuentran los tratamientos inoculados con las dos cepas bacterianas y *Glomus intraradix* en donde el contenido de nitrógeno aumentó del 18 al 28% con respecto al testigo (H<sub>2</sub>O), en tanto que los tratamientos con *Glomus* sp. Zac 19 y adicionados con fitohormonas se registraron valores inferiores al testigo. (ver Gráfica 9 y anexo 3)

Johansen et al. (1994) indican que las hifas de los HMA favorecen la translocación de nitrógeno en las plantas. Por otra parte se ha confirmado que en plantas inoculadas con *Azospirillum* se registran contenidos más altos de nitrógeno (Ramírez-Gama y Luna Millán, 1995; Bashan y Levanony, 1990).



### Contenido de fósforo en parte aérea

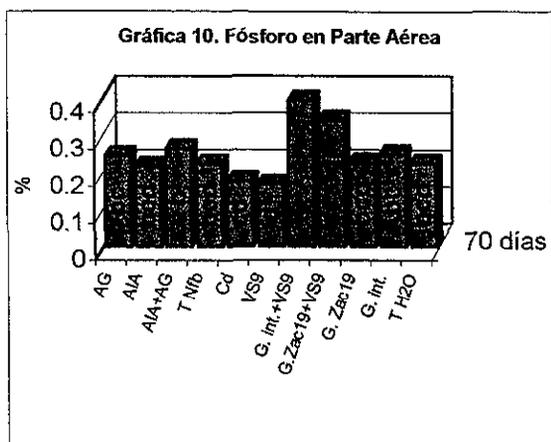
En este parámetro sólo se registró efecto en los tratamientos que corresponden a la co-inoculación de *Glomus intraradix* y *Azospirillum* (VS9). (ver Gráfica 10 y anexo 3)

En los resultados de fósforo y nitrógeno se observa un efecto sinérgico de la inoculación de *Azospirillum* y HMA, lo que resultó en un crecimiento significativo en *Lycopersicon esculentum*. Esta aplicación dual podría reemplazar la aplicación de

fertilizantes de nitrógeno y fósforo (Barea et al. 1983; Pakovsky, 1988; Bashan y Levanony, 1990).

En general a los 35 días, VS9 y Cd muestran el mejor efecto sobre el crecimiento de *Lycopersicon esculentum*, sin embargo, a los 70 días estos tratamientos fueron superados por el tratamiento *Glomus intraradix* + VS9, en la mayoría de los parámetros evaluados lo que indica un efecto sinérgico del hongo y la bacteria.

Diferentes autores asocian el mayor peso de la raíz con una mejor absorción de nutrimentos y la acumulación de minerales (Barton et al. 1986, Jain y patriquin, 1984; Kapulník et al. 1985; Morgenstern y Okon, 1987; Sarig et al. 1988), aspecto que se corroboró con el peso fresco y seco de la parte aérea, así como con el contenido de nitrógeno y fósforo registrado en los tratamientos indicados



Por otra parte los resultados obtenidos coinciden con la literatura, en donde se indica que plantas de 30 días inoculadas con *Azospirillum* al ser comparadas con testigos no inoculados muestran aumentos significativos en el tamaño y peso de la raíz, así como en la altura y peso de la parte aérea (Hadas y Okon, 1987; Kapulnik et al. 1981); en tanto que el efecto de los HMA se empieza a manifestar hasta después de los 30 días (Ferrera Cerrato, 1989) y que la colonización cambia de vegetal a vegetal (Subba Rao, 1985).

Respecto a la inoculación mixta la bibliografía indica que la colonización de los HMA es mejorada en presencia de bacterias promotoras del desarrollo vegetal entre las que se encuentra *Azospirillum* (Barea et al. 1983; Bonetti et al. 1984; Vasconcelos et al. 1984; Frioni et al. 1999). La influencia positiva de la asociación *Azospirillum* y HMA ha sido reportada fundamentalmente en plantas monocotiledóneas y con los resultados obtenidos en este trabajo se demuestra que el efecto positivo también se presenta en plantas dicotiledóneas.

- **Cuantificación de AIA y AG producidas por *Azospirillum in vitro*.**

En la figura 4 se muestran los tiempos de retención (TR) y los picos obtenidos con las soluciones estándar de AIA y AG. Las figuras 5 y 6 corresponden a los cromatogramas obtenidos con las cepas Cd y VS9, en esta se observa que con la cepa Cd no se registro ningún pico al TR que corresponde al AIA, en tanto que con

la cepa VS9 se presentan picos a los TR que corresponden a las dos fitohormonas en estudio.

Para calcular la concentración de las fitohormonas producidas por las dos cepas de *Azospirillum* se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (AIA,AG)} = \left( \frac{\text{Concentración estándar}}{\text{Área estándar}} \right) \times \text{Área (AIA,AG) producido por Cepa}$$

Los resultados se muestran en la tabla 6 en la que se observa que la concentración de AG producida por VS9 es superior a la obtenida con la cepa Cd lo que coincide con lo reportado por Hernández (1997) la que reporta concentraciones similares de AG para la cepa Cd, no obstante en este estudio si se reporto la producción de AIA, aunque en cantidades muy bajas, lo que se atribuye que en este estudio se emplearon condiciones de cultivo diferentes (Fructosa como fuente de carbono, agitación 125 rpm, 48 hrs de incubación ), mientras que Hernández utilizó Malato de sodio, 200 rpm, 24 hrs de incubación. Así mismo Bashan (1989) reporta la producción de este tipo de auxina.

La producción de fitohormonas *in vitro* no se pudo relacionar con el efecto observado *ex situ*, ya que en condiciones de invernadero ambas cepas produjeron incrementos muy similares en todos los parámetros evaluados y en los tiempos en los que se hicieron las determinaciones. En tanto que la cantidad de fitohormonas

roducidas *in vitro* resulto muy diferente. De este modo el efecto de la cepa Cd se tribuye a la producción de otras auxinas como AIL y AIB que también influyen en el desarrollo de la raíz y que no fueron determinados en este estudio, pero que han sido reportados por otros autores (Tien et al. 1979; Horemans et al. 1986; Crozier et al. 1988; Bottini et al. 1989) o bien a otros mecanismos tales como Fijación de nitrógeno o la actividad de la nitrato reductasa (Bashan y Levanony, 1990; Ramírez-Gama y Luna Millan, 1995).

Figura 4.

Cromatograma de soluciones estándar de AIA y AG

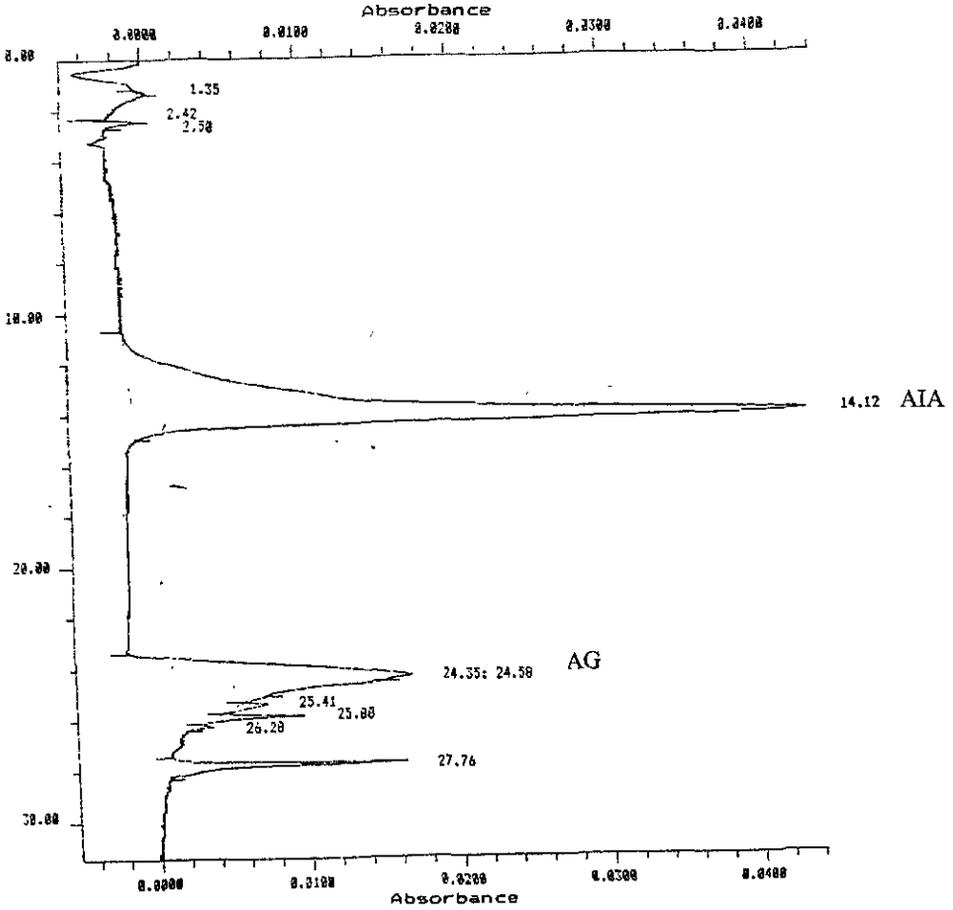
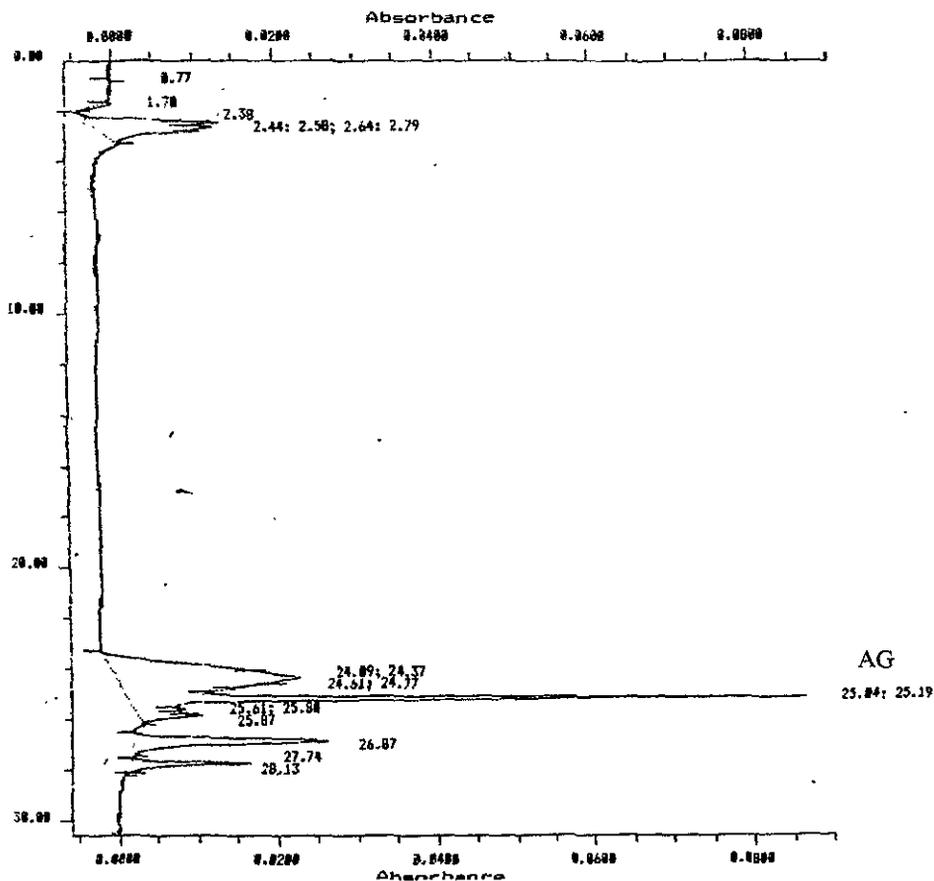


Figura 5  
Cromatograma de la cepa Cd



ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Figura 6.  
Cromatograma de la cepa VS9

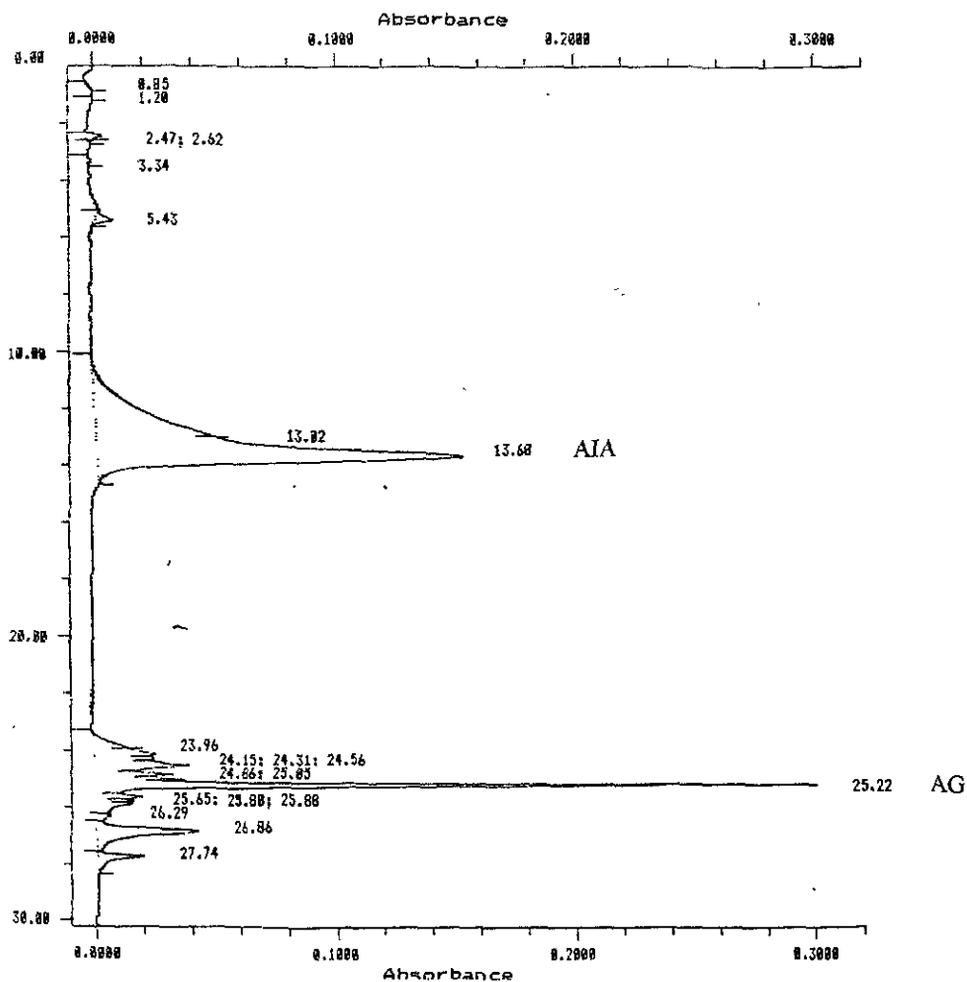


Tabla 6. Cuantificación de AIA y AG en cepas de *Azospirillum brasilense*.

Muestra	Ácido indol acético		Ácido giberelico	
	Área	Concentración (ppm)	Área	Concentración (ppm)
Resolución patrón de AIA	41.33	50		
Resolución patrón de AG	0		15.93	50
Control		0	47.76	149.86
S9	138.16	167.08	97.03	304.45

## Conclusiones

- ✓ Se confirmó el efecto de *Azospirillum* sobre el desarrollo de jitomate reportado en experimentos previos.
- ✓ Los hongos micorrízico arbusculares colonizan raíces de *Lycopersicon esculentum* y mejoran su desarrollo.
- ✓ *Glomus intraradix* resultó más eficiente que *Glomus sp. Zac 19*.
- ✓ La mejor respuesta en el desarrollo del jitomate fue inducida por la co-inoculación de *Glomus intraradix* y *Azospirillum* (VS9).
- ✓ El efecto de *Glomus sp. Zac 19* fue disminuido por la presencia de *Azospirillum* (VS9).
- ✓ La cepa VS9 produce ácido indol acético y ácido giberelico
- ✓ La cepa Cd sólo produce AG.

## Recomendaciones

- ✓ Las diferencias obtenidas con los dos tipos de hongos y cepas de *Azospirillum* probados confirmaron que en la producción de biofertilizantes multiorganismos se debe considerar la afinidad de los microorganismos empleados para obtener la respuesta esperada.
  
- ✓ La producción de fitohormonas bacterianas ofrece la posibilidad de su explotación a nivel industrial por lo que es recomendable realizar investigaciones que permitan establecer las condiciones ideales para obtener las mayores cantidades de estos productos.
  
- ✓ Para relacionar la producción de fitohormonas con su efecto en el desarrollo de la planta se recomienda hacer determinaciones en los exudados de las raíces o en el tejido de los vegetales inoculados con este tipo de bacterias.

## Bibliografía

- Ames, R. N., Bethlenfalvai, G. J. 1987. Localised increase in nodule activity, but no competitive interaction of cowpea rhizobia due to pre-establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytol.* 106: 207-215.
- Azcón-Aguilar, C. y Bago, B. 1994. Physiological characteristics of the host plant promoting and undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. En: S. Gianinazzi and H. Schüepp (Editors). *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. ALS, Birkhäuser, Basel. pp. 47-60.
- Azcón-Aguilar, C. y Barea, J. M. 1992. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En: M. J. Allen (Editor), *Mycorrhizal Functioning: An Integrative Plant-fungal Process*. Chapman and Hall, New York, pp. 163-198.
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulture* 68: 1-24.
- Baldani, V. L. D., Alvarez, M. A. de B., Baldani, J. I., y Döbereiner, J. 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum sp.* in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil.* 90: 33-46.
- Balota, E. L., López, E. S., Hungria, M., Döbereiner, J. 1995. Interactions and physiological effects of diazotrophic bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in cassava plants. *Pesq. Agropec. Bras.* 30, 1335-1345.
- Barbieri, P. y Galli, E. 1993. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. *Res. Microbiol.* 144, 69-75.
- Barea J.M. 1991. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae as modifiers of soil fertility. *Adv. Soil Sci* 15: 1-40.
- Barea, J. M., Azcón, R. y Azcón-Aguilar, C. 1993. Mycorrhiza and Crops. En: I. Tomme rup (Editor). *Advances in Plant Pathology Vol. 9. Mycorrhiza: A synthesis*. Academic Press, London, pp. 167-189.
- Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C., Azcón, R. 1988. Vesicular arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N<sub>2</sub>-fixation and N-uptake from soil as assessed with a N technique under field conditions. *New Phytol.* 106, 717-725.
- Barea, J. M., Bonis, A. F., y Olivares, A. 1983. Interactions between *Azospirillum* and VA mycorrhiza and their effects on growth and nutrition of maize and ryegrass. *Soil Soil. Biochem.* 15: 705-709.
- Barranco, A.; Ferrol, N., Bago, B., Barea, J. M., y Azcón-Aguilar C. 1999. Nutrición carbonada de los hongos formadores de micorrizas arbusculares: Mecanismos implicados. Departamento de Microbiología del suelo y sistemas simbióticos. Estación Exp. Del Zaidin, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada España.
- Barton, L. L., Johnson, G. V., y Orbock Miller, S. 1986. The effect of *Azospirillum brasilense* on iron absorption and translocation by sorghum. *J. Plant Nutr.* 9:557-565.
- Bashan, Y. 1986. Enhancement of wheat root colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd Following temporary depression of the rhizosphere microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1067-1071.
- Bashan, Y. 1998. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. *Can. J. Microbiol.* 44: 168-174.
- Bashan, Y. y Levanony, H. 1989. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 35, 936-944.
- Bashan, Y., Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36: 591-598.
- Bashan, Y., Ream Y., Levanony, H., & Sade, A. 1989. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plant to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Bot.* 67: 1317-1324.
- Bashan, Y., y Holquin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances

- (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43: 103-121.
- Becking, J. H. 1982. *Azospirillum lipoferum*-a reappraisal. En: Klingmüller, W. *Azospirillum Genetics*, physiology, ecology, Berk häuser Verlag, Basel. pp. 130-149.
  - Ben Dekhil, S., Cahill, M., Stackebrandt, E., Sly, L.L., "Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. Nov" *Syst. Appl. Microbiol.* 20: 72-77. 1997.
  - Bethlenfalvai, G. J. y Linderman, R. G. 1992. Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. ASA Spec. Publ., Madison, WI. 124 pp.
  - Biró, B., Péchy, K. K., Vörös, I., Takács, T., Eggenberger, P., Strasser, R. J. 2000. Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. *Applied Soil Ecology* 15:159-168.
  - Biró, B., Vörös, I., Köves-Péchy, K., Szegi, J. 1993. Symbiotic effect of *Rhizobium* bacteria and AM fungi on *Pisum sativum* in recultivated mine spoils. *Geo microbial. J.* 11, 275-284.
  - Bonetti, R., Oliverira, L. A., Magalhaes, F. M. M. 1984. População de *Rhizobium spp.* e correlencia de micorriza V. A. em cultivos de essenciaios florestais. *Pesq. Agrop. Brasil Vol 19 (s/n)*, 137-142.
  - Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D. y Pharis, R. P. 1989. Identification of gibberellins A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub> and iso-A<sub>3</sub> in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol.* 90, 45-47.
  - Crozier, A., Arruda, P., Jazmín, J. M., Monteiro, A. M. y Sandberg, G. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *A. brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology.* Nov. p.2833-2837.
  - Chang, D. C. N. 1994. What is the potential for management of vesicular-arbuscular mycorrhizae in horticulture? En: A. D. Robson, L. K. Abbott N. Malajezuk (Editors), *Management of mycorrhizas in Agriculture Horticulture and Forestry.* Kluwer, Dordrecht, pp. 187-190.
  - Deacon, J. W. 1988. Introducción a la Micología Moderna. Departamento de Microbiología. Universidad de Edimburgo. pp. 291-199.
  - Didonet, A. D. y Magalhaes, A. C. 1997. Growth and nitrite production by *Azospirillum* strains subjected to different levels of dissolved oxygen in the medium. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 29,11/12, pp. 1743-1746.
  - Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A, Van de Broek, A. y Vanderleyden, J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA productions on wheat. *Plant Soil* 212: 155-164.
  - Döbereiner, J. y Day J. M. 1976. Associative symbiosis in tropical grasses. Characterization of microorganisms and nitrogen fixing sites. pp. 518-538. En: W.W. Newton y C. J. Nyman (eds.), *symposium on y nitrogen fixation.* Washington State University Press, Pullman, Estados Unidos de America.
  - Eckert, B., Weber, O. B., Kirchof, G., Halbeitter, A., Stoffels, M., Hartmann, A., " *Azospirillum doebereineri* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C<sub>4</sub>-grass *Miscanthus*" *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:17-26.2001.
  - Ferrera-Cerrato, R. 1989. Rizosfera En: Ferrera-Cerrato, R. (Ed). *Ecología de la raíz.* Sociedad Mexicana de Fitopatología, Montecillo, México. pp 1-21
  - Froni, L., Minasian, H., Volfovic, R. 1999. Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. *Forest Ecology and Management* 115: 41-47.
  - Fulchieri, M., Lucangeli, C. y Bottini, Ruben. 1993. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedling roots. *Plant. Cell. Physiol.* 34(8): 1305-1309.
  - Garbaye, J. 1994. Helper bacteria; a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 128, 197-210.
  - Gianinazzi-Person. V. 1984. Host-fungus specificity in mycorrhizae. En: D. P. S. Verma and T. H. Hohn (Editors), *Genes Involved in Plant-Microbe Interactions.* Springer, Vienna. pp. 225-253.
  - González, G. J. I. 1994. " Tópicos selectos de la producción agrícola actual. Evaluación de sustratos en la

- producción hidropónica de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Licenciatura. FES Cuautitlan. UNAM.
- Hadas, R., y Okon, Y. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biol. Fertil. Soils*, 5: 241-247.
  - Hernández, O. P. 1997. "*Azospirillum* como productor de fitohormonas (auxinas y giberelinas) *in vitro*" Tesis de licenciatura. F.Q. UNAM. México.
  - Hodge A. 2000. Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiology Ecology* 32: 91-96.
  - Horemans, S., de Koning, K., Neuray, J., Hermans, R., y Vlasak, K. 1986. Production of plant growth substance by *Azospirillum sp.* and other rhizosphere bacteria. *Symbiosis* 2: 341-346.
  - <http://invam.caf.wvu.edu/mycinfo/taxonomy/glomaceae/vesicles.jpg>.
  - <http://www.ffp.csir.au/research/mycorrhiza/vam.html>.
  - <http://www.planthormones.bbsrc.ac.uk/gainplants/gibberellin.nomenclature.htm>
  - Jackson, M. L. 1976 Análisis químico del suelo. pp. 451-454.
  - Jain, D. K., y Patriquin, D. F. 1984. Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Appl. Environ. Microbiol.* 48; 1208-1213.
  - Johansen A. I. Jacobsen I., Jensen E. S. 1994. Hyphal N transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus associated with cucumber grown at three nitrogen levels. *Plant Soil* 160:1-9.
  - Kapulnik, Y. 1987. Yield response of spring wheat cultivars (*Triticum aestivum* and *Titurgidum*) to inoculation with *Azospirillum brasilense* under field conditions. *Biol. Fertil. Soils*. 4: 27-3.
  - Kapulnik, Y. M. Kigel, J., Okon, Y., Nur, I., y Hents, Y. 1981. Effect of *Azospirillum* inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. *Plant Soil*, 61:65-70.
  - Kapulnik, Y., Okon, Y. y Henis, Y. 1985. Changes in roots morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31: 881-887.
  - Kapulnik, Y., Sarig, S., Nur, I., y Okon, Y. 1983. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field-grown wheat. *Can. J. Microbiol.* 29: 895-899.
  - Kormanik, P.P. y McGraw, A. C. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots, En: *Methods and principles of Mycorrhizal Research*. N.C. Schenk (Ed.) The phytopathological society, Minnesota, U.S.A. 244 pp.
  - Lambrecht, Mark., Okon, Y., Broek Vande A. y Vanderleyden J. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. Elsevier Science.
  - Levanony, H., Bashan, Y., Romano, B., y Klein, E. 1989. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within Wheat root by immuno-gold labeling. *Plant soil*, 117: 207-218.
  - Linderman, R. G. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. En: G. J. Bethlenfalvai and R. G. Linderman (Editors). *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. ASA Spec. Publ., Madison, WI, pp. 45-70.
  - Linderman, R. G. 1994. Role of VAM fungi in biocontrol. En: F. L. Pfeiffer and R. G. Linderman (Editors), *Mycorrhizae and Plant Health*. APS Press, St. Paul. pp. 1-26.
  - Mitchel, H. L. 1972. Microdetermination of Nitrogen in Plant Tissues, *Journal of the AOAC* 55(1): 1-3.
  - Morgenstern, E., y Okon, Y. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Bio. Fertil. Soils*. 5: 241-127.
  - Mueller, K. 1996. Tomatoes and Horticultural Therapy Info. Keith Mueller's page. <http://www4.ncsu.edu/eos/users/k/hdmuelle/public/ho.html>.
  - Nuez, F. 1995. El cultivo del Tomate. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp. 793.
  - Okon, Y. & Kapulnik Y. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and Soil*. 90: 3-16.
  - Omay, S. H., Schmidt, W. A., Martin, P. 1992. Indoleacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under *in vitro* conditions. *Can. J. Microbiol.* Vol. 39, 187-192.
  - Pakovsky, R. S. 1988. Influence of inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Glomus fasciculatum* on

- sorghum nutrition. *Plant Soil*, 110: 283-287.
- Patriquin, D.G., y Döbereiner, J. 1978. Light microscopy observations of the trazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Can. J. Microbiol.* 24: 734-742.
  - Ramírez-Gama, R. M. y Luna-Millán, B. 1995. Simbiosis asociativas. En: Ferrera-Cerrato, R. Y J. Pérez Moreno (eds). *Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable*. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México. pp. 143-165.
  - Rojas, M. R. y Ramírez, H. 1993. Control hormonal de desarrollo de las plantas. Editorial LIMUSA. México. pp. 263.
  - Sarig, S., Blum, A, y Okon, Y. 1988. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (sorghum bicolor) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *J. Agr. Sci.* 110: 271-277.
  - Satpal Singh., Kapoor, K. K., 1998. Effects of inoculation of phosphate-solubilizing microorganisms and an arbuscular mycorrhizal fungus on mungbean grown under natural soil conditions. *Mycorrhiza* 7: 249-253.
  - Schloter, M., Kirchof, G., Heinzmann, J., Döbereiner, J. y Hartmann, A. 1994. Immunological studies of the wheat-root-colonization by the *Azospirillum brasilense* strain Sp7 and sp 245 using strain specific monoclonal antibodies. En: Nitrogen fixation with Non-legumes (Hegazi, N.A., Fayes, M. and Monib, M., Eds.), pp. 291-297, American University in Cairo Press, Cairo.
  - Sieverding, E. 1991. Vesicular Arbuscular Micorrhiza Management in tropical agrosistemas. Deutsche GTZ, GMBH Eschborn, 371 pp.
  - Smith, S. E., Gianinazzi-Pearson, V., Koide, R. y Cairney, J. W. G. 1994. Nutrient transport in mycorrhizas; structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. In: A. D. Robson, L. K. Abbott and N. Mlajezuk (Editors), *Management for Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry*. Kluwer, Dordrecht, pp. 103-113.
  - Steenhoudt, D., Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum* a free-living nitrogen- fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 487-506.
  - Subba Rao, N. S. 1985. Effect of combined inoculation of *Azospirillum brasilense* and vesicular arbuscular mycorrhiza on Pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Plant Soil*. 81, 283-286.
  - Tarrand, J., Krieg, N. R., Döbereiner, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum*, with description of new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980.
  - Tien, T. M; Gaskins, M. H., Hubbell, D. H. 1979. "Plant Growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their Effect on the Growth of Pearl millet." *Environmental Microbiology*, V: 37 May, pp. 1016-1024.
  - Tobar, R., Azcón, R. Barea, J. M. 1994. Improved nitrogen uptake and transport from <sup>15</sup>N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions, *New Phytol.* 126, 119-122.
  - Trejo- Aguilar, D. 1997. Ecología y comportamiento de la endomicorriza arbuscular en el cultivo de café (*Coffea arabica* L). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.
  - Van de Broek, A., Michiels, J., Van Gool, A. y Vanderleyden, J. 1993. Spantial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial nif H gene during association. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6, 592-600.
  - Vasconcelos, I., Almeida, R. J. De, Mendes, P. F. 1984. Ocorrência de rizobios e endomicorrizas em leguminosas arbóreas e arbustivas do Estado do Ceará, Brasil. *Cs. Agron. Fortaleza* (1/2) 45-52.
  - Vázquez, M. M., Cesar, S., Azcón, R., Barea J. M. 2000. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology* 15: 261-272.

## ANEXO 1

**Composición de la solución nutritiva.** Propuesta por González, 1994.

Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )	11.16 g
Nitrato de calcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ )	12.75 g
Fosfato monobásico de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2.35 g
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ )	9.58 g
Sulfato de hierro ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ )	0.31 g
Agua ( $\text{H}_2\text{O}$ )	17.5 L

La solución se preparó de la siguiente manera:

Se pesaron componentes para 17.5 litros de solución nutritiva, se disolvió en 2 litros de agua destilada, posteriormente se esterilizó la solución en autoclave y finalmente se llevó al volumen ajustándose el pH a 6.5.

Conductividad de la solución nutritiva a mitad de la concentración = 1.2 msiemens

Conductividad de la solución nutritiva concentración completa = 1.9 msiemens

### Medio Nfb semisólido

Este medio fue recomendado Tarrand y colaboradores (1978) para el aislamiento y caracterización primaria de *Azospirillum*.

Ácido succínico	5.0 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.2 g
NaCl	0.1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.02 g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.01 g
Fe EDTA (sol.1.64%)	4 ml
o $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.002 g
KOH	4.5 g
Azul de Bromotimol	2.0 ml
Agar	4 g
pH	6.8
Agua destilada	1000 ml

### Medio Nfb líquido + NH<sub>4</sub>Cl

Este medio presenta la misma composición del medio Nfb semisólido sin agar ni indicador, además de contener 1 g/l de NH<sub>4</sub>Cl. Se adiciona NH<sub>4</sub>Cl debido a que *Zoospirillum* fija nitrógeno en condiciones microaerófilas, pero es incapaz de crecer aeróbicamente en ausencia de este elemento.

### Medio TYLER

#### Composición:

Ácido succinato de sodio	2.5 g
Fructosa	2.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.0 g
NaCl	0.1 g
MgSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0.2 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.02 g
FeCl <sub>3</sub>	0.01 g
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.002g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
Triptófano	0.1 g
pH	6.8
Agua destilada	1000 ml

## ANEXO 2

- Soluciones utilizadas en la determinación de Nitrógeno.

**Solución A.**

Se disolvieron 4.8 gramos de NaOH en agua y diluir hasta un litro.

**Solución B.**

Se disolvió 5 gramos de fenol y 25 mg de Nitroprusiato de sodio en agua y diluir a 500 ml

**Solución C.**

Se disolvieron 2.5 g de NaOH, 1.87 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro, 15.9 g  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  y 5 ml de CLOROX, diluir a 500 ml

Almacenar las soluciones B y C en botellas color ámbar en refrigeración y llevar a temperatura ambiente antes de su uso.

**Solución EDTA.**

Se suspendió 1 gramo de EDTA en 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y se agregó NaOH concentrado ajustando el pH a 10.

**Catalizador de la digestión.**

Se pesaron 2 gramos de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 30 gramos de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . Con un mortero se mezcló hasta homogeneidad.

**Solución estándar de Nitrógeno.**

Se disolvieron 0.472 gramos de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y diluyó a 1 litro. Se tomó una alícuota de 10 ml de esta solución y diluyó a un litro. (Esta solución contenía 1  $\mu\text{g}$  de nitrógeno/ml).

- **Soluciones utilizadas en la determinación de Fósforo.**

Los reactivos que se utilizaron son:  $\text{HNO}_3$  concentrado y una disolución ternaria de los 3 ácidos, preparada mezclando 100 ml de  $\text{HNO}_3$  concentrado, 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y 40 ml de  $\text{HClO}_4$  al 60% (cualquier cantidad en la proporción en volumen 10:1:4) y se dejó enfriar antes de utilizarla.

**Disolución patrón de fósforo.**

Molibdato de amonio-vanadato de amonio en ácido nítrico.

Disolver 22.5 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  en 400 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Disolver 1.25 g de vanadato de amonio en 300 ml de agua hirviendo.

Mezclar la solución de vanadato de amonio con la de molibdato de amonio y dejar enfriar a temperatura ambiente. Añadir 250 ml de  $\text{HNO}_3$  concentrado y diluir a un litro.

**Estándar de fosfatos.**

Disolver 0.2195 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y llevar a un litro. Esta solución contiene 50 ppm de fósforo.

Resumen de resultados de las comparaciones múltiples de DUNCAN evaluados a 35 días de desarrollo de *Lycopersicon esculentum*

Tratamiento	Altura (cm)	Número de hojas	D. tallo (mm)	PFFA (g)	PSPA (*10 <sup>-2</sup> g)	PFR (g)
AG	5.60 f	2.0 e	1 c	0.118 e	1.028 d	0.302 c
AIA	7.68 de	2.0 e	1.46 ab	0.182 de	1.462 cd	0.262 c
AIA+AG	6.56 ef	2.0 e	1.16 bc	0.146 de	1.100 d	0.244 c
T (Nfb liq.)	9.46 bc	2.6 cd	1.50 ab	0.324 a b c d	2.850 abcd	0.364 bc
Cd	11.28 a	3.2 ab	1.62 a	0.462 ab	4.580 a	0.892 a
VS9	11.62 a	3.6 a	1.68 a	0.504 a	4.348 ab	1.026 a
<i>Glomus intraradix</i> +VS9	9.24 bcd	2.2 de	1.60 a	0.424 ab	4.266 ab	0.404 bc
<i>Glomus sp. Zac19</i> + VS9	10.06 ab	3.0 bc	1.46 ab	0.348 abc	2.948 abc	0.718 ab
<i>Glomus sp. Zac19</i>	8.78 cd	2.6 cd	1.46 ab	0.334 abcd	3.238 abc	0.518 bc
<i>Glomus intraradix</i>	9.68 bc	2.8 bc	1.72 a	0.372 abc	3.534 ab	0.404 bc
T (H <sub>2</sub> O)	8.18 cd	2.6 cd	1.44 ab	0.290 de	2.546 bcd	0.178 c

Los tratamientos que comparten alguna letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

PFFA= Peso Fresco Parte Aérea, PSPA= Peso Seco Parte Aérea, PFR= Peso Fresco Raíz, AG= Acido Giberelico, AIA= Acido indolacético, *Azospirillum* (VS9 y Cd), Micorrizas (*Glomus intraradix* y *Glomus sp. Zac 19*).

### ANEXO 3.

Resumen de resultados de las comparaciones múltiples de DUNCAN evaluados a 70 días de desarrollo de *Lycopersicon esculentum*.

Tratamiento	Altura (cm)	Número de hojas	D. tallo (mm)	PFPA (g)	PSPA (g)	PFR (g)	PSR (g)	% Aparición de racimos	% Fósforo	µg/mg de Nitrógeno
AG	14.20 b	8.0 e	4.46 d	8.71 e	0.642 c	9.16 cd	0.614 d	0 c	0.246 bc	14.106 e
AIA	17.56 b	8.4 de	4.60 d	10.99 e	0.814 c	11.32 cd	0.878 d	0 c	0.217 bcd	20.188 cde
AIA+AG	22.10 b	9.8 c d	6.60 abc	19.79 cde	1.464 c	11.10 cd	0.730 d	20 bc	0.265 b	16.284 cde
T Nfb liq.	21.60 b	8.6 de	5.40 cd	25.33 bcde	1.754 bc	10.60 cd	0.696 d	0 c	0.224 bcd	14.474 de
Cd	33.12 a	12.6 ab	6.58 ab	41.35 abc	3.644 ab	50.07 a	7.910 a	60 ab	0.177 cd	25.436 abcde
VS9	32.60 a	12.0 b	7.02 ab	41.12 abc	3.546 ab	42.53 a	6.858 ab	100 a	0.168 d	27.571 abc
<i>Glomus intraradix</i> + VS9	39.10 a	13.8 a	7.96 a	53.27 a	4.028 a	47.75 a	6.462 ab	100 a	0.395 a	32.211 ab
<i>Glomus sp. Zac19</i> + VS9	31.20 a	11.4 bc	7.06 ab	33.19 abcd	2.236 abc	21.17 bcd	2.524 cd	100 a	0.342 a	33.000 a
<i>Glomus sp. Zac19</i>	32.72 a	11.4 bc	6.18 bc	35.52 abcd	2.526 abc	26.33 b	5.100 abc	40 bc	0.228 bcd	19.693 cde
<i>Glomus intraradix</i>	34.22 a	11.8 b	6.90 ab	43.48 ab	3.470 ab	22.25 bc	3.476 bcd	60 ab	0.249 bc	26.030 abcd
T (H <sub>2</sub> O)	21.70 b	10.0 cd	5.4 cd	16.61 de	1.322 c	7.00 d	0.603 d	0 c	0.224 bcd	21.387 bcde

Los tratamientos que comparten alguna letra no presentan diferencias significativas.

PFPA=Peso Fresco Parte Aérea, PSPA= Peso Seco Parte Aérea, PFR= Peso Fresco Raíz, PSR= Peso seco de raíz, AG=Ácido Giberelico, AIA= Acido indolacético, *Azospirillum* (VS9 y Cd), Micorrizas (*Glomus intraradix* y *Glomus sp. Zac 19*).