

00369.

5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SELECCION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE
Azospirillum Y SU COMBINACION CON DIFERENTES
DOSIS DE FERTILIZACION EN DOS SISTEMAS DE
CULTIVO DE JITOMATE (*Lycopersicon esculentum* M.).

299034

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A
MARIA DEL CARMEN URZUA HERNANDEZ

DIRECTORA DE TESIS: M. EN C. ROSA MARIA RAMIREZ GAMA



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:	DR. DAVID FLORES ROMÁN
PRIMER VOCAL:	M. EN C. ROSA MARÍA RAMÍREZ GAMA
SEGUNDO VOCAL:	M. EN C. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO
TERCER VOCAL:	DR. RONALD FERRERA CERRATO
SECRETARIO:	M. EN C. LUCÍA YOLANDA VARELA FREGOSO
SUPLENTE:	M. EN C. MANUEL FAUSTINO RICO BERNAL
SUPLENTE:	DR. JORGE ENRIQUE GAMA CASTRO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EXPERIMENTAL
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

ASESOR:

M. EN C. ROSA MARÍA RAMÍREZ GAMA

SUSTENTANTE:

BIÓL. MARÍA DEL CARMEN URZÚA HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

*Porque gracias a su apoyo y sus consejos he podido
Llegar a esta meta.*

A mis hermanos y cuñados

Ariadna, Alfredo, Jovita, Jacqueline, Héctor, Ángel y Faustino

Por su apoyo en todo momento.

A mis abuelitos:

En donde quiera que se encuentren

*A la Maestra Rosa María Ramírez Gama por su
Infinita paciencia y el tiempo dedicado a la realización
De este proyecto.*

*A la Maestra Guadalupe Tsuzuki Reyes por su ayuda
Siempre desinteresada para que este experimento
Pudiera llegar a buen término.*

*A los integrantes del jurado: Dr. David Flores, M. en C.
Guillermo Avila, Dr. Ronald Ferrera, Dra. Lucía Varela, M.
en C. Manuel rico y Dr. Jorge Gama por el tiempo dedicado a
la revisión de este trabajo y las valiosas sugerencias que
ayudaron a mejorar el mismo.*

*Al Biólogo Agustín Vargas Vera por su
Asesoría en la parte estadística*

*A la Maestra Beatriz Luna por
Todas sus enseñanzas y por ser una
Verdadera Maestra.*

*A mi tía y a mi primo:
Donalda Hernández Aragón y Edgar Herrera
Porque somos una familia*

*A mis Tíos:
Javier Aragón y Alfonsina
Por transmitirme su experiencia en
El cultivo del jitomate*

*Al Biól. Gabriel Martínez
Por ser mi Maestro y amigo*

A la Q. F. B. Norma Trejo:

*Por su comprensión y apoyo para poder llegar
Al término del trabajo.*

A la Q. F. B. Adriana Mejía :

*Porque sus palabras de aliento siempre han sido
Valiosas en todo momento.*

*A la M. en C. Alma Miriam Novelo Torres:
Por tu valiosa amistad*

*A la Tuna Femenil de la Facultad de Psicología:
Sin ustedes la vida no sería tan divertida.*

*A todos los compañeros del Laboratorio de Microbiología
Experimental:*

*Rosalba, Mariel, Violeta, Tonatzin, Laura, Mónica, Dante y
Mario porque juntos hemos vivido contratiempos, triunfos, aciertos
Y errores que nos han ayudado a crecer y a salir adelante en todas
Nuestras actividades.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus
aulas y permitirme servir a nuestro país.*

INDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	3
1.0 Antecedentes	4
1.1 <i>Azospirillum</i>	4
1.1.1 Características Generales	4
1.1.2 Especificidad y Distribución de <i>Azospirillum</i>	4
1.1.3 Colonización de la Raíz por <i>Azospirillum</i>	5
1.1.4 Efecto de la colonización de <i>Azospirillum</i> en las plantas	5
1.1.5 Mecanismos de Acción	6
1.2 Jitomate	7
1.2.1 Origen	7
1.2.2 Características Generales	7
1.2.3 Variedades	7
1.2.4 Clima	8
1.2.5. Cultivo en Suelo	8
1.2.6 Siembra	8
1.2.6.1 Primera Época de Producción	8
1.2.6.2 Segunda Época de Producción	9
1.2.7 Cultivo sin suelo	9
1.2.8 Importancia Económica	10
1.3 Inoculación de <i>Azospirillum</i> en jitomate	11
1.4 Justificación	12
2.0 Objetivo General	12
2.1 Objetivos Particulares	12
3.0 Material y Métodos	13
4.0 Resultados y Discusión	24
5.0 Conclusiones y Recomendaciones	47
6.0 Aportaciones	47
7.0 Literatura citada	48
Anexo 1	53
Anexo 2	56

RESUMEN

La falta de alimentos es un problema que crece día con día; lo que ha conducido al abuso del empleo de fertilizantes químicos con la consiguiente contaminación del suelo y de los mantos freáticos. Por ello se han buscado alternativas que favorezcan la producción y que además no contaminen.

Una de estas alternativas corresponde a la utilización de rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal (por sus siglas en inglés PGPR). Estas bacterias favorecen el crecimiento y producción de diversos vegetales mediante mecanismos que no siempre están bien definidos.

Azospirillum es una bacteria que se ha empleado con gran éxito en la inoculación de gramíneas y pastos forrajeros, sin embargo la no especificidad de este microorganismo ha conducido al estudio de su interacción con otro tipo de plantas como es el caso del jitomate.

El jitomate es la hortaliza económicamente más importante que se cultiva en nuestro país, constituyendo un producto de exportación. Con la firma del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLC) su exportación ha sido incrementada, sin embargo cada vez son más rigurosas las pruebas de sanidad por las cuales tiene que pasar para poder ser considerado un producto "limpio".

Los trabajos realizados con la interacción *Azospirillum*-jitomate implican experimentos conducidos hasta los 60 días de desarrollo, es decir antes de su fase reproductiva. Los resultados obtenidos por diversos investigadores con respecto a esta asociación demuestran un campo prometedor para su estudio.

La falta de estudios realizados hasta producción y la búsqueda de alternativas para favorecer el cultivo de esta hortaliza constituyen el principal motivo para la realización de este trabajo cuyos objetivos son: (1) la búsqueda de la concentración óptima de *Azospirillum* que mejore la producción, (2) la selección del método de siembra más adecuado y en su caso, (3) la dosis limitada de fertilizante que permita mejorar la producción en combinación con el microorganismo.

Para la primera parte del estudio se probaron tres concentraciones de *Azospirillum*, así como cuatro cepas previamente seleccionadas en un sistema hidropónico. Las variables evaluadas fueron: altura de la planta, diámetro del tallo, peso fresco y seco de raíz y parte aérea, aparición de racimos florales y producción. Los resultados obtenidos indican que: a) No hubo diferencias significativas en la altura de las plantas; b) en diámetro del tallo se presentan diferencias obteniéndose los mejores resultados con la menor concentración bacteriana empleada; c) a los 35 días en pesos fresco y seco de la raíz y parte aérea, no hubo diferencias estadísticas, sin embargo son registradas a los 70 días siendo la concentración mayor con la cual se obtienen los valores más altos; d) con excepción de un tratamiento inoculado los demás aceleran la aparición de racimos florales; e) en lo que respecta a producción, la mejor concentración es 10^5 UFC mL⁻¹ de inóculo y la cepa con la que se obtienen mejores resultados es VS9.

En un segundo bioensayo se probaron las mejores cepas y concentraciones para evaluar su comportamiento en suelo sin esterilizar. El suelo proveniente de una parcela del poblado de Amayuca, Morelos presentó textura migajón arcillosa y pH neutro. Por otro lado, se probaron los dos métodos de siembra comúnmente empleados para el cultivo de jitomate: siembra directa y transplante.

En este bioensayo las variables estudiadas fueron el seguimiento de altura y diámetro del tallos así como de la aparición de racimos florales a diferentes períodos de tiempo. Los resultados obtenidos permitieron confirmar que: a) en altura no hubo diferencias estadísticas al analizar las pendientes de las curvas de crecimiento de cada tratamiento; b) en diámetro del tallo las diferencias estadísticas y el comportamiento de los tratamientos inoculados es semejante al observado en el primer experimento; c) los tratamientos inoculados aceleraron la formación de racimos florales.

Por otro lado, la producción de fruto presentó un incremento significativo y superior al 25% con todas las cepas empleadas y el mejor método de siembra para este experimento fue mediante trasplante.

Para realizar el tercer bioensayo únicamente se probó la mejor cepa con la mejor concentración (de acuerdo con los resultados obtenidos en el bioensayo anterior) combinando tres dosis de fertilización, 0, 50 y 100% de la dosis recomendada y se comparó con sus respectivos testigos (sin inocular). Las variables evaluadas fueron: el seguimiento de altura, diámetro del tallo, formación de racimos florales y producción de fruto.

Los resultados obtenidos en el seguimiento de diámetro y racimos florales confirmaron el comportamiento observado en los bioensayos anteriores realizados en suelo y agrolita (hidroponia).

A pesar de que no se observaron diferencias estadísticas en la producción entre la cepa y el testigo, se registró un incremento del 11%.

INTRODUCCIÓN

La agricultura actualmente se enfrenta a una grave problemática por la pérdida de fertilidad de los suelos, así como la contaminación de los mismos. Para incrementar la producción se debe considerar tanto el aumento como el rescate de tierras cultivables, así como el mejoramiento en el rendimiento de las cosechas (Calderón, 1995)

El uso de fertilizantes químicos se ha empleado con éxito desde hace muchos años, sin embargo estos productos presentan algunos inconvenientes como son: a) requerimientos de una industria sofisticada, b) un alto costo desde el punto de vista energético, c) elevados precios de transporte, d) contaminación del ambiente y e) pérdida de compuestos nitrogenados por lixiviación y/o desnitrificación (Calderón, 1995; Minero, 1998)

Dentro de las alternativas para combatir esta problemática se encuentra el uso de las bacterias conocidas Rizobacterias Promotoras del Desarrollo Vegetal (PGPR) las cuales promueven incrementos en el crecimiento de las plantas así como de la producción y algunas otras actúan como agentes de control biológico.

En algunos países de Europa y Sudamérica se han producido inoculantes bacterianos en pequeña escala y su empleo ha dado buenos resultados (Bashan y Holguin, 1997); sin embargo el principal obstáculo para su comercialización y producción a gran escala deriva de la inconsistencia de los resultados obtenidos tanto en campo como en invernadero (Okon y Labandera-González, 1994; Bashan y Holguin, 1997)

Entre los microorganismos que se han empleado con éxito en la producción de gramíneas se encuentra *Azospirillum*; bacteria que también promueve el crecimiento de otros vegetales, pero de los que no existen reportes de su efecto en rendimiento, por lo que es interesante extender los estudios hasta la fase reproductiva en otro tipo de cultivos.

El jitomate es un fruto de origen sudamericano que se cultiva en México en gran escala y que con el paso de los años y con el surgimiento de una industria conservera, se ha convertido en una fuente importante de divisas para el país (Bosso y Serafini, 1981).

Con la firma del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLC), los productores de México tuvieron que rebasar el efecto de competencia enfocándose hacia proyectos globales de producción marcadas principalmente por la obtención de productos "limpios y seguros" para poder exportar (Bringas, 1998).

La calidad de los productos es ahora marcada no sólo por las características del producto, sino también por el proceso del cultivo que comprende entre otros aspectos la disminución en el uso de agroquímicos (fertilizantes, pesticidas) y el riego con aguas de buena calidad.

Dada la importancia de este cultivo en nuestro país, con este trabajo se busca ofrecer una alternativa para mejorar la producción del jitomate y que a la vez disminuya la contaminación del suelo con la obtención de frutos "seguros". Este trabajo forma parte del proyecto 27972-B del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT).

1.0 ANTECEDENTES.

1.1 *Azospirillum*

1.1.1 Características Generales:

Las bacterias del género *Azospirillum* son bacilos vibrioides o rectos, cuyo diámetro es de 0.9 a 1.2µm, gram negativas o gram variables. Presentan en su interior gránulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB). Los microorganismos se mueven mediante un flagelo polar y con un movimiento típico helicoidal o vibratorio en medio líquido. Su temperatura óptima de crecimiento es de 34 a 37°C. Algunas cepas crecen bien a un pH de 7.0, mientras que otras prefieren condiciones más ácidas (Holt *et al.*, 1994).

La primera especie de *Azospirillum* fue aislada por Beijerinck en 1925 a partir de suelos pobres en nitrógeno siendo llamada originalmente *Spirillum lipoferum*. Tarrand *et al.*, (1978) propusieron a *Azospirillum* como un nuevo género y basados en diferencias morfológicas y fisiológicas entre varias cepas y su homología de DNA distinguieron dos especies: *A. brasilense* y *A. lipoferum*. Posteriormente se descubrieron 5 nuevas especies: *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largimobile* y *A. dobereineriae* (Eckert *et al.*, 2001).

Azospirillum es un microorganismo fijador de nitrógeno, que para reducir a este elemento requiere de condiciones microaerofílicas. En condiciones aerobias crece únicamente en presencia de una fuente de nitrógeno ya sea en forma de amonio o nitrato. Posee un metabolismo respiratorio, como aceptores finales de electrones utilizan al oxígeno y algunas cepas al NO³⁻. Puede presentar una capacidad fermentativa muy débil. Son microorganismos quimioorganotróficos, aunque algunas cepas son autótrofas. Se desarrolla abundantemente con sales de ácidos orgánicos tales como malato, succinato, lactato y piruvato; pueden utilizar a algunos carbohidratos como fuente de carbono. Algunas cepas requieren de biotina para su crecimiento. Su hábitat natural es el suelo. (Holt *et al.*, 1994).

1.1.2 Especificidad y Distribución de *Azospirillum*

Los datos publicados en los últimos años, muestran que cepas de *Azospirillum* no tienen preferencias por plantas de grano o forraje, ni por plantas anuales o perennes.

Los estudios iniciales estuvieron enfocados a su aislamiento, reportes más recientes muestran que la bacteria es un habitante natural de muchas plantas no gramíneas y se ha encontrado en raíces de *Opuntia*, palmas cocoteras, *Brassica chinensis*, *Glycine max*, *Cucumis sativus*, *Aeschynomene indica* y *A. aspera* (George (1990), Gamo y Ahn (1991) y Singh (1992) en Bashan y Holguin, 1997).

Esto demuestra que *Azospirillum* es un colonizador de la raíz y que no presenta especificidad por su hospedero (Bashan y Holguin, 1997).

Azospirillum se ha localizado abundantemente en suelos de zonas tropicales, en menor proporción en regiones templadas y también en climas fríos y suelos adyacentes de tundra y sitios semidesérticos en Canadá (Nosko *et al.*, 1994; Ramírez-Gama y Luna-Millán, 1995).

1.1.3 Colonización de la Raíz por *Azospirillum*:

Se ha descrito que en raíces de maíz *Azospirillum* presenta dos fases de adhesión (v. figura 1). La primera fase de adsorción es débil, rápida (se alcanza en un máximo de 2 horas de incubación), y mediada por proteínas bacterianas. La segunda fase (llamada anclaje) es fuerte e irreversible, además es más larga (comienza a partir de las 8 horas de incubación y se llega al máximo después de 16 horas), y probablemente se base en polisacáridos extracelulares (Michiels et al., 1990; Zaady y Okon, 1990, Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). En raíces de jitomate, pepino, algodón y soja únicamente se ha observado la segunda fase (Bashan et al., 1991) y es probablemente el principal factor de una colonización efectiva.

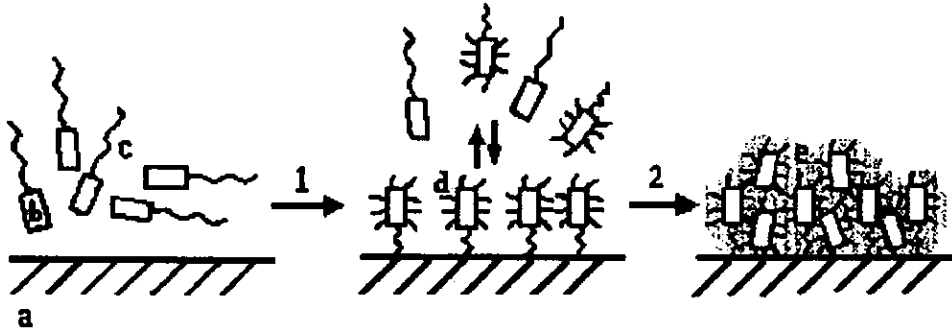


FIGURA 1. Adhesión de *Azospirillum* a las raíces. Paso 1 adsorción débil y reversible. Paso 2 anclaje firme e irreversible. Las letras se refieren a la superficie de la planta (a), Células de *Azospirillum* (b), flagelo polar (c), flagelo lateral (d) y polisacáridos extracelulares (e). Tomado de Steenhoudt y Vanderleyden (2000).

1.1.4 Efecto de la Colonización de *Azospirillum* en las Plantas:

Numerosos estudios indican que la inoculación con *Azospirillum* produce incrementos en el crecimiento y producción de cereales y pastos forrajeros (Kapulnik et al., 1985; Okon y Kapulnik 1986; Vande et al., 1993; Okon y Labandera, 1994).

En estudios con otro tipo de plantas se ha encontrado que este microorganismo:

- Promueve el crecimiento de jitomate, pepino, algodón y mostaza (Saha et al., 1985; Bashan et al., 1989b);
- Incrementa el contenido de nitrógeno, masa y longitud de zanahorias (Govedarica et al., 1993 en Bashan y Holguin, 1997);
- Mejora la germinación y la sobrevivencia de plántulas de cactus (Puente y Bashan, 1993).
- Reeemplaza alrededor del 60% de nitrógeno requerido para la fertilización en caña de azúcar (Macalintal y Urgel, 1992).

Zaady et al. (1994) sugieren que con la producción de *Azospirillum brasilense* en escala comercial se puede ofrecer el inoculante suficiente para cultivar grandes extensiones disminuyendo el gasto en fertilizantes, así como la contaminación que estos causan.

Experimentos en invernadero y campo diseñados para documentar los efectos benéficos de *Azospirillum* sobre el crecimiento de las plantas han dado resultados contradictorios. En algunos estudios se reporta el aumento de uno o varios de los parámetros antes indicados, en tanto que en otros se reporta un efecto detrimental (Bashan y Levanony, 1990; Ramírez-Gama y Luna-Millán,

1995). Estas variaciones dependen de las características propias de cada cepa tales como la sobrevivencia y viabilidad en campo (Okon, 1985), adsorción a partículas del suelo y competitividad con la población natural en la rizosfera (Bashan y Levanony, 1987).

Todos estos factores, están relacionados con la forma de inoculación, que incluye los procedimientos de aplicación, concentración de inóculo, formulación y períodos de aplicación (Creus *et al.*, 1996).

1.1.5 Mecanismos de Acción:

Después de 30 años de investigación, las propiedades fisiológicas de la bacteria están bien definidas, no obstante el principal modo de acción de *Azospirillum* aún no ha sido definido (Hartmann, 1988; Zimmer, 1988). Entre los mecanismos que se han propuesto se tienen: La fijación de nitrógeno, actividad hormonal, moléculas señal que interfieren en el metabolismo de la planta, producción de nitritos y el mejoramiento en general de la raíz. El estudio de estos mecanismos aún continúa (Bashan y Levanony, 1990).

La fijación de nitrógeno fue el primer mecanismo propuesto para explicar un mejor crecimiento de las plantas inoculadas con *Azospirillum*, debido al incremento en el número de compuestos nitrogenados y a la actividad de la nitrogenasa en las plantas. Sin embargo, estudios realizados varios años después demostraron que la contribución del nitrógeno fijado hacia la planta es mínimo y que fluctúa del 5 al 18% del nitrógeno total (Bashan y Holguin, 1997)

Desde 1970, en sistemas hidropónicos bajo condiciones de invernadero, se demostró que la inoculación con *Azospirillum brasilense* incrementa el número y longitud de raíces adventicias de sorgo (Sarig *et al.*, 1992) por lo cual se propuso que el mejoramiento en el desarrollo y funcionamiento de la raíz es un mecanismo posible por el cual *Azospirillum* incide en el desarrollo de las plantas (Fallik *et al.*, 1994).

La mejor absorción de minerales por la planta como resultado de la inoculación con *Azospirillum* fue la explicación más difundida en la década de los 80's, sin embargo, algunos estudios en plantas de maíz y soja muestran que la acumulación de nitrógeno y otros minerales no necesariamente es ocasionada por el aumento en la absorción de minerales (Bashan y Levanony, 1990).

Azospirillum puede producir *in vitro* ácido indol acético, giberelinas, citocininas y etileno (Jain y Patriquin, 1984; Crozier *et al.*, 1988; Bottini *et al.*, 1989) La aplicación de hormonas sintéticas o purificadas a partir de cultivos bacterianos produce resultados similares a los ocurridos con la inoculación de *Azospirillum* sobre el desarrollo y morfología de la raíz (Tien *et al.* 1979).

Se ha descubierto que *Azospirillum* afecta el metabolismo celular de las plantas desde el exterior de las células, por lo que se sugiere que la bacteria es capaz de excretar y transmitir señales las cuales atraviesan la pared celular de las plantas y son reconocidas por sus membranas. Esta interacción inicia una cadena de eventos que resultan en la alteración del metabolismo de plantas inoculadas. Asimismo se ha demostrado que los nitritos excretados por *Azospirillum* producen un incremento en la formación de raíces laterales. Este mecanismo se ha estudiado muy poco (Bashan y Holguin, 1997).

1.2 JITOMATE

1.2.1 Origen:

El jitomate es una planta procedente de América tropical, cuyo origen se localiza en la región de los Andes (Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú) donde se encuentra la mayor variabilidad genética y abundancia de tipos silvestres (FAXSA, 1999).

México está considerado a nivel mundial como el centro más importante de domesticación del jitomate.

1.2.2 Características Generales:

Es una planta anual y puede ser semiperenne en regiones tropicales. Su sistema de raíces es fibroso y robusto, pudiendo llegar hasta 1.8m de profundidad. Los tallos son cilíndricos en plantas jóvenes y angulosos en plantas maduras; alcanzan alturas de 0.40 a 2.0 m (González, 1994).

El racimo floral o inflorescencia está compuesto por varios ejes, cada uno de los cuales tiene un flor de color amarillo.

El fruto de jitomate es una baya (Fruto redondo, el cual guarda las semillas dentro de cavidades llamadas lóculos). El color más común del fruto es rojo, pero dependiendo de la variedad también los hay amarillos, naranjas y verdes (FAXSA, 1999).

Las semillas son grisáceas, deprimidas, ligeramente alargadas, de forma oval y tienen de 3 a 5 mm de diámetro y 0.25 cm de longitud. La superficie está cubierta de vellosidades.

1.2.3 Variedades:

De acuerdo con el tipo de crecimiento, este se puede clasificar en determinado e indeterminado.

El crecimiento determinado se caracteriza por un gene dominante. El tallo se desarrolla progresivamente, tiene menos nudos de hojas entre inflorescencias (de 1 a 3). Generalmente después de 4 a 6 inflorescencias, el tallo cesa su crecimiento terminando en inflorescencia. En este tipo de plantas, la madurez del fruto se realiza en un período corto y casi simultáneo (30-50 días) y la planta alcanza una altura de 60 a 70 cm (Minero, 1998).

El crecimiento indeterminado está marcado por un gen recesivo. En este caso el tallo se desarrolla continuamente, con inflorescencias cada tres hojas, el crecimiento es indeterminado (10 a 12 inflorescencias) y no cesa hasta que alguna condición adversa se presenta. En estas plantas, la madurez del fruto es paulatina y por períodos mas largos, por lo que su cultivo se adapta muy bien en zonas templadas, o en invernadero, utilizando una guía o estacado para sostener el crecimiento (Minero, 1998).

1.2.4 Clima:

Es una hortaliza de clima cálido, no tolera heladas. El intervalo de temperaturas del suelo debe ser de 12 a 16°C (mínima 10°C y máxima 30°C) y la temperatura ambiente para su desarrollo de 21 a

24°C, siendo la óptima de 22°C; a temperaturas menores de 15°C y mayores de 35°C puede detenerse su crecimiento.

La temperatura óptima para la maduración del fruto es de 18 a 24°C, si la temperatura es menor de 13°C, los frutos tienen una maduración muy pobre. Asimismo, cuando la temperatura es mayor de 32°C durante el almacenamiento, la coloración roja (licopeno) es inhibida y los frutos se tornan amarillos.

1.2.5 Cultivo en suelo:

Con respecto a la textura del suelo, el jitomate se desarrolla en suelos livianos (arenosos) y en suelos pesados (arcillosos), siendo mejores los arenosos y limo-arenosos con buen drenaje. La SARH recomienda indistintamente migajones arcillo-arenosos y arcillosos.

1.2.6 Siembra:

La SARH menciona la existencia de dos épocas de producción.

1.2.6.1 Primera época de producción: Incluye aquellas siembras realizadas en agosto, la mayoría incluye el sistema de transplante; la producción se obtiene en diciembre y enero. Las plantaciones de esta época se establecen por lo general bajo el sistema de estacado en espaldera.

Los almácigos se establecen en la primera quincena de julio y se sugiere que de preferencia se instalen bajo condiciones de invernadero, siguiendo el “sistema de charolas” para lograr plantas sanas y vigorosas.

Para efectuar el transplante con plantas provenientes de invernadero, estas deben tener 35 días de nacidas, en el terreno es necesario efectuar un riego pesado de pretransplante, posteriormente, a los 7 u 8 días se procede a remover con un rastrillo la capa superficial del suelo donde quedará la planta, inmediatamente se marcan los orificios sobre el centro de la cama a la distancia adecuada, enseguida se deposita una planta por orificio y se acomoda y ajusta con suelo húmedo hasta llenar el hueco. Inmediatamente después se da un riego muy ligero para evitar que las plantas resientan el transplante. Es aconsejable realizar esta actividad por las tardes o días nublados, para evitar la deshidratación de las plantas.

El transplante debe hacerse durante la segunda quincena de agosto.

1.2.6.2 Segunda época de producción: Esta época comprende las siembras hechas en febrero, la mayoría de ellas bajo el sistema de piso, cuya cosecha se inicia en la primera quincena de junio.

En ésta época es conveniente la siembra directa, desde el 25 de enero hasta el 15 de febrero. Se recomienda que la siembra directa se haga del lado oriente de la cama, con lo cual se tiene una mejor germinación de la semilla y se evita la acumulación de sales en las raíces de la planta. También se impide el daño a las pequeñas raíces de las plántulas como consecuencia del agrietamiento del suelo por el centro de la cama al irse secando el terreno.

El aclareo se inicia cuando las plantas tienen de 7 a 8 cm de altura, dejando una separación de 15 cm entre ellas, lo que permite disminuir la cantidad de frutos quemados por el sol.

Los riegos están sujetos al tipo de suelo, lluvias, evaporación y a otros factores. Es importante que después del trasplante, se apliquen uno o dos riegos ligeros a intervalos cortos de 7 a 10 días, de acuerdo con la textura del terreno, para así asegurar un buen rendimiento.

Para suelos cuya textura es migajón arcillo-arenoso se sugiere que los riegos sean cada 10 días, con láminas de 7 u 8 cm y, a partir del primer corte, prolongar los intervalos a 15 días, especialmente cuando coinciden con la presencia de temperaturas frescas. Para migajones arcillosos, láminas de 8 ó 9 cm cada 15 días, y cada 20 días después del primer corte, debido a que son suelos que retienen por más tiempo la humedad.

1.2.7 Cultivo sin suelo:

Debido a la pérdida de fertilidad del suelo causada principalmente por su sobreexplotación se han propuesto los cultivos hidropónicos como una alternativa para la producción agrícola.

La hidroponía considerada como un sistema de producción agrícola, presenta un gran número de ventajas, tanto desde el punto de vista técnico como del económico entre las que sobresalen:

- a) Proporciona un balance ideal de aire, agua y nutrimentos, humedad uniforme, aireación adecuada y excelente drenaje.
- b) Los nutrimentos están disponibles en cantidad y forma iónica requerida por las plantas.
- c) Perfecto control del pH
- d) Permite una mayor densidad de población (10-30%)
- e) Mayor precocidad en los cultivos
- f) Se puede cultivar periódicamente la misma especie vegetal
- g) Menor intervalo de tiempo entre cosecha y establecimiento de un nuevo cultivo
- h) Mayor uniformidad en los cultivos
- i) Ahorro en el consumo de agua
- j) Disminución de agroquímicos en el suelo y por lo tanto en la contaminación ambiental.
- k) No se requiere de maquinaria agrícola
- l) Mayor limpieza e higiene en los productos obtenidos.
- m) Posibilidad de utilizar materiales de desecho o nativos como sustratos (González, 1994).

A pesar de las múltiples ventajas que presenta la hidroponía sobre los sistemas de cultivo en suelo, también presenta múltiples desventajas, siendo las principales:

- a) El manejo a nivel comercial requiere de conocimientos técnicos sobre los principios básicos de fisiología vegetal y química inorgánica.
- b) A nivel comercial el gasto inicial es relativamente alto: Construcción de bancales y depósitos, adquisición de sustrato, bombas y tuberías y la construcción de invernaderos.
- c) Su empleo se limita al cultivo de algunas especies con alto precio en el mercado.
- d) Se requiere de un análisis del agua a utilizar y un continuo abastecimiento de la misma (González, 1994)

En el caso de hidroponía es muy importante que el sustrato se mantenga con una humedad uniforme, sin regar de más, el sustrato deberá estar húmedo no mojado. Se recomienda aumentar la humedad, cuando se incrementa la evapotranspiración. En forma sencilla, se ha sugerido que la frecuencia del riego deberá estar en función del clima y estadio de la plántula, sin embargo, una humedad excesiva

dará por resultado plántulas con sistemas radiculares poco desarrollados y en caso extremo se puede propiciar el desarrollo de enfermedades (Minero, 1998).

Se ha establecido que la falta de agua por periodos máximos de 2 horas (marchitez) afecta el crecimiento de las plántulas, pero no los rendimientos finales en campo. En cambio, se ha observado que la mayoría de las pérdidas de plántulas en producción de almácigo son causadas por un manejo inadecuado del riego, que en general resulta de una aplicación excesiva de agua (Minero, 1998).

Nunca deberán aplicarse los fertilizantes disueltos en el agua cuando el sustrato esté seco (sobre todo en días soleados); para evitarlo, hay que dar un riego ligero solo con agua para humedecer el sustrato y posteriormente aplicar la fertilización, también se recomienda lavar el follaje y eliminar los residuos del fertilizante en las hojas para evitar las quemaduras por concentración de las sales (Minero, 1998).

Con la firma del TLC y con fines de exportación se ha promovido en México el uso de cultivos "limpios", lo que ha incrementado en nuestro país la introducción de invernaderos y cultivos hidropónicos. Hasta 1998 se tenía registro de los siguientes invernaderos y el tipo de cultivos introducidos:

TABLA 1. Invernaderos, localización y cultivos registrados en México (Bringas, 1998).

EMPRESA	ESTADO	Superficie (Has)	Cultivos principales
Greenver	B. C. Sur	48	Jitomate, pimientos, pepinos, berenjenas
Agrícola ABC	B. C. Norte	40	Melones, pimientos, jitomates
Sante Fé	Sonora, Sinaloa, Durango	60	Pepinos, melones, jitomates
Eco Cultivos	Jalisco	55	Jitomates, cherrys
Agrícola Saracho	Sinaloa	10	Jitomates, pimientos, melones
San Martín	Jalisco	12	Jitomates
Agros	Querétaro	8	Jitomates
Los girasoles	Nuevo León	7	Jitomates
Del campo	Sinaloa	5	Jitomates, pimientos
Tricar	Sonora	4	Jitomates
Agrico	Sonora	4	Pepinos.

1.2.8 Importancia Económica

Mundialmente el jitomate es una de las hortalizas de mayor consumo y de la que en los últimos cuatro años la producción mundial prácticamente se ha mantenido estable, con un promedio anual superior a las 90 millones de toneladas.

A nivel mundial, México destaca por ser uno de los principales exportadores de esta hortaliza, cuya producción supera los 2 millones de toneladas anuales (tabla 2) y cada año crece debido a lo redituable del cultivo (Infoagro, 2001).

TABLA 2. Producción anual de jitomate en México (en Toneladas)

Año	1997	1998	1999	2000
Total	1,935,870	2,275,168	2,429,113	2,170,341

1.3 INOCULACIÓN DE *Azospirillum* EN JITOMATE.

Este tipo de estudios se ha realizado en plántulas hasta de 45 días. La colonización superficial en jitomate muestra que los pelos radicales están prácticamente libres de células en comparación con otros vegetales, como es el caso de la avena (Okon y Kapulnik, 1986). Estudios realizados con esta asociación, utilizando la cepa Cd de *A. brasilense* muestran los siguientes resultados:

Mohandas (1988) al aislar bacterias a partir de raíces de jitomate esterilizadas superficialmente con cloruro de mercurio al 0.1 %, demostró la presencia de *Azospirillum* en la endorrizósfera y reporta que el número de bacterias fue de 30×10^4 por gramo de peso fresco de tejido. Observaciones con microscopía de contraste de fases y microscopio electrónico revelan la presencia de bacterias en la epidermis, corteza y haces vasculares.

Bashan *et al.* (1989) en estudios de invernadero con cepas Nif⁺ y Nif⁻ observaron incrementos en altura de plantas de 34 días y en el diámetro del tallo, número de hojas, así como en el peso seco de plantas de 45 días con ambas cepas ($p < 0.05$) con lo que confirmaron el efecto de *Azospirillum*, pero concluyeron que este no puede ser atribuido a la fijación de nitrógeno.

Bashan *et al.* en 1991 encontraron que: a) las bacterias se localizan en la superficie de la base de los pelos radicales, sin embargo, algunas veces los pelos se encuentran libres de bacterias, b) el principal patrón de distribución de *Azospirillum* en las raíces del jitomate es como células individuales, c) algunas células de *A. brasilense* poseen una típica forma vibrioide, mientras que otras presentan en uno de los polos una elongación mediante la cual se "anclan" a las raíces, y d) se recupera una mayor cantidad de sustancias mucilaginosas de plantas de jitomate inoculadas que de aquellas que no fueron inoculadas.

Estudios realizados con 5 especies de *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans* y *A. irakense*) demostraron que este microorganismo no causa síntomas de enfermedad visible en raíces y hojas de jitomate, tampoco inhibe la germinación ni reduce el peso seco de las plantas cuando se inoculan por técnicas estandarizadas para patógenos. *Azospirillum amazonense*, *A. halopraeferans* y *A. irakense* no tienen efecto sobre el crecimiento de las plantas, en tanto que *A. brasilense* y *A. lipoferum* incrementan el peso seco de las mismas (Bashan, 1998).

Estos resultados proveen la evidencia experimental para considerar segura la inoculación de *Azospirillum* en jitomate.

1.4 JUSTIFICACIÓN:

Dada la importancia del cultivo de jitomate en nuestro país, así como el efecto benéfico de *Azospirillum* sobre el crecimiento y la producción de otros vegetales, se considera importante buscar alternativas que permitan mejorar la producción de jitomate y disminuir el uso de fertilizantes químicos, por lo cual en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

2.0 OBJETIVO GENERAL:

Seleccionar la concentración óptima de *Azospirillum* que mejore la producción de jitomate (*Lycopersicon esculentum*).

2.1 Objetivos particulares:

- 2.1.1 Seleccionar la concentración óptima de *Azospirillum* de acuerdo con su efecto sobre el crecimiento y producción de la planta.
- 2.1.2 Confrontar el efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre el crecimiento y producción de jitomate en dos sistemas de siembra.
- 2.1.3 Comparar el efecto de *Azospirillum* con el producido por diferentes dosis de fertilizantes químicos.

1.4 JUSTIFICACIÓN:

Dada la importancia del cultivo de jitomate en nuestro país, así como el efecto benéfico de *Azospirillum* sobre el crecimiento y la producción de otros vegetales, se considera importante buscar alternativas que permitan mejorar la producción de jitomate y disminuir el uso de fertilizantes químicos, por lo cual en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

2.0 OBJETIVO GENERAL:

Seleccionar la concentración óptima de *Azospirillum* que mejore la producción de jitomate (*Lycopersicon esculentum*).

2.1 Objetivos particulares:

- 2.1.1 Seleccionar la concentración óptima de *Azospirillum* de acuerdo con su efecto sobre el crecimiento y producción de la planta.
- 2.1.2 Confrontar el efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre el crecimiento y producción de jitomate en dos sistemas de siembra.
- 2.1.3 Comparar el efecto de *Azospirillum* con el producido por diferentes dosis de fertilizantes químicos.

3.0 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM.

De acuerdo con los objetivos planteados, el trabajo se dividió en cuatro etapas, que se indican en la Figura 1.

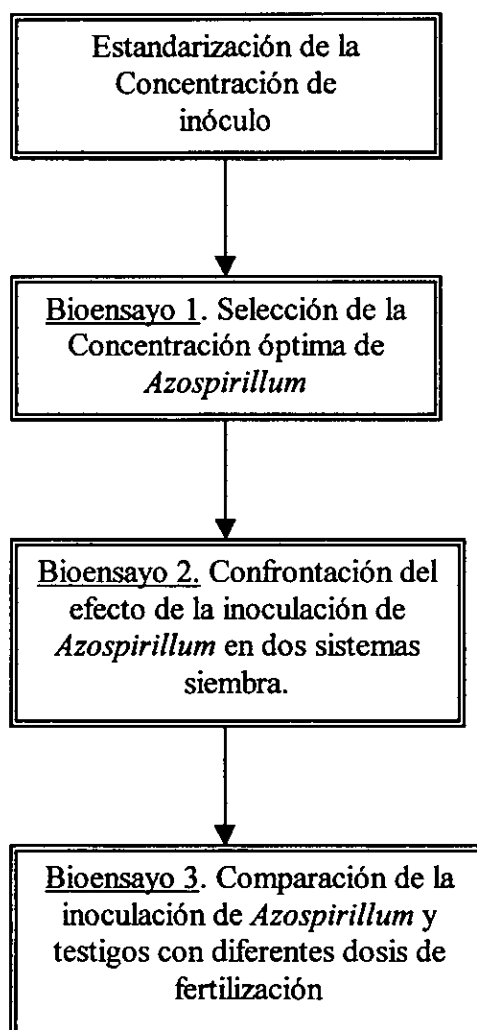


Figura 1.
Programa General de Trabajo.
Únicamente se muestran las etapas principales del experimento.

3.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO

Se emplearon cuatro cepas del género *Azospirillum* pertenecientes a la colección de la facultad de Química, UNAM. La especie y procedencia de las cepas se indican en la tabla 1.

TABLA 1. Cepas de *Azospirillum* en estudio y su procedencia.

Cepa	Especie	Procedencia
Cd	<i>Azospirillum brasilense</i>	Donada por el Dr. Okon*
VS9	<i>Azospirillum brasilense</i>	Aislada de sorgo**
VS1	<i>Azospirillum lipoferum</i>	Aislada de Sorgo**
CPM 167	<i>Azospirillum</i> sp.	Donada por el Dr. R. Ferrera-Cerrato*

* Donada a la M. en C. Rosa Ma. Ramírez Gama Jefa del Lab. de Microbiología Experimental

** Aislada e identificada por Ángel A. Flores (1985)

Las cepas se activaron en el medio malato sales libre de nitrógeno más biotina en estado semisólido (Nfbss)¹ con las siguientes condiciones de incubación: 34° C durante 72 horas. Una asada de este cultivo se transfirió a matraces Erlenmeyer que contenían 100 mL del medio malato-sales¹, la incubación fue a 34° C con una agitación de 200 rpm durante 72 h. A partir de este cultivo se inoculó otro matraz con el mismo medio e incubó en las condiciones indicadas durante 24 h; tiempo en el que los cultivos estaban en la fase logarítmica de crecimiento (Bashan *et al.*, 1989a).

De cada uno de los cultivos se tomaron diferentes alícuotas, las cuales fueron transferidas a matraces con 50 mL de medio de cultivo estéril y posteriormente, se leyó la absorbancia a 560 nm (A_{560}) con un espectrofotómetro Spectronic 20D. A partir de cada matraz se tomó 1 mL de suspensión para efectuar la cuenta de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC mL⁻¹) de inóculo mediante la técnica de dilución y vertido en placa (Ramírez-Gama *et al.*, 2000).

3.2 BIOENSAYO 1

Selección de la concentración óptima de *Azospirillum*

3.2.1 Obtención de inóculos

Los inóculos fueron obtenidos de acuerdo a lo expuesto en el punto anterior; los resultados que derivaron de éste, permitieron establecer la concentración de células viables deseada (tabla 2).

TABLA 2. Cepas en estudio e intervalo de absorbancia para obtener la concentración de inóculo deseada.

Cepa	A_{560}	Concentración de inóculo (UFC mL ⁻¹)
Cd	0.012-0.015	10 ⁸
	0.008-0.010	10 ⁵
VS9	0.015-0.017	10 ⁸
	0.006-0.008	10 ⁵
VS1	0.0008-0.010	10 ⁸
CPM-167	0.010-0.012	10 ¹⁰

1. La composición de los medios se incluye en el anexo I.

3.2.2 Inoculación de semillas

Se emplearon semillas de jitomate tipo Saladette variedad Lucas. Las semillas fueron desinfectadas con alcohol al 95 % durante 5-10 segundos, se drenó y posteriormente se colocaron en hipoclorito de sodio al 5 % durante 5 minutos, nuevamente se drenó y se efectuaron 10 lavados con agua estéril.

La inoculación se realizó colocando 40 semillas en 10 mL de cada uno de los cultivos con la población microbiana previamente ajustada, en el caso del testigo se empleó medio de cultivo estéril. Las semillas fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente.

3.2.3 Control de calidad

La cantidad de UFC mL⁻¹ de inóculo y adheridas a la semilla (10 semillas) se determinó mediante la técnica de dilución y vertido en placa.

3.2.4 Preparación de unidades experimentales

En este experimento se empleó el método de siembra por transplante, para lo cual fue necesaria la preparación de unidades para el almácigo y para el transplante.

- ◆ Almácigo: Se emplearon vasos de unicel de 250 mL, previamente desinfectados con alcohol al 70 %, y llenados asépticamente con agrolita estéril a pH 7.0.
- ◆ Transplante: Se utilizaron macetas de 12 L de capacidad, lavadas con agua y jabón y posteriormente, desinfectadas con alcohol al 70 % y en condiciones asépticas llenadas con agrolita estéril a pH 7.0

3.2.5 Siembra

La siembra se efectuó en condiciones asépticas. En cada vaso se colocó una semilla a una profundidad de 1.5 cm; inmediatamente después, la agrolita fue humedecida con agua estéril y los vasos se colocaron al azar en el invernadero. Se sembraron 20 semillas para cada tratamiento.

3.2.6 Preparación del invernadero

El invernadero se lavó con agua y jabón, y se desinfectó con hipoclorito al 5 %. Un día antes de introducir los vasos, fue desinfectado con una mezcla de permanganato de potasio con formaldehído.

La temperatura se ajustó en un intervalo de 18-30 °C (noche-día) y una humedad relativa del 70 %. Estas condiciones se mantuvieron durante todo el experimento.

3.2.7 Cuidados del cultivo

3.2.7.1 Riego

Se empleó la solución nutritiva de Steiner modificada y recomendada para el cultivo de jitomate por González (1994). La composición se muestra en el anexo 1. La concentración total de la solución así como la cantidad aplicada variaron de acuerdo con la etapa de crecimiento de la planta (tabla 3)

TABLA 3. Riego efectuado a las plantas de acuerdo a su etapa de crecimiento.

Etapa de crecimiento	Concentración y cantidad de solución nutritiva
Siembra- aparición de cotiledones	0% 20- 50 mL semana ⁻¹
Cotiledones-Primeras 3 hojas verdaderas	50% 100-200 mL cada 3 días
Desde la aparición de las primeras 3 hojas verdaderas al final de la floración (5-8 racimos)	100% 400 a 2000 mL día ⁻¹ planta ⁻²
Formación del fruto	100% + Ca (NO ₃) ₂
A partir de la maduración del fruto	100% 2000 mL día ⁻¹ planta ⁻²

Nota: Después de cada tres riegos con solución nutritiva regar con agua para evitar la acumulación de sales

Se procuró que cada uno de los riegos humedeciera completamente el sustrato.

3.2.7.2 Transplante

Se efectuó a los 42 días después de la siembra en condiciones de baja luminosidad y temperatura. Los vasos fueron cortados a la mitad de manera longitudinal procurando no dañar la raíz. Las plántulas (con cepellón) se colocaron en las macetas asegurando que una pequeña porción del tallo quedara bajo el sustrato con el fin de proporcionar un mejor soporte inicial (Resh, 1992). Para el transplante se seleccionaron las plántulas con el mayor diámetro de tallo y que fueran más vigorosas.

3.2.7.3 Entutorado

Cuando las plantas alcanzaron una altura de aproximadamente 60 cm y se formaron los primeros racimos florales, se colgó del techo una cantidad de cordones de hilaza igual al número de plantas y sobre ellos se apoyó el follaje. Las plantas se fijaron a la cuerda asegurando que cada vuelta quedara bajo un par de hojas consistentes cuidando de no afectar a los peciolo ni a los ramilletes florales. La cuerda se colocó siempre girando alrededor del tallo en el sentido de las manecillas del reloj (Resh, 1992).

3.2.7.4 Poda

El corte de los brotes axilares (o chupones) se efectuó cuando éstos alcanzaron una longitud de una pulgada y se realizó manualmente para evitar la transmisión de enfermedades.

3.2.7.5 Control de plagas

Ante la presencia de *Trialeurodes vaporariorum* (mosquita blanca) se aplicó alternadamente el producto Azuflow 2 y una mezcla de jabón, vinagre y ajo recomendada por Rodríguez (1997).

3.2.7.6 Polinización

Las flores se polinizaron cuando los pétalos de la flor se doblaron hacia abajo (estado receptivo). La polinización fue manual y se realizó cada dos días entre las 11:00 y las 15:00 horas preferentemente en días soleados (Resh, 1992).

3.2.8 Variables evaluadas

Las variables evaluadas así como el tiempo al cual se realizaron sus determinaciones se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. Tiempo y determinaciones realizadas.

Variables/ tiempo (días)	35	42	50	60	70	90	100	110	120
Altura	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Diámetro del tallo	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Peso fresco parte aérea	X				X				
Peso seco parte aérea	X				X				
Peso fresco de raíz	X				X				
Peso seco de raíz					X				
Colonización bacteriana en raíz	X ¹				X ²				
Aparición de racimos florales (#)					X	X	X	X	X
Producción de fruto						X	X	X	X

¹ Registro de ausencia o presencia de *Azospirillum*

² Determinación de NMP/g de raíz

3.2.8.1 Altura de las plantas

Se midió con regla desde la base del tallo hasta la última ramificación.

3.2.8.2 Diámetro del tallo

Se midió en la base del tallo con nonio de vernier.

3.2.8.3 Peso fresco y seco de raíces y parte aérea

Las plantas y raíces se pesaron inmediatamente después del corte, posteriormente se secaron en horno a 70°C durante tres a cuatro días hasta peso constante.

3.2.8.4 Colonización bacteriana en raíz

Se realizó mediante la determinación del patrón de colonización a los 35 días y la cuantificación de *Azospirillum* a los 70 días.

- Comprobación y determinación del patrón de colonización: La raíz de plántulas de 35 días se cortó en tres segmentos iguales: Corona, media y distal. Cada fracción se desinfectó y se sembró en un tubo con medio Nfb ss, los tubos se incubaron a 35° C. Se registró el crecimiento a las 24, 48 y 72 horas. De aquellos tubos con crecimiento se tomó una asada y se realizó una suspensión en un tubo con 5 mL de agua estéril, de este tubo se sembró en medio Agar Rojo Congo¹ (Rodríguez Cáceres, 1982) y Agar Infusión de papa¹ (BMS) (Tarrand *et al.*, 1978), lo que permitió verificar que el desarrollo obtenido en los tubos correspondía al microorganismo inoculado.
- Cuantificación por el método del Número más probable (NMP): Se pesó un gramo de raíz, el cual se desinfectó durante un minuto con hipoclorito de sodio al 5 %, posteriormente fue lavado con agua estéril. Después se maceró en 9 mL de agua estéril y a partir de éste se realizaron diluciones decimales. Series de tres tubos con Nfb ss fueron inoculados con 1mL de las diluciones 10⁻⁴ hasta 10⁻⁷. La lectura se realizó a las 72 horas.

3.2.8.5 Aparición de racimos florales

Se contaron los racimos florales formados.

3.2.8.6 Producción

Los frutos se cosecharon rojos y se pesaron inmediatamente después del corte.

3.2.9 Diseño del experimento

Se probaron siete tratamientos (tabla 5) con cinco repeticiones para cada variable y tiempo en estudio. El diseño experimental fue completamente al azar, en donde cada unidad estuvo constituida por un vaso de unicel de 250 mL o por una maceta de 12 L con una planta.

TABLA 5. Tratamientos en estudio.

Tratamiento	UFC mL ⁻¹
Testigo	-----
Cd	10 ⁵ y 10 ⁸
VS9	10 ⁵ y 10 ⁸
VS1	10 ⁸
CPM 167	10 ¹⁰

3.2.10 Análisis de Resultados

Se empleó el análisis de varianza simple (ANOVA una vía) con un nivel de significancia del 95 % (p<0.05). En las variables que hubo diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación

1. La composición de los medios se incluye en el anexo 1.

de medias de Tukey. El análisis estadístico se efectuó con el paquete estadístico SPSS (Programa estadístico para las ciencias sociales).

Los mejores tratamientos se seleccionaron de acuerdo con los resultados de producción.

3.3 BIOENSAYO 2.

Confrontación del efecto de la inoculación de *Azospirillum* en dos sistemas de siembra.

Los tratamientos y concentraciones empleadas en este experimento se eligieron de acuerdo con los resultados obtenidos en el primer bioensayo, los que corresponden a: VS9 10⁵, CPM 167 10¹⁰, Cd 10⁵ y VS9 10⁸. Además se probaron dos métodos de siembra: Siembra directa y almácigo empleando suelo como sustrato.

3.3.1 Preparación de inóculos, control de calidad e inoculación de semillas.

Efectuados de la misma forma que en el Bioensayo 1.

3.3.2 Suelo

Se empleó suelo sin esterilizar.

3.3.2.1 Muestreo

El suelo fue colectado de la capa arable de una parcela del poblado de Amayuca, Morelos ubicado a 16 Km de la Ciudad de Cuautla (figura 2). Este suelo presentó una alta pedregosidad y a una profundidad de 25-30 cm compactación por la posible formación de piso de arado.

3.3.2.2 Análisis físicos y químicos

El suelo se dejó secar al aire y posteriormente, se pasó por un tamiz con apertura de malla de 2 mm. Los análisis realizados y los métodos empleados se muestran en la tabla 6.

TABLA 6. Propiedades físicas y químicas del suelo evaluadas y método de determinación empleados.

Parámetro	Método	Referencia
Color	Comparación con tablas de Munsell	Ortiz-Villanueva, 1977
pH	Potenciómetro	Ruiz y Ortega, 1979
Textura	Bouyocos	Foth, 1972 y Gavande, 1979
Materia orgánica	Walkley y Black	Ruiz y Ortega, 1979
Densidad aparente	Probeta	Ruiz y Ortega, 1979
Densidad real	Picnómetro	Ruiz y Ortega, 1979
Porosidad	Relación de densidades	Gaucher, 1970
Nitrógeno total	Kjeldahl	Ruiz y Ortega, 1979
Fósforo disponible	Olsen	Cajuste, 1986

FIGURA 2. Ubicación de la zona de muestreo del suelo.



3.3.4 Siembra Directa

El suelo tamizado se colocó en macetas de 12L. Siete días antes de la siembra se efectuó un riego pesado y aplicó el fertilizante. La siembra se realizó colocando tres semillas por maceta, para lo cual cada semilla se depositó a una profundidad de 1.5 cm.

3.3.5 Siembra por Transplante

El almácigo se preparó igual que en el bioensayo 1. En este experimento el transplante se efectuó en macetas con suelo. Siete días antes del transplante se aplicó un riego pesado. Antes de colocar las plántulas se marcaron los orificios para colocarlas. Inmediatamente después del transplante se dio un riego ligero para evitar el marchitamiento (SARH, 1984).

3.3.6 Fertilización

De acuerdo con los resultados de nitrógeno y fósforo se decidió emplear la dosis de fertilización 100-150-300 recomendada por López (1994) para suelos con estas características. Posteriormente, se efectuaron las aplicaciones de fertilizante mostradas en la tabla 7.

TABLA 7. Tiempo y dosis de fertilización (López, 1994).

Período de aplicación.	Dosis
Al momento de la siembra directa o transplante	100-150-300
2 semanas después del transplante (60 días)	200 kg ha ⁻¹ de 15-15-15
Inicio de la floración	Repetir la dosis anterior.
Fructificación y recolección de frutos	Cada 20 días 100 kg ha ⁻¹ de K ₂ SO ₄ y 20 kg ha ⁻¹ de MgSO ₄ .

3.3.7 Variables evaluadas

La determinación de las variables así como el período al cual se realizaron se muestra en la tabla 8.

TABLA 8. Períodos y determinaciones realizadas.

Variable/ tiempo (días)	35	42	50	60	70	90	100	110	120
Altura	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Diámetro del tallo	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Peso fresco parte aérea	X								
Peso seco parte aérea	X								
Peso fresco de raíz	X								
Colonización bacteriana en raíz	X ¹								
Aparición de racimos florales (#)					X	X	X	X	X
Producción de fruto						X	X	X	X

¹ Registro de ausencia o presencia

La determinación de cada una de las variables así como los cuidados del cultivo se efectuaron de la forma descrita en el inciso 3.2.8.

3.3.8 Riego

Se efectuó de acuerdo con el crecimiento de las plantas. Únicamente se aplicó agua.

3.3.9 Diseño del Experimento

Se probaron 12 tratamientos (tabla 9) con cinco repeticiones, el diseño experimental fue completamente al azar, en donde cada unidad experimental estuvo constituida por un vaso de unicel de 250 mL hasta los 35 días o por una maceta de 12 L.

TABLA 9. Métodos de siembra y tratamientos en estudio.

Tratamientos	Métodos de siembra	
	Transplante	Siembra Directa
Testigo Absoluto	X	X
Testigo Fertilizado	X	X
Cd 10 ⁵	X	X
VS9 10 ⁵	X	X
VS9 10 ⁸	X	X
CPM 167 10 ¹⁰	X	X

3.3.10 Análisis de Resultados:

Para el seguimiento de altura y diámetro del tallo se empleó el análisis de las pendientes ($p < 0.05$ y $p < 0.01$) (Zar, 1984)

Para los resultados de producción se empleó un análisis factorial ($p < 0.05$), en el cual el factor 1 fue el método de siembra empleado y el factor 2 lo constituyeron los tratamientos a probar. En las variables en los que hubo diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey. Para realizar el análisis estadístico se empleó el programa estadístico SPSS.

La cepa y el método de siembra se seleccionaron conforme a los resultados de producción.

3.4 BIOENSAYO 3.

Comparación de la inoculación de *Azospirillum* y testigos (no inoculados) con diferentes porcentajes de fertilización.

En el tercer bioensayo se emplearon la cepa, concentración y método de siembra con la mejor producción en el experimento anterior que corresponde a Cd 105 mediante el método de transplante.

3.4.1 Tratamientos

Como sustrato se empleó suelo sin esterilizar, el cual se obtuvo del mismo lugar que el ocupado en el bioensayo anterior. El suelo se trató de la forma descrita en el inciso 3.3.2.3

Se probaron seis tratamientos, en los cuales la cepa y su respectivo testigo (sin inocular) fueron sembrados en suelo con diferentes porcentajes de fertilización (0, 50 y 100%). La dosis de fertilización empleada (correspondiente al 100%) fue 100-150-300 (López, 1994)

La preparación del inóculo, inoculación de semillas, control de calidad, preparación de unidades experimentales, siembra, cuidados del cultivo y fertilización se realizaron de la misma forma que en los bioensayos anteriores.

3.4.2 Variables Evaluadas

Las variables evaluadas así como el tiempo al cual se realizaron se muestra en la tabla 10.

TABLA 10. Tiempo y determinaciones realizadas.

Variable/ tiempo (días)	35	42	50	60	70	90	100	110	120
Altura	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Diámetro del tallo	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Colonización bacteriana en raíz	X ¹								
Aparición de racimos florales (#)					X	X	X	X	X
Producción						X	X	X	X

¹ Registro de ausencia o presencia de *Azospirillum*

La determinación de cada uno de las variables así como los cuidados del cultivo se efectuaron de la forma descrita en el inciso 3.2.8.

3.4.3 Diseño del Experimento

Se probaron seis tratamientos (tabla 11) con 10 repeticiones, el diseño experimental fue completamente al azar, en donde cada unidad experimental estuvo constituida por un vaso de unicel de 250 mL (hasta los 35 días) o por una maceta de 12 L.

TABLA 11. Dosis de fertilización y tratamientos en estudio.

Dosis de fertilización	Tratamientos	
	Testigo sin inóculo	Cd
0%	X	X
50%	X	X
100%	X	X

3.4.4 Análisis de Resultados

Para el seguimiento de altura y diámetro del tallo se empleó un análisis de pendientes ($p < 0.05$ y $p < 0.01$) y en el caso de los resultados de producción se empleó un análisis factorial, en el cual el factor 1 fue la dosis de fertilizante empleado y el factor 2 lo constituyeron los tratamientos a probar ($p < 0.05$). En las variables en las que hubo diferencias significativas se aplicó la prueba de Tukey.

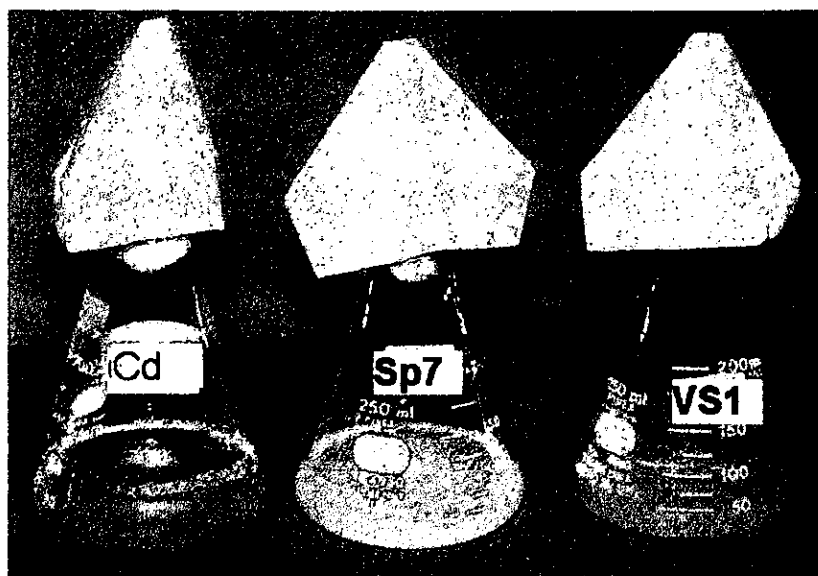
El mejor tratamiento se seleccionó de acuerdo a los resultados de producción.

4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO

En algunos casos la estandarización para la obtención de las concentraciones de inóculo requeridas se dificultó debido a las características propias de cada cepa como se puede apreciar en la figura 3. Las cepas Cd y VS1 forman flóculos, lo cual dificulta las lecturas de absorbancia por debajo 0.008, en tanto que con las cepas VS9 y CPM-167 se pueden realizar lecturas hasta de 0.006. El comportamiento observado con la cepa Cd coincide con lo reportado por Zaady *et al.* (1993).

FIGURA 3. Matraces con las cepas en estudio. En Cd se observa la formación de flóculos rosas y la transparencia del medio. En VS9 la turbiedad del medio y ausencia de flóculos y en VS1 ambas características.



Para realizar el ajuste de la población a 10^8 UFC mL⁻¹ se observa que las lecturas más bajas corresponden a las cepas que floculan (Cd y VS1), en tanto que la absorbancia requerida para la cepa VS9 corresponde a la lectura necesaria para obtener una población de 10^{10} con VS1 (datos no mostrados).

En lo que respecta al ajuste de la concentración 10^5 UFC mL⁻¹, en el cuadro 1 se observa que con Cd se requiere de una mayor lectura comparada con VS9; este resultado se refleja en la cuenta de UFC mL⁻¹ debido a que la población obtenida con Cd corresponde al doble de la observada con VS9.

CUADRO 1 Intervalos de absorbancia empleados para obtener las concentraciones de cuenta de viables deseadas con cuatro cepas de *Azospirillum*.

CEPA	A ₅₆₀	UFC mL ⁻¹
Cd	0.008-0.010	2-8 X 10 ⁵
	0.012-0.015	3-7 X 10 ⁸
VS9	0.006-0.008	1-4 X 10 ⁵
	0.015-0.017	1-4 X 10 ⁸
VS1	0.008-0.012	3-6 X 10 ⁸
CPM 167	0.010-0.012	1-6 X 10 ¹⁰

4.2 BIOENSAYO 1

Selección de la concentración óptima de *Azospirillum*

En el cuadro 2 se observa que la cantidad de bacterias registradas en las semillas varió no solo con la concentración del inóculo, sino también con el tipo de cepa.

De las tres cepas con inóculo inicial de 10^8 UFC mL⁻¹, con Cd se obtiene el mayor número de bacterias adheridas a la semilla (10^6 UFC); con VS1 se obtiene una población 100 veces menor y con VS9 un número 1000 veces inferior. Este comportamiento coincide con la capacidad de formación de agregados (flóculos) observada con las cepas en estudio, de las cuales Cd es la única que forma flóculos y es la que presenta mejor adhesión a las semillas; VS1 forma agregados de menor tamaño y consistencia, por lo que se dispersan con mayor facilidad; VS9 y CPM 167 no forman agregados.

Observaciones similares resultan de la comparación entre el número de células adheridas a las semillas con la cepa CPM 167 10^{10} y con Cd 10^8 en donde se observa que con esta última se obtiene un número 10 veces mayor (v. cuadro 2), hecho que puede deberse a la incapacidad de agregación de CPM 167. En el caso de la concentración 10^5 UFC mL⁻¹ con las dos cepas estudiadas se obtuvieron poblaciones similares en semilla.

En el caso de la concentración 10^5 UFC mL⁻¹ con las dos cepas estudiadas se obtuvieron poblaciones similares en semilla, esto puede deberse a que la población inicial es relativamente baja.

CUADRO 2. Concentración del inóculo, su efecto en la adhesión de las bacterias a las semillas y en la germinación.

CEPA	A ₅₆₀	UFC mL ⁻¹	UFC semilla ⁻¹
Testigo	0.0	0.0	0.0
Cd	0.012	7 X 10 ⁸	3X 10 ⁶
Cd	0.008	1 X 10 ⁵	4 X 10 ²
VS9	0.015	4 X 10 ⁸	2 X 10 ³
VS9	0.006	1 X 10 ⁵	4 X 10 ²
VS1	0.012	3 X 10 ⁸	3 X 10 ⁴
CPM 167	0.010	1 X 10 ¹⁰	3 X 10 ⁵

4.2.1 Colonización Bacteriana en Raíces

A los 35 días se efectuó la primera prueba para verificar la colonización bacteriana en raíz. En la resiembra de cada tubo en Agar rojo congo y Agar infusión de papa (BMS), no se observaron colonias atípicas, esto permitió confirmar que no hubo contaminación con otro tipo de bacterias (Rodríguez-Cáceres, 1982; Tarrand *et al.*, 1978). En el caso del testigo no hubo crecimiento en los tubos con NFb ss lo cual permitió descartar contaminación con los tratamientos inoculados.

En el cuadro 3 se aprecia que la colonización fue exitosa tanto a los 35 como a los 70 días con todos los tratamientos inoculados y que el testigo (sin inocular) estuvo libre de bacterias. De acuerdo con estos resultados se observa que:

- ◆ La cepa Cd en ambas concentraciones presentó el mismo patrón de colonización, la mayor cantidad de bacterias se registró en la región de la corona y disminuyó paulatinamente hasta la región distal. Asimismo, la cantidad de bacterias por gramo de raíz registrada a los 70 días fue similar, lo que probablemente se debe a la producción de proteínas que favorecen la adhesión del microorganismo hacia la superficie de la raíz reportado en la literatura para esta cepa (Bashan y Levanony, 1988; Bashan *et. al.*, 1991; Dufrière y Rouxhet, 1996, Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).
- ◆ La cepa VS9 presentó diferentes patrones de colonización. Con la concentración 10^8 se observó que la mayor colonización se presentó en las regiones de la corona y media, disminuyendo en la región distal; en tanto que con 10^5 la colonización fue similar en los tres segmentos de la raíz. Sin embargo la presencia de *Azospirillum* se detectó hasta las 48 horas lo cual indicó una menor cantidad de bacterias, lo que se confirmó a los 70 días en donde la cantidad de bacterias en el tratamiento 10^8 es diez veces superior a la detectada con la concentración 10^5 .
- ◆ Con la cepa CPM 167 la colonización se presentó en una proporción similar a lo largo de la raíz, pero a diferencia de VS9 10^5 la cantidad de bacterias fue mayor lo que se relaciona con la mayor concentración de inóculo inicial y que además se confirmó en la evaluación de los 70 días en donde se detectó la población más alta.
- ◆ Con la cepa VS1 se observó que tanto la región de la corona como la distal presentaron una mejor colonización debido a que desde las 24 horas hubo formación de la película blanca característica de *Azospirillum* y ocurrió la alcalinización del medio, en tanto que en la sección media estas características se observaron hasta las 72 horas. Las UFC gramo⁻¹ de raíz fue similar a la obtenida con las otras cepas en la que se empleó la misma concentración en el inóculo inicial.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo reportado por otros autores. Respecto a la diferencia entre las cepas para colonizar la raíz se tiene que al inocular mangle con *Azospirillum brasilense* Cd y *A. halopraeferans* AU10 se observaron diferentes patrones de colonización con ambas cepas Puente *et al.* (1999). Mohandas (1988) en un estudio realizado con plantas de jitomate de 45 días cuantificó una población de 10×10^4 UFC g⁻¹, lo cual consideró como una colonización exitosa y un nivel aceptable de colonización, en tanto que Bashan (1998) reporta que cepas de *A. brasilense* y *A. lipoferum* colonizan la raíz de jitomate con poblaciones de 10^6 a 10^7 UFC g⁻¹.

CUADRO 3. Colonización bacteriana en raíces de plántulas de 35 y 70 días de crecimiento.

Tratamiento	35 días									70 días UFC g ⁻¹ de raíz
	CORONA			MEDIA			DISTAL			
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	
Testigo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cd 10^8	+	+	+	+s	+d	+	+s	+s	+d	48×10^6
Cd 10^5	+	+	+	+d	+d	+	+s	+s	+d	25×10^6
VS9 10^8	+	+	+	+	+	+	+s	+	+	40×10^6
VS9 10^5	-	+s	+d	-	+s	+d	-	+s	+d	27×10^5
VS1 10^8	+	+	+	+s	+s	+d	+	+	+	54×10^6
CPM167 10^{10}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11×10^7

+s= Formación de película sin vire del indicador.

+d= Formación de película y débil alcalinización del medio.

4.2.2 Altura de las Plantas

Al realizar el análisis de pendientes para altura se tiene que $F_0=0.49 < F_1=2.49$ ($p<0.05$) lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas (DES) entre las tasas de crecimiento de las plantas (v. tabla 2 anexo 2).

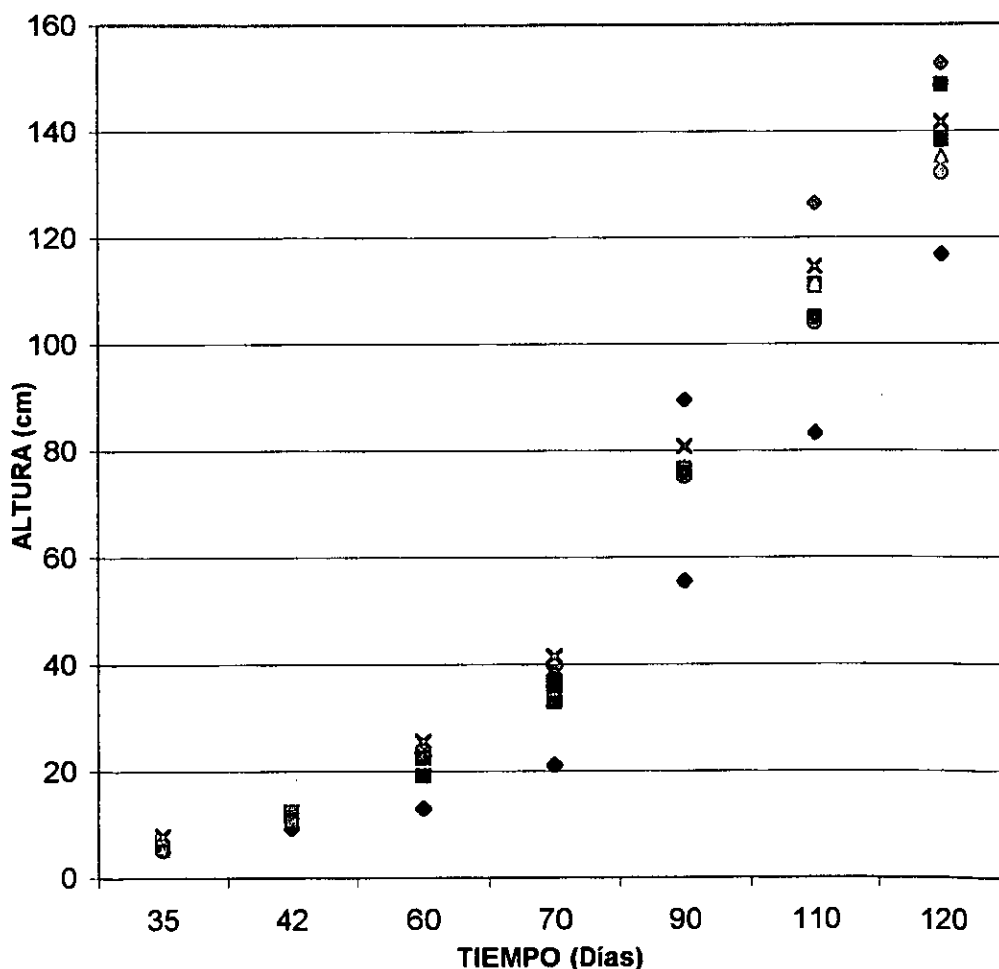
No obstante se observa que los valores más bajos registrados a partir de los 42 días siempre corresponden al testigo y se evidencia algún efecto de los tratamientos inoculados, el que es más marcado a partir de los 90 días, tiempo en el que se observa que la mejor respuesta corresponde a VS9 concentración 10^5 y hasta los 120 días con 10^8 (en orden decreciente). Una respuesta menor se obtiene con VS1, Cd 10^8 , Cd 10^5 y CPM 167 (con pendientes de 1.584,1.585,1.544 y 1.477 respectivamente).

GRÁFICA 1. Seguimiento de la altura de las plantas inoculadas con diferentes cepas de *Azospirillum* y diferentes concentraciones de inóculo.

Cepas de *Azospirillum* y concentración.

- ◆ Testigo
- Cd-8
- △ Cd-5
- VS9-8
- ◆ VS9-5
- × VS1-8
- CPM167-10

Los puntos indican el promedio de cada tratamiento



4.2.3 Diámetro del tallo

Al realizar el análisis de las pendientes en el seguimiento del diámetro del tallo se obtiene una $F_o=16.89 > F_c=3.51$ ($p < 0.01$) lo cual muestra DES entre dos grupos de tratamientos: a) Testigo, Cd 10^8 , Cd 10^5 y VS9 10^5 con pendientes de 0.111, 0.101, 0.102 y 0.110 respectivamente y el grupo b) integrado por VS9 10^8 , VS1 10^8 y CPM 167 10^{10} con pendientes de 0.087, 0.085 y 0.072 respectivamente (v. tabla 4 anexo 2 y gráfica 2).

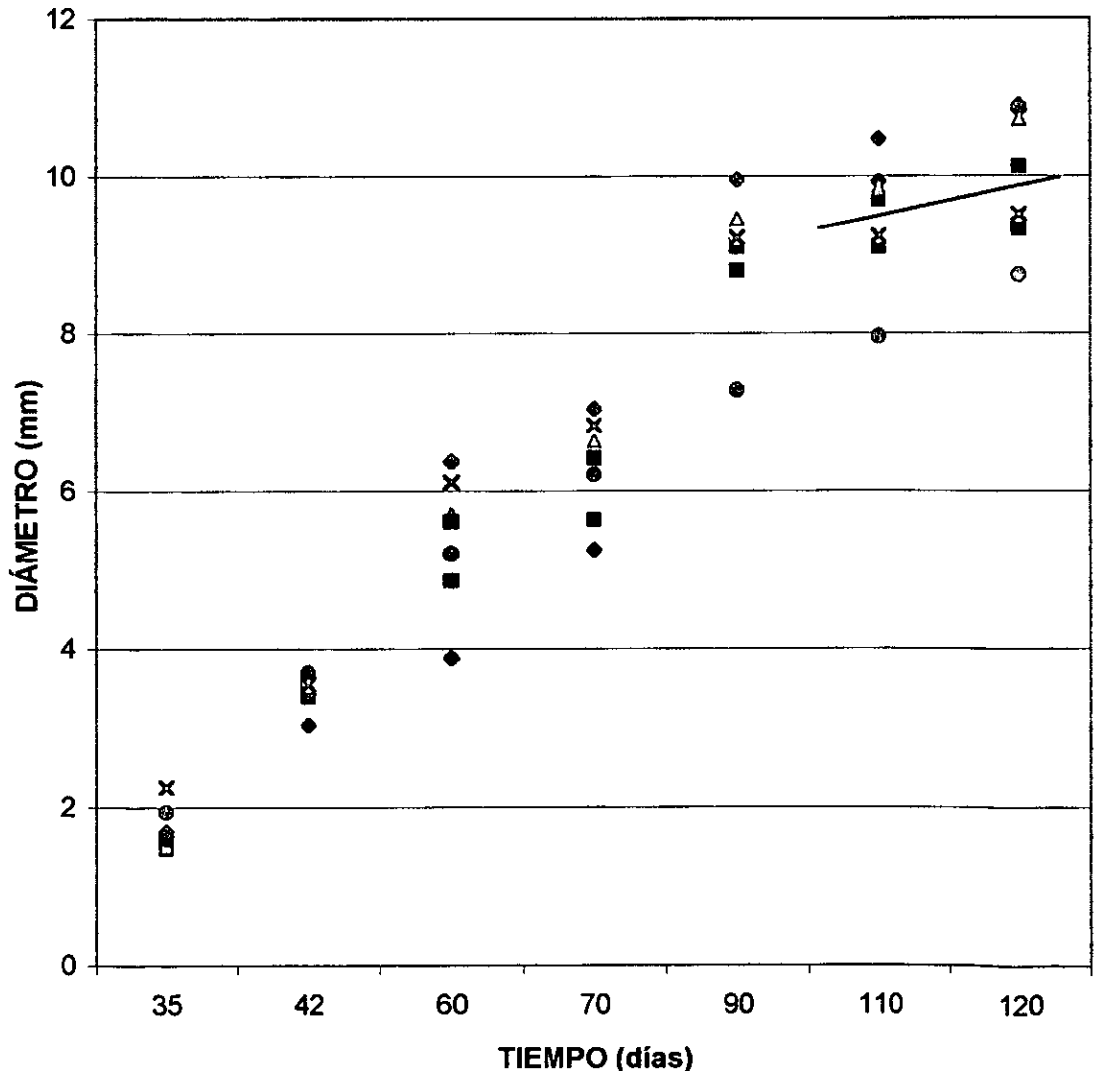
Es importante señalar que con excepción de Cd 10^8 las cepas con la mayor concentración de inóculo son las que presentan una menor pendiente, lo cual coincide con los resultados de 120 días, tiempo en el cual tres de los tratamientos de mayor concentración presentan los valores más bajos.

Por otro lado, se puede observar un comportamiento variable en todos los tratamientos, debido a que aquellos que a los 35 y 42 días presentan una mejor respuesta, al final presentan los valores más bajos (v. tabla 3 del anexo 2).

GRÁFICA 2.
Seguimiento del diámetro del tallo en plantas inoculadas con diferentes cepas de *Azospirillum* y diferentes concentraciones de inóculo. La línea indica la separación entre dos grupos con DES en sus pendientes.

Cepas y concentraciones *Azospirillum*

- ◆ Testigo
- Cd-8
- △ Cd-5
- VS9-8
- ◆ VS9-5
- × VS1-8
- CPM167-10



4.2.4 Altura, diámetro del tallo, pesos fresco y seco de parte aérea y raíz

En los cuadros 4 y 5 se muestra que a los 35 días no se observan DES en ninguna de las variables estudiadas, sin embargo estas se hacen evidentes a los 70 días como se describe a continuación:

Altura: En el cuadro 4 se observa que en los tratamientos VS1 y VS9 (10^5 y 10^8) los incrementos fluctuaron entre el 25 y el 51 % con respecto al testigo, en tanto que los tratamientos restantes presentan valores similares. Estos resultados contrastan con lo reportado por Bashan *et al.* (1989a) quienes al inocular jitomate con la cepa Cd obtienen DES e incrementos superiores al 25 % en dicha variable y en este mismo tiempo. A los 70 días se presentan DES entre todos los tratamientos con respecto al testigo, con incrementos superiores al 50 % (cuadro 5), destacando las cepas VS1, VS9 10^5 y Cd 10^5 .

Diámetro del tallo: A los 35 días de desarrollo los tratamientos VS1 y CPM 167 presentan valores superiores al 18% con respecto al testigo (v. cuadro 4); en tanto que a los 70 días la mejor respuesta (DES con respecto al testigo) se obtiene con VS9 10^5 , VS1, Cd 10^5 y VS9 10^8 (en orden decreciente). Con excepción de Cd 10^8 el resto de los tratamientos presenta incrementos superiores al 18%. En este sentido Bashan *et al.* (1989a) reportan DES a los 45 días en diámetro del tallo entre la cepa Cd y el tratamiento no inoculado. En el presente trabajo, este comportamiento únicamente se presenta con Cd 10^5 a los 70 días (cuadro 5).

Peso fresco de la parte aérea: Con esta variable, a los 35 días, nuevamente se obtienen los mejores resultados con VS1, seguida de VS9 10^8 y CPM 167, en tanto que los valores más bajos se presentan con Cd 10^8 (cuadro 4). A los 70 días la mejor respuesta se obtiene con VS9 10^5 , seguida de VS1, Cd 10^8 , CPM 167 y VS9 10^8 con las cuales se presentan DES con respecto al testigo (v. tabla 8 anexo 2). En esta variable es interesante el comportamiento de Cd 10^8 , mientras que a los 35 días presentó la menor respuesta (aún por debajo del testigo) a los 70 días se obtiene uno de los valores más altos.

Peso seco de la parte aérea: A los 35 días la mejor respuesta se obtiene con VS1, VS9 10^8 y CPM 167, lo cual coincide con los resultados de peso fresco (cuadro 4). En lo que respecta a 70 días, se encuentran DES de las cepas VS1, Cd 10^5 y VS9 10^5 con respecto al testigo (v. tabla 9 anexo 2).

Bashan (1998) en un estudio realizado con plantas de 60 días obtuvo resultados similares, en peso seco, con cepas de *A. brasilense* y *A. lipoferum* inoculadas en jitomate. Este comportamiento ha sido reportado por otros autores cuando se ha inoculado *Azospirillum* en gramíneas (Baldani *et al.* 1986; Boddey y Döbereiner, 1988; Paredes-Cardona *et al.* 1988; Pereira *et al.* 1988).

Peso fresco de raíz: Con los tratamientos VS9 10^8 , VS1 y CPM se presentaron incrementos del 102 al 133% con respecto al testigo (35 días, cuadro 4). Este tipo de respuesta ha sido reportada por otros investigadores al inocular gramíneas (Okon y Kapulnik, 1986; Fallik *et al.* 1988).

A los 70 días se encuentran DES, en esta variable, en todos los tratamientos con respecto al testigo, sobresaliendo VS1, VS9 10^5 y Cd 10^8 con los valores más altos. Como se puede observar, la cepa más consistente en esta variable fue VS1.

Peso seco de raíz: Debido a que a los 35 días la raíz se empleó para describir el patrón de colonización bacteriana, esta variable se determinó únicamente a los 70 días.

Con esta variable se presentan DES entre los tratamientos con concentración 10^8 con respecto al testigo y entre Cd 10^8 y VS9 10^5 (tablas 6 y 7, anexo 2). A diferencia del resto de parámetros estudiados, la mejor respuesta (aunque no significativa) se presenta con la concentración 10^8 .

Los resultados observados en pesos fresco y seco de raíz contrastan con lo reportado por Bashan y Levanony (1990) quienes reportan que concentraciones de inóculo de 10^8 UFC mL⁻¹ inhiben el desarrollo de la raíz.

De acuerdo con los resultados expuestos anteriormente se observa que:

- A los 35 días la cepa VS1 presentó la mejor respuesta con todas las variables estudiadas, en tanto que a los 70 días muestra valores máximos en tres de las seis variables y la segunda mejor respuesta con las restantes. Esto indica la consistencia del efecto de la cepa sobre el desarrollo del jitomate.
- Con la cepa VS9 se presenta un comportamiento interesante; mientras a los 35 días el segundo mejor tratamiento es VS9 10^8 , a los 70 días sobresale VS9 10^5 .
- CPM 167 es la tercer mejor cepa a los 35 días, sin embargo a los 70 días únicamente sobresale su respuesta en peso fresco de parte aérea.
- Con Cd, a los 35 días, se obtienen los valores más bajos siendo en algunos casos menor al testigo. A los 70 días, con todas las variables en estudio, se observan incrementos con respecto al testigo destacando que, con Cd 10^8 se obtiene la mejor respuesta en peso seco de raíz.

Es importante señalar que algunos autores mencionan que el efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre el crecimiento de las plantas se diluye con el paso del tiempo (Bashan y Levanony, 1990), sin embargo en este experimento se obtuvieron resultados contrarios, debido a que como se mencionó anteriormente, es hasta los 70 días cuando se hacen evidentes las DES en las variables estudiadas.

CUADRO 4. Efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre el crecimiento de plántulas de 35 días de desarrollo

Tratamiento	PARTE AÉREA			RAÍZ	
	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso fresco (g)
Testigo	5.24	1.64	0.418	0.0370	0.398
Cd 10 ⁸	5.42	1.48	0.344	0.0251	0.360
Cd 10 ⁵	5.42	1.54	0.436	0.0360	0.502
VS9 10 ⁸	6.98	1.60	0.714	0.0697	0.806
VS9 10 ⁵	6.12	1.70	0.428	0.0431	0.514
VS1 10 ⁸	7.94	2.26	1.002	0.0917	0.928
CPM 167 10 ¹⁰	5.22	1.94	0.618	0.0578	0.852
Promedio de 5 plantas					

CUADRO 5. Efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre el crecimiento de plantas de 70 días de desarrollo.

Tratamiento	PARTE AÉREA			RAÍZ		
	*Altura (cm)	*Diámetro de tallo (mm)	*Peso fresco (g)	*Peso seco (g)	*Peso fresco (g)	*Peso seco (g)
Testigo	21.12 b	5.26c	12.16 c	1.464 b	11.86 b	0.698 c
Cd 10 ⁸	32.93 a	5.64bc	47.56ab	3.632ab	36.86 a	3.716 a
Cd 10 ⁵	38.82 a	6.64ab	33.02bc	3.966 a	33.16 a	2.348abc
VS9 10 ⁸	36.69 a	6.42ab	37.70ab	3.718ab	35.28 a	3.242 ab
VS9 10 ⁵	39.58 a	7.04 a	58.98 a	3.870 a	38.14 a	1.728 bc
VS1 10 ⁸	41.46 a	6.83 a	47.68ab	5.014 a	40.92 a	3.164 ab
CPM 167 10 ¹⁰	35.33 a	6.21abc	41.48ab	3.262 ab	36.26 a	2.040abc

* Valores con letras idénticas en la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, p>0-05)

4.2.5 Aparición de Racimos Florales:

Los primeros racimos florales aparecieron en cuatro de los seis los tratamientos a los 60 días después de la siembra (gráfica 3) en tanto que en las plantas no inoculadas y las del tratamiento Cd (10^8) ocurrió hasta los 70 días, período al que las plantas inoculadas ya presentaban dos racimos florales (Tabla 10 del anexo 2) y además flores abiertas.

A los 110 días se observa que con VS1 se obtiene el mayor número de racimos, seguida de Cd y VS9 10^5 , la tercera mejor respuesta se presenta con las cepas de mayor concentración de inóculo VS9 y Cd 10^8 y CPM 167 10^{10} .

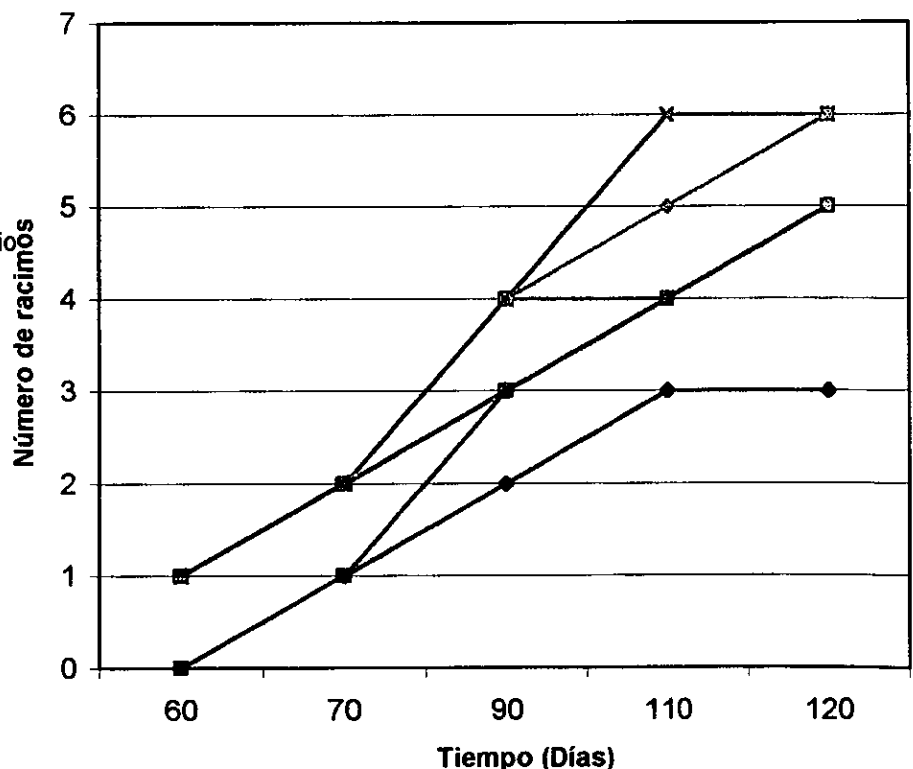
La aparición temprana de racimos florales en plantas inoculadas con *Azospirillum* fue reportado por Okon y Labandera-González (1994) al emplear cereales y pastos forrajeros.

La formación de racimos con los tratamientos inoculados se refleja en la cosecha con un adelanto de un mes. Esto económicamente representa una gran ventaja por la salida al mercado de los frutos, previa a la temporada de mayor comercialización.

GRÁFICA 3. Registro de racimos florales a diferentes períodos de tiempo. Plantas inoculadas con diferentes cepas de *Azospirillum* y concentraciones de inóculo. Los puntos indican el promedio de racimos por tratamiento

Cepas de *Azospirillum* y concentración de inóculo

- Testigo
- Cd -8
- VS9-8
- ◇ VS9 y Cd-5
- × VS1-8
- CPM167-10



4.2.6 Producción:

En el cuadro 6 se observa que con excepción de Cd y VS9 10⁸, el resto de los tratamientos presenta un incremento significativo con respecto al testigo (tablas 11 y 12 anexo 2), sin embargo con VS9 10⁸ se observó un incremento superior al 25%, valor considerado comercialmente útil para cultivos inoculados (Bashan y Levanony, 1990).

La cepa con la cual se obtiene la mejor producción es VS9 10⁵, tratamiento que además presenta diferencia significativa con el tratamiento Cd concentración 10⁸.

CUADRO 6 Producción en kg m⁻².

Tratamiento	*Producción
Testigo	6.124 c
Cd 10 ⁸	6.693 bc
Cd 10 ⁵	9.148 ab
VS9 10 ⁸	8.318abc
VS9 10 ⁵	9.972 a
VS1 10 ⁸	9.076 ab
CPM 167 10 ¹⁰	9.328 ab

* Valores con letras idénticas en la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, p>0-05)

Al comparar los resultados obtenidos en producción con los de las demás variables en estudio se observa el siguiente comportamiento:

- ♦ La mejor respuesta en producción se obtuvo con VS9 10⁵, lo cual coincide con lo observado en diámetro del tallo y en peso fresco de parte aérea a los 70 días, además de que presentó la mayor pendiente en seguimiento de altura. Con esta misma cepa en concentración 10⁸ se obtuvo la cuarta mejor respuesta en producción, lo cual contrasta con lo observado a los 35 días tiempo en el que presenta un buen comportamiento.
- ♦ Con CPM 167 se presentó el segundo mejor resultado en producción, sin embargo con esta cepa únicamente se observa un comportamiento sobresaliente a los 35 días, en seguimiento del diámetro del tallo es la cepa con menor respuesta y en altura únicamente supera al testigo, por lo tanto con esta cepa no se observa relación entre los resultados de producción y otras variables en estudio.
- ♦ En lo que respecta a Cd se observa que con la concentración 10⁵ se obtiene uno de los mejores resultados en producción, sin embargo este tratamiento presenta la menor respuesta a los 35 días, en tanto que a los 70 días presenta un comportamiento sobresaliente en diámetro del tallo y peso seco de parte aérea así como en el seguimiento de altura y número de racimos florales. Con Cd 10⁸ se obtiene la menor producción sin DES respecto al testigo, esto coincide con el comportamiento mostrado a los 35 días y aparición de racimos florales.
- ♦ La cepa VS1 presentó el mejor comportamiento a 35 y 70 días y en el número de racimos florales, sin embargo, contrario a lo esperado, al comparar los resultados de producción no se obtuvo la mejor respuesta.

Respecto a la concentración del inóculo, con Cd y VS9 las mejores respuestas se obtienen con la concentración 10^5 en la mayoría de las variables estudiadas (incluyendo producción). Este resultado contrasta con lo recomendado por Hadas y Okon (1987) para cultivo de jitomate, quienes recomiendan concentraciones superiores a 10^8 UFC mL⁻¹ de inóculo, sin embargo Bashan y Levanony (1990) mencionan que concentraciones de inóculo entre 10^8 y 10^{10} UFC mL⁻¹ inhiben el desarrollo de la raíz y que el nivel de inóculo óptimo para muchos cereales y granos de importancia industrial se sitúa entre 10^5 y 10^6 UFC mL⁻¹.

Debido al comportamiento obtenido con Cd y VS9, se recomienda el estudio de las cepas VS1 Y CPM 167 con concentraciones menores de inóculo.

4.3 BIOENSAYO 2 (B2)

Confrontación del efecto de la inoculación de *Azospirillum* en dos sistemas de siembra

4.3.1 Análisis Físico y Químico del Suelo

Los resultados expuestos en el cuadro 7 indican que el suelo empleado es adecuado para el desarrollo de las plantas de acuerdo con lo recomendado por la SARH. La textura (migajón arcillo-arenoso) le confiere una permeabilidad baja, con alta retención de agua y nutrimentos, y lento drenaje. Debido a su contenido de arcilla, presenta una alta compacidad en seco, lo cual lo hace no muy recomendable para el laboreo (Porta *et. al.*, 1994; Hillel, 1998)

El contenido de materia orgánica (Cuadro 7) coincide con la clasificación de fertilidad basada en el contenido de nitrógeno total y la cantidad de fósforo.

En lo que respecta al pH del suelo, el valor obtenido tanto en agua como en cloruro de potasio indica que está dentro del intervalo óptimo para el cultivo de jitomate (Minero, 1998).

CUADRO 7 . Propiedades físicas y químicas del suelo

Parámetro	Resultado
Color	Seco: Café grisáceo oscuro Húmedo: Negro
Textura	Migajón arcillo-arenoso
Densidad real	2.30 g cm ⁻³
Densidad aparente	1.14 g cm ⁻³
Espacio poroso	50.44 %
Materia orgánica	2.20%
Nitrógeno	0.004 ppm
Fósforo	19.79 ppm
pH	Agua (1:2.5) 7.25 KCl (1:2.5) 6.75

4.3.2 Control de calidad

De acuerdo con los resultados de producción del bioensayo 1 se decidió emplear las cepas: VS9 con ambas concentraciones, Cd 10^5 y CPM 167 10^{10} .

Los resultados del cuadro 8 indican que se logró ajustar el inóculo inicial a la población deseada.

CUADRO 8 Concentración del inóculo y su efecto sobre la adhesión de las bacterias a las semillas.

Tratamiento	A ₅₆₀	UFC mL ⁻¹
Testigo Absoluto (TA)	-----	-----
Testigo Fertilizado (TF)	-----	-----
Cd	0.008	2 X 10 ⁵
VS9	0.008	4 X 10 ⁵
VS9	0.017	1.3 X 10 ⁸
CPM-167	0.012	5.6 X 10 ¹⁰

4.3.3. Colonización bacteriana en la raíz

Los resultados del cuadro 9 confirman que la colonización de las raíces por las bacterias introducidas fue exitosa y que en el suelo empleado no existen bacterias del género *Azospirillum* o que su población fue tan baja que no se logró registrar desarrollo a las 72 h de incubación.

CUADRO 9. Colonización bacteriana en la raíz de las plántulas a 35 días y confirmación de la presencia de *Azospirillum*

Tratamiento	Colonización		
	Nfbss	Agar RC	Agar BMS
Testigo Absoluto (TA)	-	-	-
Testigo Fertilizado (TF)	-	-	-
Cd 10^5	+	+	+
VS9 10^8	+	+	+
VS9 10^5	+	+	+
CPM 167 10^{10}	+	+	+

Nfb ss + Formación de la película blanca 2 mm bajo de la superficie y su migración hacia la superficie con la consiguiente alcalinización del medio. Agar rojo congo (RC) la lectura se efectuó a los 7 días y se consideró positivo (+) la presencia de colonias pequeñas de color rojo, corrugadas y umbonadas. Agar infusión de papa (BMS) se tomó como positivo la presencia de colonias rosadas o de color crema (dependiendo de la cepa), corrugadas y umbonadas. (Tarrand *et al.*, 1978; Rodríguez Cáceres, 1982).

4.3.4 Altura

Al realizar el análisis de las pendientes para el seguimiento de altura se obtuvo que la $F_o=0.311 < F_t=2.49$ ($p < 0.05$); lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (v. tabla 14 del anexo 2). Este resultado coincide con lo reportado en el Bioensayo 1.

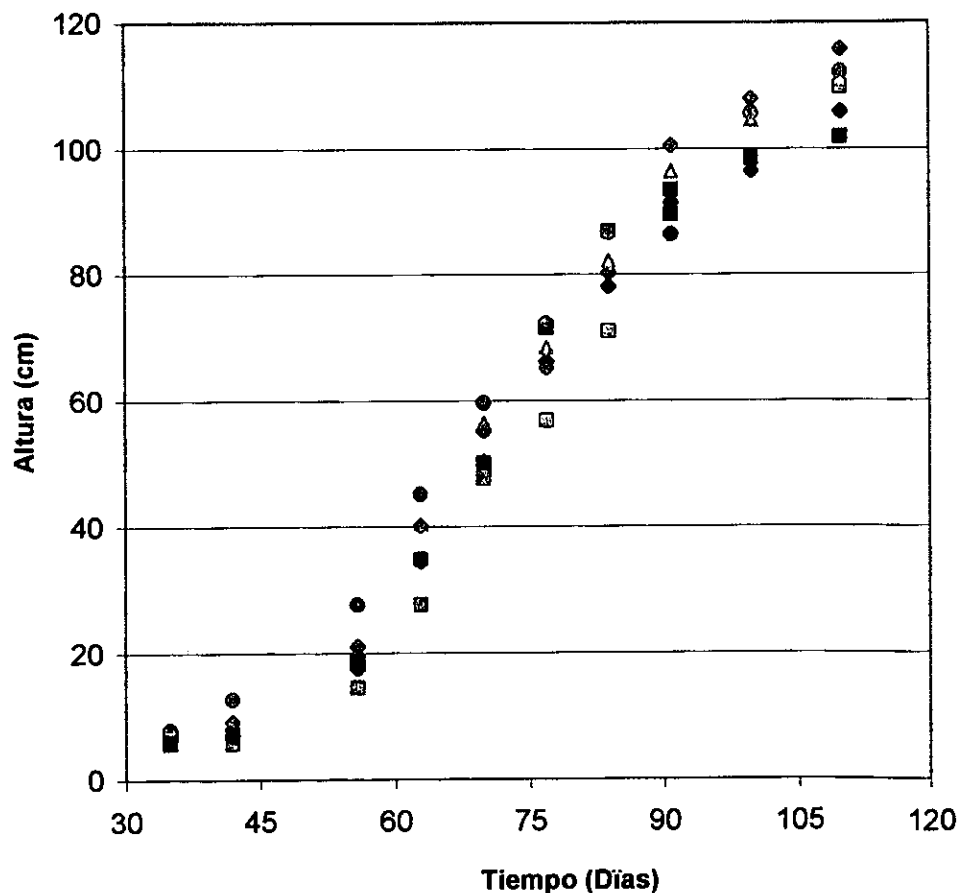
En la gráfica 4 se aprecia que: De los 45 a los 70 días sobresale en su respuesta la cepa CPM 167, la que el final tiene la segunda mayor pendiente (1.41 igual que $Cd\ 10^5$); a partir de los 90 días la mejor respuesta se obtiene con $VS9\ 10^5$, tratamiento con la mayor pendiente (tabla 14 anexo 2).

El comportamiento observado con dichos tratamientos coincide con lo reportado en el bioensayo 1.

GRÁFICA 4.
Seguimiento de la altura de las plantas. Los puntos muestran la media de cada tratamiento

Cepas de *Azospirillum* y concentraciones empleadas.

- ◆ TA
- ▣ TF
- △ Cd-5
- VS9-5
- VS9-8
- CPM167-10



4.3.5 Diámetro del Tallo

En este parámetro se confirmó el comportamiento variable observado en el bioensayo 1.

De acuerdo con la $F_o=2.64 > F_t=2.49$ al realizar el análisis de pendientes para diámetro del tallo (tablas 15 y 16, anexo 2) se detectaron diferencias parciales ($p<0.05$) entre las cepas y el testigo fertilizado con respecto al testigo sin fertilización (gráfica 5).

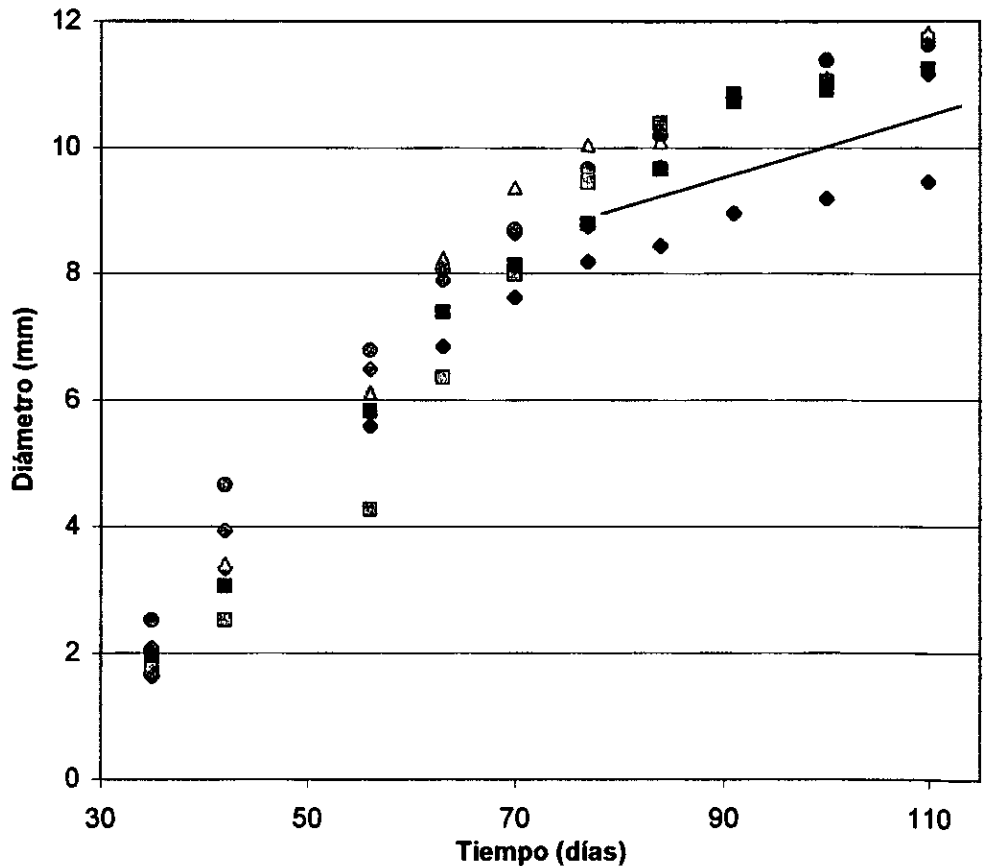
Cabe destacar que el tratamiento con mayor pendiente es el testigo fertilizado (0.146), seguida por $Cd\ 10^5$ y $VS9\ 10^8$ (0.132 y 0.129 respectivamente), $VS9\ 10^5$ y por CPM 167 (0.121 y 0.118). Estos resultados no coinciden con los obtenidos en el bioensayo 1.

GRÁFICA 5.

Seguimiento del diámetro del tallo. Los puntos muestran la media de cada tratamiento. La línea indica la separación de grupos entre los cuales existen diferencias significativas.

Cepas de *Azospirillum* y concentraciones.

- ◆ TA
- TF
- △ Cd-5
- ◆ VS9-5
- VS9-8
- CPM167-10



4.3.6 Formación de Racimos Florales

En la gráfica 6 se observa que a partir de los 60 días inició la aparición de racimos florales en todos los tratamientos. No obstante, es importante señalar que en este tiempo solo algunos de los tratamientos inoculados presentaron racimos en todas las repeticiones (v. tabla 17 del anexo 2)

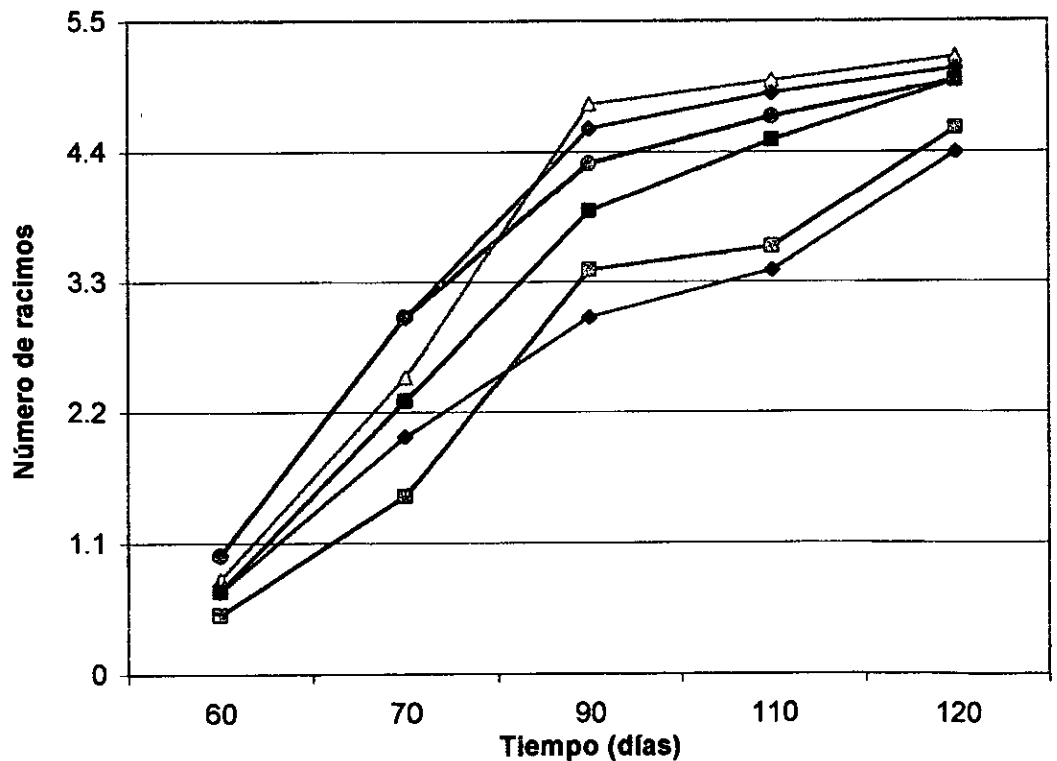
Desde los 70 días ambos testigos presentaron la menor cantidad de racimos (tabla 17, anexo 2). Las cepas con mayor número de racimos a partir de los 90 días corresponden a Cd y VS9 concentración 10^5 , seguidas de CPM-167 y VS9 10^8 . Estos resultados confirman que la mejor respuesta se obtiene con plantas inoculadas con la concentración 10^5 .

Como ocurrió en el bioensayo anterior, los tratamientos inoculados presentan una mejor respuesta, lo cual además coincide con lo reportado por Okon y Labandera-González (1994) para otro tipo de vegetales.

GRÁFICA 6.
Registro de racimos florales en diferentes períodos.
Los puntos indican el promedio de racimos por cada tratamiento.

Cepas de *Azospirillum* y concentraciones probadas.

- TA
- TF
- △— Cd-5
- ◆— VS9-5
- VS9-8
- CPM167-10



4.3.7 Producción:

En esta variable se observa que el mejor tratamiento fue Cd con incrementos del 160 al 52% con respecto a los testigos absoluto y fertilizado respectivamente (cuadro 10). En relación a las concentraciones probadas, no se observó efecto, contrario a los resultados obtenidos en hidroponia. Este comportamiento se puede deber a factores tales como la adsorción de las bacterias a las partículas del suelo y a la competitividad de la cepa con la población autóctona en la rizosfera (Bashan y Levanony, 1987).

Aún cuando no existen DES con tres de los tratamientos inoculados con respecto al testigo fertilizado se observa que en todos los casos el rendimiento de frutos fue superior al 25 %.

CUADRO 10. Producción en kg m⁻²

Tratamiento	*Producción
TA	3.737 c
TF	6.365 bc
Cd 10 ⁵	9.719 a
VS9 10 ⁵	8.429 ab
VS9 10 ⁸	8.950 ab
CPM167 10 ¹⁰	7.987 ab

* Valores con letras idénticas en la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, p>0.05)

Al analizar el comportamiento de los tratamientos con las variables de crecimiento y producción se observa que:

Con Cd 10⁵ se obtiene la mejor producción con DES con respecto a ambos testigos. Esta respuesta coincide con lo observado en el número de racimos florales. En el seguimiento de diámetro de tallo y altura presenta la segunda mayor pendiente, a pesar de que antes de los 70 días presentaba uno de los menores valores.

En el caso de VS9 la producción con ambas concentraciones de inóculo es similar, lo cual coincide con el comportamiento reportado en diámetro del tallo. En cuanto al número de racimos florales aún cuando la respuesta con ambos tratamientos es similar la mejor respuesta se obtiene con la menor concentración, este mismo comportamiento se observa en seguimiento de altura.

Por otro lado, los resultados de producción difieren de los observados en el bioensayo 1 (B1): Con VS9 10⁸ es similar en ambos bioensayos (8.318 en B1 y 8.950 B2); en tanto que con VS9 10⁵ fue superior en el experimento anterior (9.972 en B1 y 8.429 en B2). Al comparar ambas concentraciones se observa que: En B1 no existen DES entre ambos tratamientos, sin embargo el resultado obtenido con la concentración 10⁵ es superior en un 20% a 10⁸, mientras que en B2 la concentración 10⁸ presenta un incremento del 6% con respecto a la menor concentración.

En lo que se refiere a CPM 167, esta cepa presenta la menor producción entre los tratamientos inoculados, resultado semejante al obtenido en formación de racimos florales y diámetro del tallo y que contrasta con el seguimiento de altura, variable en que presenta la segunda mayor pendiente.

El comportamiento observado con ambos testigos en producción coincide con lo reportado en altura y número de racimos florales. En diámetro del tallo el testigo fertilizado presenta la mayor pendiente, en tanto que con el testigo absoluto se presenta la menor respuesta.

En el cuadro 11 se observa que el método de siembra por transplante es significativamente diferente del sistema de siembra directa presentando además un incremento del 62.44 % (tabla 18, anexo 2).

Este efecto puede deberse a:

- La diferencia en el desarrollo de la raíz en ambos sistemas de cultivo, mientras que en el método de siembra directa la textura del suelo limitó el desarrollo de la raíz tanto longitudinal como horizontalmente, en el almácigo la única limitante fue el tamaño del vaso, sin embargo al cortar el recipiente antes del transplante se pudo observar la longitud y fortaleza de la raíz.
- La sobrevivencia de las cepas en el suelo. Kulinska y Kroczyńska (en Bashan y Holguin, 1997) aislaron 440 actinomicetos a partir de suelo y rizosfera y encontraron que la tercera parte de ellos inhiben el crecimiento de *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum*.
- La adsorción a las partículas del suelo. Las bacterias pueden moverse a partir del sitio de inoculación, en algunos casos las células de *Azospirillum* pueden ser arrastradas con el agua y en algunos otros quedan adsorbidas a las partículas del suelo (Bashan y Holguin, 1997).
- La competencia de las cepas con la población autóctona en la rizosfera. En el caso de las plantas provenientes del transplante las cepas colonizaron la raíz en una cantidad mayor a las que crecieron por siembra directa debido a que su crecimiento en Nfb ss ocurre a las 24h, en tanto que en las raíces provenientes de la siembra directa crecieron hasta las 48 ó 72 horas. Janzen y McGill (1995) demostraron que en microambientes fisio-químicamente definidos la proliferación de *Azospirillum brasilense* Cd depende más de las interacciones con otros microorganismos que de su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

CUADRO 11. Promedio de producción (kg m⁻²)

Método de siembra	*Producción
Siembra directa	5.740 b
Transplante	9.322 a

* Valores con letras idénticas en la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, p>0-05)

4.4 BIOENSAYO 3 (B3)

Comparación de la inoculación de *Azospirillum* y testigos (no inoculados) con diferentes porcentajes de fertilización

4.4.1 Control de Calidad

De acuerdo con los resultados de producción obtenidos en B2 se decidió emplear la cepa Cd concentración 10^5 y el método de siembra por transplante.

Los resultados del cuadro 12 indican que se logró ajustar el inóculo a la concentración deseada (10^5) y que la cantidad de células adheridas a la semilla fue del orden de 10^3 .

CUADRO 12. Concentración del inóculo y su efecto sobre la adhesión de las bacterias a las semillas.

Tratamiento	A ₅₆₀	UFC mL ⁻¹	UFC Semilla ⁻¹
Testigo	---	---	---
Cd	0.010	8 X 10 ⁵	5 X 10 ³

4.4.2 Colonización bacteriana en la raíz

En el cuadro 13 se observa que en el tratamiento inoculado con Cd la colonización de las raíces en el almácigo fue exitosa y el testigo estuvo libre de contaminación.

En la resiembra de cada tubo en Agar RC y BMS, no se observaron colonias atípicas, esto permitió confirmar que no hubo contaminación con otro tipo de bacterias como las pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* o *Pseudomonas* que han sido citados por Tarrand *et al.* (1978) y Rodríguez-Cáceres (1982).

CUADRO 13. Colonización bacteriana en la raíz de las plántulas a 35 días y confirmación de la presencia de *Azospirillum*.

Tratamiento	Colonización Nfbss	Comprobación	
		Agar RC	Agar BMS
Testigo	-	-	-
Cd 10 ⁵	+	+	+

Nfb ss + Formación de la película blanca 2 mm bajo de la superficie y su migración hacia la superficie con la consiguiente alcalinización del medio. Agar rojo congo (RC) la lectura se efectuó a los 7 días y se consideró positivo (+) la presencia de colonias pequeñas de color rojo, corrugadas y umbonadas. Agar infusión de papa (BMS) se tomó como positivo la presencia de colonias rosadas o de color crema (dependiendo de la cepa), corrugadas y umbonadas.

4.4.3 Altura

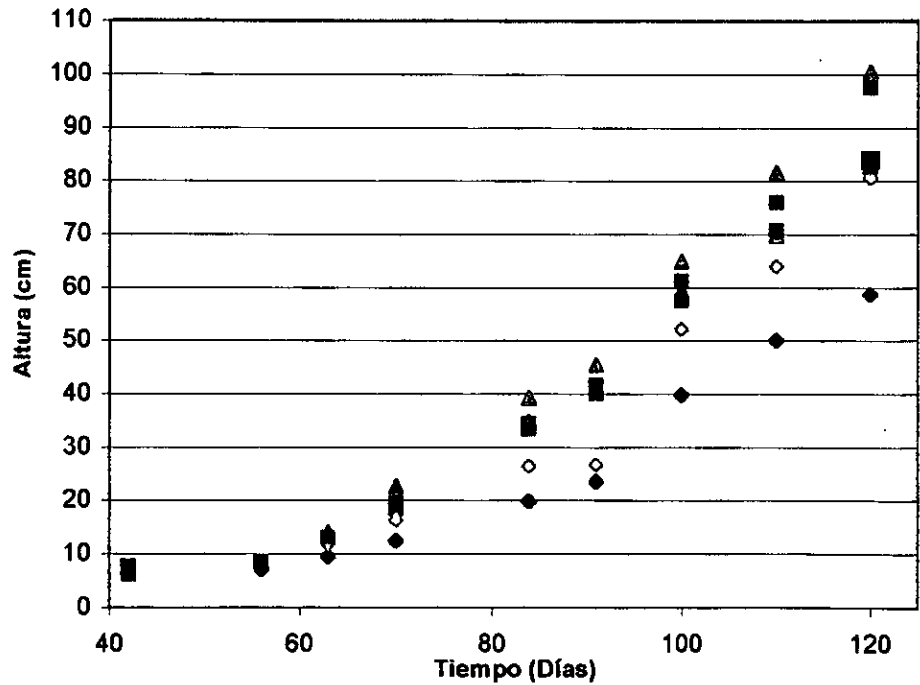
En la gráfica 7 se observa que no existen diferencias significativas en el análisis de pendientes ($F_0=1.357 < F_t=2.45$), sin embargo a los 120 se observan incrementos superiores al 37% de todos los tratamientos con respecto al testigo sin fertilizante (tablas 21 y 22 del anexo 2).

En todos los casos las pendientes de los tratamientos inoculados son mayores a las de sus testigos lo cual coincide con lo observado en el bioensayo 2. Con respecto a las dosis de fertilización los valores superiores corresponden a los tratamientos con el 100% de fertilización (tabla 22 del anexo 2)

GRÁFICA 7. Análisis de pendientes de altura de las plantas testigo (T) y Cd 105 UFC/ml con diferentes dosis de fertilización: 0%, 50% y 100% de fertilización (0, 50 y 100).

- ◆ T-0
- ▲ T-50
- T-100
- ◇ Cd-0
- ▲ Cd-50
- Cd-100

Los puntos indican la media por tratamiento.



4.4.4 Diámetro del Tallo

Al realizar el análisis de pendientes para diámetro del tallo, se encontraron diferencias parciales entre los tratamientos ($F_{tp<0.05}=2.45 < F_0=3.09 < F_{tp<0.01}=3.51$). En la gráfica 8 (tablas 23 y 24 anexo 2) se observa que el tratamiento Cd con 100% de fertilizante presentó un valor de pendiente de 0.1211 siendo mayor a los tratamientos T100%, T50% y Cd50% que formaron un grupo cuyas pendientes fueron 0.1142, 0.1042, y 0.1005 respectivamente. Un tercer grupo quedó conformado por los tratamientos Cd y Testigo sin fertilizante con las menores pendientes (0.0779 y 0.0744 respectivamente).

Con excepción de la dosis de 50% de fertilización, el tratamiento inoculado presenta una mejor respuesta con respecto a sus testigos.

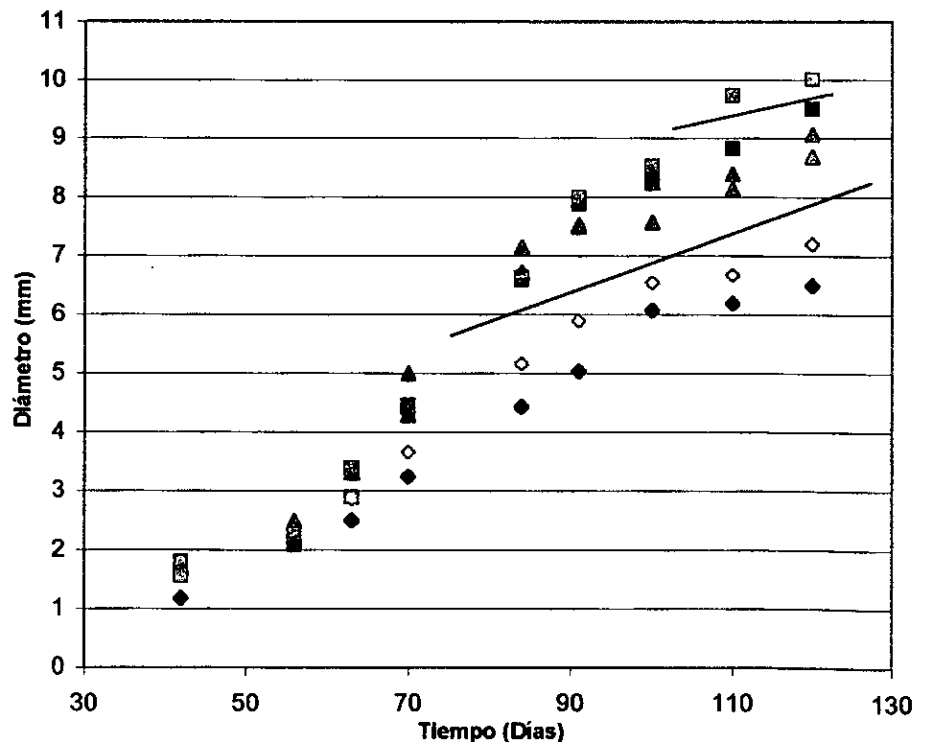
Los resultados de este bioensayo confirman:

- El comportamiento variable en la respuesta de los tratamientos en diámetro del tallo.
- Que a diferencia de la altura, con esta variable si se observan diferencias significativas en la tasa o promedio de crecimiento representada por la pendiente.

GRÁFICA 8. Seguimiento del diámetro del tallo en plantas testigo (T) y Cepa Cd. Los puntos indican la media de cada tratamiento. Las líneas mostradas señalan la separación de grupos de acuerdo con las DES de las pendientes.

Tratamientos empleados.

- ◆ T-0
- ▲ T-50
- T-100
- ◇ Cd-0
- ▲ Cd-50
- ▣ Cd-100



4.4.5 Formación de Racimos Florales

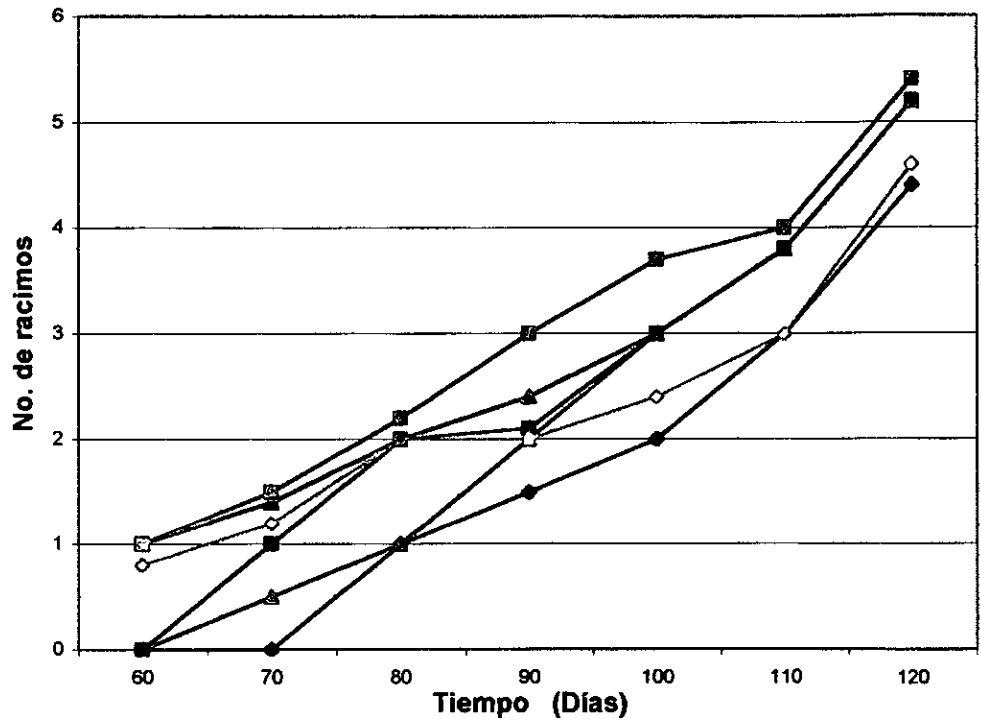
En la gráfica 9 se aprecia que el mejor tratamiento en esta variable corresponde a Cd con el 100% de fertilización, el cual desde las etapas iniciales de la floración se mantuvo un comportamiento constante.

El testigo sin fertilizante fue el último tratamiento en iniciar la aparición de racimos (tabla 25 anexo 2) , y los cuatro tratamientos restantes mantuvieron un comportamiento irregular. El comportamiento presentado en esta variable es similar al observado en el seguimiento del tallo.

GRÁFICA 9. Formación de racimos florales en plantas sin inocular (T) y con Cd a diferentes períodos de tiempo.

Tratamientos empleados.

- ◆ T0%
- ▲ T50%
- T100%
- ◇ Cd0%
- △ Cd50%
- ◻ Cd100%



4.4.6 Producción

Los resultados del análisis estadístico (factorial) muestran que no existe interacción entre los factores en estudio (tratamientos y dosis de fertilización).

Al comparar la producción obtenida por tratamiento (factor 1) se observa que no existen DES entre Cd y el testigo no inoculado (Tabla 26 anexo 2), sin embargo se presenta un incremento del 11% con la cepa estudiada (cuadro 14).

CUADRO 14. Producción en tratamiento con y sin inóculo.

Tratamiento	kg m ⁻²
Testigo	5.976
Cd	6.635

En lo que respecta a las diferentes dosis de fertilización (factor 2), se observan diferencias significativas (tabla 27 anexo 2) entre las plantas fertilizadas con respecto a las no fertilizadas con incremento superiores al 264%, lo cual confirma que el jitomate es una planta con alta demanda de nutrimentos.

CUADRO 15. Producción por dosis de fertilización.

Dosis de fertilización	*kg m ⁻²
0%	2.078 b
50%	7.564 a
100%	9.161 a

* Valores con letras idénticas en la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, p>0.05)

A pesar de que no existe interacción entre los factores, al realizar la comparación de las diferentes combinaciones de los factores se aprecia que con los tratamientos inoculados siempre se obtiene una mejor respuesta en comparación con los testigos no inoculados con incrementos que fluctúan entre el 9 y el 18 %.

CUADRO 16. Producción en kg m⁻² por combinación de factores.

Dosis de fertilización	Testigo	Cd
0%	1.995	2.162
50%	7.316	7.847
100%	8.427	9.895

La comparación entre los resultados de producción con otras variables estudiadas demuestra que:

El resultado obtenido en producción (cuadro 16) coincide con el comportamiento observado en el seguimiento del diámetro del tallo y número de racimos florales con todos los tratamientos en estudio.

Al analizar la respuesta de las variables estudiadas con respecto a la producción obtenida en los tres bioensayos se presenta el siguiente comportamiento:

- ◆ El comportamiento observado en el seguimiento de altura no coincide con los resultados de producción en ninguno de los tres bioensayos (con excepción de VS9 10⁵ en B1).
- ◆ En la mayoría de los casos el valor de la pendiente del seguimiento de diámetro de tallo coincide con los datos de producción, particularmente con el comportamiento observado después de los 70 días de desarrollo.
- ◆ La aparición de racimos florales coincide con lo obtenido en producción únicamente en los bioensayos 2 y 3 .

En lo que respecta a la producción, la comparación de los resultados obtenidos en los tres bioensayos con lo reportado en la literatura se menciona a continuación:

La producción del jitomate en invernadero depende de factores como la variedad empleada así como del sustrato utilizado.

Escalante (citado por González, 1994) al trabajar diferentes variedades de jitomate empleando tezontle rojo como sustrato obtiene valores de producción que fluctúan desde 1.27 kg m⁻² hasta 8.17 kg m⁻² (v. cuadro 17)

CUADRO 17. Producción de diferentes variedades de jitomate bajo condiciones hidropónicas utilizando tezontle rojo como sustrato

Variedad	Producción (kg m ⁻²)
Peto	1.27
Roma	4.37
Homestead	6.61
Cal-ace	7.10
Florida	8.17

González (1994) cita un estudio realizado por Dobrzanka en 1979 en el cual emplea agrolita como sustrato y obtiene valores de producción que fluctúan entre 6.82 y 11.42 Kg m⁻².

En el cuadro 18 se observa que la producción registrada en los tres bioensayos realizados se encuentra en el intervalo de valores reportados para las diferentes variedades empleadas en los estudios citados anteriormente.

Los resultados de producción obtenidos con Cd concentración 10⁵ muestran consistencia en el comportamiento de la cepa en los tres bioensayos realizados. Este hecho es contrario a lo mencionado por otros autores acerca de la inconsistencia en los resultados obtenidos con la inoculación de *Azospirillum* (Creus, 1996; Bashan y Holguin, 1997).

CUADRO 18. Producción (kg m⁻²) obtenida en los tres bioensayos realizados.
Método de siembra empleado: Transplante.

Tratamiento	B1- Agrolita	B2-Suelo	B3-Suelo
Testigo absoluto		3.973	1.995
Testigo fertilizado	6.124	9.345	8.427
Cd 10 ⁵	9.148	10.815	9.985
VS9 10 ⁸	8.318	11.243	
VS9 10 ⁵	9.972	10.272	
CPM 167 10 ¹⁰	9.328	10.290	

B1-Bioensayo 1, B2,-Bioensayo 2 y B3- Bioensayo 3.

5.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se confirmó que *Azospirillum* promueve el desarrollo de plantas de jitomate, efecto que es más marcado en el comienzo de la etapa reproductiva (70 días), en la que los mayores incrementos se registraron en peso fresco y seco de parte aérea y raíz.

En condiciones hidropónicas las variables que se pueden emplear como indicadores del comportamiento en producción son pesos fresco y seco de parte aérea (70 días) y diámetro del tallo.

En suelo, las variables de crecimiento que se relacionan con los resultados de producción son el seguimiento de diámetro del tallo y el número de racimos florales.

La aparición temprana de racimos florales se presentó tanto en condiciones hidropónicas como en suelo en plantas de *Lycopersicon esculentum* inoculadas con *Azospirillum*.

No se logró establecer la concentración óptima de biofertilizante debido a que se observó que ésta varía con el tipo de cepa, sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos se recomienda probar la concentración 10^5 con un mayor número de cepas para fines de cultivos en hidroponía y para cultivo en suelo probar además diferentes concentraciones en diversas unidades de suelo.

La mejor producción con los tratamientos inoculados se obtiene mediante el sistema de trasplante.

En el suelo empleado el efecto de *Azospirillum* se manifestó solo en presencia de dosis altas de fertilizante, por lo cual se recomienda probar diferentes dosis de fertilizante más inóculo, con más cepas en distintas unidades de suelo.

Se recomienda efectuar estudios sobre competencia y sobrevivencia de las cepas en suelo para comprender mejor su interacción con la planta.

6.0 APORTACIONES

La inoculación con *Azospirillum* incrementa la producción de *Lycopersicon esculentum* en condiciones hidropónicas y en suelo.

5.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se confirmó que *Azospirillum* promueve el desarrollo de plantas de jitomate, efecto que es más marcado en el comienzo de la etapa reproductiva (70 días), en la que los mayores incrementos se registraron en peso fresco y seco de parte aérea y raíz.

En condiciones hidropónicas las variables que se pueden emplear como indicadores del comportamiento en producción son pesos fresco y seco de parte aérea (70 días) y diámetro del tallo.

En suelo, las variables de crecimiento que se relacionan con los resultados de producción son el seguimiento de diámetro del tallo y el número de racimos florales.

La aparición temprana de racimos florales se presentó tanto en condiciones hidropónicas como en suelo en plantas de *Lycopersicon esculentum* inoculadas con *Azospirillum*.

No se logró establecer la concentración óptima de biofertilizante debido a que se observó que ésta varía con el tipo de cepa, sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos se recomienda probar la concentración 10^5 con un mayor número de cepas para fines de cultivos en hidroponía y para cultivo en suelo probar además diferentes concentraciones en diversas unidades de suelo.

La mejor producción con los tratamientos inoculados se obtiene mediante el sistema de trasplante.

En el suelo empleado el efecto de *Azospirillum* se manifestó solo en presencia de dosis altas de fertilizante, por lo cual se recomienda probar diferentes dosis de fertilizante más inóculo, con más cepas en distintas unidades de suelo.

Se recomienda efectuar estudios sobre competencia y sobrevivencia de las cepas en suelo para comprender mejor su interacción con la planta.

6.0 APORTACIONES

La inoculación con *Azospirillum* incrementa la producción de *Lycopersicon esculentum* en condiciones hidropónicas y en suelo.

7.0 LITERATURA CITADA

- Baldani, V.L.D., M.A.B. Alvarez, J.T. Baldani y J. Dobereiner. 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil* 90:35-45.
- Bashan, Y. 1998. *Azospirillum* plant growth- promoting strains are non-pathogenic on tomato, pepper, cotton and wheat. *Can. J. Microbiol.* 44: 168-174
- Bashan, Y. y G. Holguin. 1997. *Azospirillum*- plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996) *Can. J. Microbiol.* 43: 103-121.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1987. Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3473-3480
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1988. Adsorption of the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to soil, Sand and Peat Particles. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1811-1820.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36: 591-608
- Bashan, Y., H. Levanony y R. E. Whitmoyer. 1991. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.* 137: 187-196.
- Bashan, Y., M. Singh y H. Levanony. 1989a. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Can. J., Bot.* 67: 2429-2439.
- Bashan, Y., Y. Ream, H. Levanony y A. Sade. 1989b. Nonspecific responses in plant growth, yield, and colonization of non cereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Bot.* 67: 1317-1324.
- Boddey, R. M. y J. Döbereiner. 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant and Soil* 108: 53-65
- Bosso, B. y C. Serafin. 1981. *El experto horticultor*. A. G. T. Editor. México. 172pp
- Bottini, R., M. Fulchieri, D. Pearce y R. P. Pharis. 1989. Identification of gibberellins A₁, A₃ and iso-A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol* 90: 45-47
- Bringas, L. 1998. Tiempos de invernadero. *Productores de Hortalizas*. Agosto: 32-36
- Cajuste, L. J. 1986. El fósforo aprovechable en lo suelos. Serie Cuadernos de Edafología 6. centro de Edafología, colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 19 pp

- Calderón, J. 1995. La fijación biológica de Nitrógeno en la Fertilización de plantas. Curso La biotecnología y su vínculo con la industria. F. Q. UNAM.
- Creus, C. M. , R. J. Sueldo y C. A. Barassi. 1996. *Azospirillum* inoculation in pregerminating wheat seeds. Can. J. Microbiol. 42: 83-86.
- Crozier, A., P. Arruda, J. M. Jasmin, A. M. Monteiro y G. Sandberg. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2833-2837.
- Dufrêne, Y. F. y P. G. Rouxhet. 1996. Surface composition, surface properties, and adhesiveness of *Azospirillum brasilense* variation during growth. Can. J. Microbiol. 42: 548-556
- Eckert, B., O. Baller, G. Kirchhoff, A. Halbritter, M. Stoffels y A. Hartmann. 2001. *Azospirillum dobereineriae* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with the C₄-grass *Misacanthus*. Int. J. of System. and Evol. Microbiol. 51:17-26
- Fallik, E., Y. Okon y M. Fischer. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: Effect of soil, organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. Soil Biol. Biochem. 20:45-49
- Fallik, E., S. Sarig y Y. Okon. 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In *Azospirillum*-plant associations. 77-85pp.
- FAXSA. 1999. El jitomate. <http://www.faxsa.com.mx>
- Flores, A. A. 1985. Aislamiento y caracterización de *Azospirillum* sp de la rizosfera de sorgo en Valle de Santiago, Guanajuato. Tesis de Licenciatura. F. Q. UNAM.
- Foth., H. D. 1972. Fundamentos del a ciencia del suelo. 3ª edición. Ed. CECOSA. México. 257 pp.
- Gaucher, G. 1970. El suelo y sus características agrícolas. Ed. Omega. España. 647 pp.
- Gavande, S. A. 1972. Física de suelos: Principios y aplicaciones. Ed. LIMUSA. México. 351 pp.
- 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 Cuautitlán.
- Hadas, R. y Y. Okon. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. Biol. Fertil. Soils. 5: 241-247.
- Hartmann. A. 1988. Ecophysiological aspects of Growth and Nitrogen Fixation in *Azospirillum* spp. Plant and Soil. 110: 225-238.
- Hillel, D. 1998. Environmental Soil Physics. Academic Press. USA. 771 pp.

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Snetah, J. T. Staley y S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9° ed. William & Wilkins. 754 pp.

Infoagro. 2001. El cultivo del tomate. <http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.asp>

Jain, D. K. y D. G. Patriquin. 1984. Root hair deformation bacterial attachment and plant growth in wheat- *Azospirillum* associations. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:1208-1213.

Janzen, R. A. y W. B. Mc Gill. 1995. Community-Level interactions control proliferation of *Azospirillum brasilense* Cd in microcosms. *Soil Biol. Biochem.* 27:189-196.

Kapulnik, Y., Y. Okon y Y. Henis. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31: 881-887.

López, M. 1994. *Horticultura*. Trillas. México. 386 pp.

Macalintal, E. M. y G. V. Urgel. 1992. effects of *Azospirillum* inoculated seed pieces and rate of nitrogen application yields of sugar cane. *Philipp Sugar Q.* 3: 8-10.

Michiels, K., C. Verreth, C. y J. Vanderleyden. 1990. *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* surface polysaccharide mutants that are affected in flocculation. *J. Appl. Bacteriol.* 69:705-711.

Minero, A. 1998. Producción de Transplantes. *Productores de Hortalizas*. Agosto: 18-22

Mohandas, S. 1988. Nitrogen Fixation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill 'Pusa Ruby'). *Plant and Soil* 107: 219-225

Nosko, P., L. C. Bliss y E. D. Cook. 1994. The association of free-living nitrogen-fixing bacteria with the roots of High Arctic graminoids. *Arct. Apl. Res.* 26:180-186.

Okon, Y. 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends Biotechnol.* 3: 223-228

Okon, Y. y C. A. Labandera-González. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem* 26:1591-1601

Okon, Y. y Y. Kapulnik. 1986. Development and function of *Azospirillum* inoculated roots. *Plant and Soil* 90: 3-16.

Ortiz-Villanueva, B. 1977. *Edafología*. Editorial Petan. México 291 pp.

Paredes-Cardona, E.M., M.G. Carcaño-Montiel, M.A. Mascarúa-Esparza y J. Caballero-Mellado. 1988. Respuestas del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. *Rev. Lat. Amer. Microb.* 30: 351-355.

Pereira, J.A.R., V.A. Cavalcante, J. I. Baldani y J. Döbereiner. 1988. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil* 140: 269-274.

- Porta, J., M. López-Acevedo y C. Roquero. 1994. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ed. Mundi-prensa. España. 807 pp.
- Puente, M. E. y Y. Bahsan. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Simbiosis* 15: 49-60
- Puente, M. E., G. Holguin, B. R. Glick y Y. Bashan. 1999. Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraeferans* and *Azospirillum brasilense* in seawater. *FEMS Microbial Ecology* 29: 283-292.
- Ramírez-Gama, R. M. y B. Luna-Millán. 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: 143-165.
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna-Millán, O. Velázquez-Madrado, L. Vierna-García, A. Mejía-Chávez, G. Tsuzuki-Reyes, L. Hernández-Gómez e I. Mügggenburg. 2000. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. Facultad de Química, UNAM.
- Resh, H. M. 1992. *Cultivos Hidropónicos*. 3ª Ed. Madrid, España. Ed. Mundi-Prensa. 351 pp.
- Rodríguez-Cáceres, E. A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. and Environ. Microbiol.* 44(4): 990-991
- Rodríguez H., C. 1997. "Recetas insecticidas utilizadas en la agricultura tradicional". *Boletín de la Red de Acción sobre plaguicidas y alternativas en México*. Enero-abril. *Boletín* 17: 3-5
- Ruiz, A. y E. Ortega. 1979. *Prácticas de Laboratorio de Química de suelos*. Patronato de la Universidad Autónoma de Cahuquingo. México. 76 pp.
- Saha, K. C., S. Sannigrahi y L. N. Mandal. 1985. Effect of inoculation of *Azospirillum lipoferum* on nitrogen fixation in rhizosphere soil, their association with roots, yield and nitrogen uptake by mustard (*Brassica juncea*) *Plant Soil* 87:273-280.
- SARH, 1984. *Guía para la asistencia técnica agrícola. Área de influencia del campo agrícola experimental "Valle del Mayo"*. 272 pp.
- Sarig, S. , Y. Okon y A. Blum. 1992. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on growth dynamics and hydraulic conductivity of *Sorghum bicolor* roots. *J. Plant Nutr.* 15: 805-819.
- Steenhoudt, O. Y J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 487-506.
- Tarrand, J. J., N. R. Krieg y J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study for *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 29:1010-1016.

- Tien, T. M., M. H. Gaskins y D. H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L) Appl. Environ. Microbiol. 37: 1016-1024.
- Vande, A. , J. Michiels, S. M. De Faria y J. Vanderleyden. 1993. Colonization and penetration of wheat roots by *Azospirillum brasilense* and expression of nifH gene during the association. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol 17. New Horizons in Nitrogen Fixation; 9th International Congress in Nitrogen Fixation 260 pp.
- Zaady, E. y Y. Okon. 1990. Cultural conditions affecting *Azospirillum brasilense* cell aggregation and adsorption to maize roots. Soil Biol. Biochem 22:1103-1107.
- Zaady, E., A. Perevolotski y Y. Okon. 1993. Promotion of plant growth by inoculum with aggregated and single cell suspensions of *Azospirillum brasilense* Cd. Soil Biol. Biochem 25(7): 819-823.
- Zaady, E., Y. Okon y A. Perevolotsky. 1994. Growth response of Mediterranean herbaceous swards to inoculation with *Azospirillum brasilense*, J. Range Manage. 47: 12-15.
- Zar, J. H. 1984. Biostatistical Analysis. 2ª edición. Prentice-Hall, INC. USA. 718 pp.
- Zimmer W., R. Roeben y H. Bothe. 1988. An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum*. Planta 176: 333-342.

ANEXO 1

- Medio Nfb semisólido.

Medio recomendado por Tarrand *et al.* (1978) para el aislamiento y caracterización primaria de *Azospirillum*.

Reactivo	Gramos L ⁻¹
Ácido málico	5.000
KH ₂ PO ₄	0.500
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.200
NaCl	0.100
CaCl ₂	0.020
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.500
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.002
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.010
Azul de bromotimol (solución alcohólica 0.5%)	2mL
KOH	4.000
Agar	1.750

- Medio de malato- sales

Al medio Nfbss se le adiciona cloruro de amonio (1gramo L⁻¹), además de no contener agar ni indicador.

- Medio BMS (Agar infusión de papa)

Recomendado por Tarrand *et al.* para el estudio de *Azospirillum* y descartar contaminaciones.

REACTIVO	Cantidad
Agua	1000 mL
Papas (cortadas)	200 g
Ácido málico	2.5 g
Azul de bromotimol (Sol. Alcohólica al 0.5%)	2 gotas
KOH	2.5 g
Azúcar comercial	2.5 g
*Solución de vitaminas	1.0 mL
Agar	15 g.
*0.01 g de biotina, 0.02 g de piridoxina en 1L de agua destilada)	

Se hierven las papas en 1L de agua durante 30 minutos, después se filtran con un algodón y se guarda el filtrado. El ácido málico se disuelve en 50 mL de agua y se adiciona el azul de bromotimol y la potasa hasta que la solución adquiera la coloración verde (pH 7.0). Esta solución junto con el azúcar, la solución de vitaminas y el agar se agregan al filtrado de papa. El volumen final se lleva a 1L con agua destilada. El medio se esteriliza por autoclave.

- Agar Rojo Congo (RC)

Este medio fue diseñado por Rodríguez-Cáceres en 1982 para la diferenciación de *Azospirillum* de otros microorganismos del suelo.

La observación se realiza a las 96 h cuando las colonias de *Azospirillum* adquieren color escarlata, consistencia seca, diámetro de 1.5 a 2mm, forma redonda a irregular, bordes ondulados y superficie rugosa con anillos radiales a partir del centro.

Las colonias de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* son circulares, convexas, translúcidas y dentadas, tienen margen entero y no absorben el rojo congo.

Reactivo	G L ⁻¹
Ácido málico	5.0
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
KOH	4.8
Extracto de levadura	0.5
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.015
Agar	20.0

Ajustar el pH a 7.0 con KOH 0.1N.

Adicionar asepticamente 15 ml de solución acuosa de rojo congo (1:400 ó 0.25%) previamente esterilizada.

- SOLUCIÓN NUTRITIVA

Reactivo	Gramos para 17.5 Litros
KNO ₃	11.16
Ca(NO ₃) ₂	12.17
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.35
MgSO ₄ ·7H ₂ O	9.58
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.31

Modificación a la solución de Steiner, recomendada por González (1994) para el cultivo de jitomate en condiciones hidropónicas.

Cuadro 1. Solución Nutritiva Universal de Steiner (1961) en Meq L⁻¹

	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ⁼
Meq/L (total)	7	9	4	12	1	7
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O		9		9		
KNO ₃	3			3		
K ₂ SO ₄	3					3
MgSO ₄ · 7H ₂ O			4			4
KH ₂ PO ₄	1				1	

Cuadro 2. Solución nutritiva recomendada por González (1994) en Meq L⁻¹

	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	HPO ₄ ⁼	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	SO ₄ ⁼
Meq/L (total)	14.78	1.02	1.02	6.31	8.47	9.09	10.43
KNO ₃	6.31			6.31			
Ca(NO ₃) ₂	8.47				8.47		
(NH ₄) ₂ HPO ₄		1.02	1.02			9.09	
MgSO ₄ · 7H ₂ O							9.09
FeSO ₄ · 7H ₂ O							1.34

ANEXO 2

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

▪ BIOENSAYO 1

Tabla 1. Promedio de altura (en cm) a diferentes períodos de tiempo.

Tratamientos	Promedio de la altura						
	35	42	60	70	90	110	120
Testigo	5.24	9.28	13.09	21.12	55.64	83.40	116.8
Cd 10 ⁸	5.42	10.15	19.11	32.93	76.64	111.2	138.6
Cd 10 ⁵	5.42	11.23	22.53	38.82	77.02	110.8	135.4
VS9 10 ⁸	6.98	11.79	22.59	36.69	75.76	105.0	148.8
VS9 10 ⁵	6.12	11.48	22.90	39.58	89.58	126.5	152.8
VS1 10 ⁸	7.94	12.49	25.59	41.48	80.80	114.6	141.8
CPM167 10 ¹⁰	5.22	12.26	22.93	35.33	75.22	104.0	132.2

Tabla 2. Análisis de las pendientes (Altura de las plantas).

	Testigo	Cd 10 ⁸	Cd 10 ⁵	VS9 10 ⁸	VS9 10 ⁵	VS1 10 ⁸	CPM-167 10 ¹⁰
b ₀	-51.63	-63.01	-58.81	-61.51	-69.143	-58.61	-55.90
b ₁	1.264	1.585	1.542	1.591	1.77	1.584	1.477
Σx	527	527	527	527	527	527	527
Σx ²	46089	46.089	46089	46089	46089	46089	46089
Σy	304.57	394.05	401.22	407.61	448.96	427.7	387.16
Σy ²	24424.59	39031.07	38711.56	40950.21	49634.90	42363.52	35902.4
Σxy	31034.56	39829.3	40098.36	40887.5/8	45154.16	42135.48	38620.3
n	7	7	7	7	7	7	7

$$Ac = 333623$$

$$SC1 = 3527.11$$

$$SC6 = 3842.41$$

$$Bc = 277759.74$$

$$SC2 = 4611.29$$

$$SC7 = 3540.50$$

$$Cc = 271024.65$$

$$SC3 = 3825.58$$

$$SCc = 31889.58$$

$$SC4 = 4677.04$$

$$SCp = 29412.71$$

$$SC5 = 5388.78$$

$$GLp = 49 - 2(7) = 35$$

$$F_0 = \frac{31889.58 - 29412.71/6}{29412.71/35}$$

$$F_0 = 412.81/840.36 = 0.49$$

$$F_t = 2.49 \quad (p < 0.05)$$

Tabla 3. Promedio del diámetro (en mm) del tallos a diferentes periodos de tiempo.

Tratamientos	Promedio del diámetro del tallo						
	35	42	60	70	90	110	120
Testigo	1.64	3.04	3.89	5.26	9.20	9.94	10.84
Cd 10 ⁸	1.48	3.40	4.87	5.64	9.10	9.70	10.12
Cd 10 ⁵	1.54	3.67	5.71	6.64	9.46	9.86	10.72
VS9 10 ⁸	1.60	3.54	5.61	6.42	8.80	9.10	9.32
VS9 10 ⁵	1.70	3.44	6.38	7.04	9.96	10.48	10.90
VS1 10 ⁸	2.26	3.56	6.11	6.83	9.22	9.24	9.52
CPM16710 ¹⁰	1.94	3.70	5.21	6.21	7.28	7.96	8.74

Tabla 4. Análisis de las pendientes (Diámetro del tallo).

	Testigo	Cd 10 ⁸	Cd 10 ⁵	VS9 10 ⁸	VS9 10 ⁵	VS1 10 ⁸	CPM-167 10 ¹⁰
b ₀	-2.08	-1.25	-0.88	-0.23	-0.85	-0.30	-0.46
b ₁	0.111	0.101	0.102	0.087	0.110	0.085	0.072
Σx	527	527	527	527	527	527	527
Σx ²	46089	46089	46089	46089	46089	46089	46089
Σy	43.81	44.31	47.6	44.39	49.9	46.74	41.04
Σy ²	355.68	348.59	394.16	334.89	432.83	362.78	275.90
Σxy	40008.88	3982	4237.84	3902.08	4436.78	4061.92	3550.2
n	7	7	7	7	7	7	7

Ac= 32262.3 SC1= 6.89 SC6= 4.80
 Bc= 27681.7 SC2= 4.55 SC7= 2.43
 Cc= 2504.83 SC3= 4.50
 SCc= 129.69 SC4= 4.39
 SCp= 33.37 SC5= 5.72

GLp= 49-2 (7)= 35

F0= $\frac{129.69-33.37}{6} = 16.05 / 0.95 = 16.89$
 $\frac{33.37}{35}$

Ft= 2.49 (p<0.05)

Ft= 3.5 (p<0.01)

TABLA 5 ANOVA de pesos fresco y seco de raíz y parte aérea

		Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	Ft.
PESO FRESCO DE RAÍZ A 35 DÍAS	Entre Grupos	1.444	6	.241	1.459	2.45
	Dentro de Grupos	4.619	28	.165		
	Total	6.064	34			
PESO FRESCO PARTE AÉREA A 35 DÍAS	Entre Grupos	1.512	6	.252	1.661	2.45
	Dentro de Grupos	4.247	28	.152		
	Total	5.759	34			
PESO SECO PARTE AÉREA A 35 DÍAS	Entre Grupos	1.490E-02	6	2.483E-03	1.786	2.45
	Dentro de Grupos	3.893E-02	28	1.390E-03		
	Total	5.382E-02	34			
PESO FRESCO DE RAÍZ 70 DÍAS	Entre Grupos	2832.419	6	472.070	7.454	2.45
	Dentro de Grupos	1773.336	28	63.333		
	Total	4605.755	34			
PESO SECO DE RAÍZ 70 DÍAS	Entre Grupos	32.513	6	5.419	6.091	2.45
	Dentro de Grupos	24.909	28	.890		
	Total	57.422	34			
PESO FRESCO PARTE AÉREA 70 DÍAS	Entre Grupos	7149.239	6	1191.540	7.529	2.45
	Dentro de Grupos	4431.496	28	158.268		
	Total	11580.735	34			
PESO SECO PARTE AÉREA 70 DÍAS	Entre Grupos	34.436	6	5.739	4.311	2.45
	Dentro de Grupos	37.277	28	1.331		
	Total	71.713	34			

TABLA 6. Diferencias estadísticas en peso fresco de la raíz a 70 días (Tukey, HSD)

TRATAMIENTOS	b	a
Testigo	11.86	
Cd 108		33.16
CPM 167		35.28
VS9 108		36.26
CD 105		36.86
VS1 108		38.14
VS9 105		40.92

TABLA 7. Diferencias estadísticas en peso seco de raíz a 70 días (Tukey HSD).

TRATAMIENTOS	c	b	a
TESTIGO	.6980		
VS9 10 ⁵	1.7280	1.7280	
CPM-167 10 ¹⁰	2.0400	2.0400	2.0400
Cd 10 ⁵	2.3480	2.3480	2.3480
VS110 ⁸		3.1640	3.1640
VS9 10 ⁸		3.2420	3.2420
Cd 10 ⁸			3.7160

Media armónica para el tamaño de muestra= 5.000.

TABLA 8. Diferencias estadísticas en peso fresco de la parte aérea 70 días (Tukey, HSD)

TRATAMIENTOS	c	b	a
TESTIGO	12.16		
Cd 10 ⁸	33.12	3.12	
CPM 167 10 ¹⁰		37.70	37.70
VS9 10 ⁸		41.48	41.48
VS9 10 ⁵		47.68	47.68
Cd 10 ⁵		53.56	53.56
VS1 10 ⁸			58.98

Media armónica para el tamaño de muestra= 5.000.

TABLA 9. Diferencias estadísticas en peso seco de parte aérea 70 días (Tukey, HSD)

TRATAMIENTOS	b	a
Testigo	1.4640	
CPM 167 10 ¹⁰	3.2620	3.2620
Cd 10 ⁸	3.6320	3.6320
VS9 10 ⁸	3.7180	3.7180
VS9 10 ⁵		3.8700
Cd 10 ⁵		3.9660
VS1 10 ⁸		5.0140

Media armónica para el tamaño de muestra= 5.000.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Tabla 10. Promedio del número de racimos florales en diferentes períodos

Tratamiento	Promedio de racimos florales				
	60	70	90	110	120
Testigo	0	1	2	3	3
Cd 10 ⁸	0	1	3	4	5
Cd 10 ⁵	1	2	4	5	6
VS9 10 ⁸	1	2	4	4	5
VS9 10 ⁵	1	2	4	5	6
VS1	1	2	4	6	6
CPM 167	1	2	3	4	5

Tabla 11. ANOVA de producción (p<0.05)

	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	Ft
Entre Grupos	62212555.789	6	10368759.298	9.258	2.45
Dentro de Grupos	31359918.893	28	1119997.103		
Total	93572474.682	34			

Tabla 12. Diferencias estadísticas en producción (Tukey HSD).

TRATAMIENTOS	c	b	a
TESTIGO	6124.4000		
Cd 10 ⁸	6692.8000	6692.8000	
VS9 10 ⁸		8317.6000	8317.6000
VS110 ⁸			9074.9600
Cd 10 ⁵			9150.0000
CPM167 10 ¹⁰			9334.6080
VS9 10 ⁵			9966.5360

Media armónica para el tamaño de muestra = 5.000.

▪ **BIOENSAYO 2**

Tabla 13 Promedio de la altura (en cm) de plantas a diferentes períodos de desarrollo

Tratamiento	35	42	56	63	70	77	84	91	100	110
TA	6.49	7.22	17.64	34.54	50.38	66.20	78.14	91.46	96.52	105.95
TF	6.89	5.78	14.54	27.67	47.59	56.78	70.93	89.57	98.42	109.76
Cd 10 ⁵	6.46	9.03	20.56	40.54	56.50	68.45	82.22	96.49	104.68	111.41
VS9 10 ⁵	6.98	9.25	21.13	40.20	55.16	65.18	80.24	100.56	107.96	115.86
VS9 10 ⁸	5.74	7.23	18.73	34.84	50.00	71.50	86.99	93.56	101.92	98.53
CPM167 10 ¹⁰	7.86	12.74	27.65	45.21	56.69	72.20	86.68	98.32	105.67	112.25

Tabla 14. Análisis de pendientes (Altura)

	Testigo sin fertilizante	Testigo fertilizado	Cd 10 ⁵	VS9 10 ⁵	VS9 10 ⁸	CPM-167 10 ¹⁰
b ₀	-38.58	-40.70	-40.74	-42.57	-38.75	-38.49
b ₁	1.32	1.32	1.41	1.44	1.34	1.41
Σ x	777	777	777	777	777	777
Σ x ²	59585	59585	59585	59585	59585	59585
Σ y	562.76	536.75	603.74	609.45	577.18	633.35
Σ y ²	43474.25	41374.30	49536.09	51142.07	45713.90	52440.17
Σ xy	48681.7	46990.58	52132.9	52833.85	49811.85	54082.07
n	10	10	10	10	10	10

Ac= 357510

SC1= 3705.68

SC6= 4316.07

Bc= 304532.95

SC2= 3923.28

Cc= 283685.78

SC3= 4294.45

SCc= 24279.56

SC4= 4072.21

SCp= 23664.50

SC5= 3352.81

GLp= 72-12= 60

K-1= 6-1= 5

$$F_0 = \frac{24279.56 - 23664.50}{5} / \frac{23664.50}{60}$$

Fo= 123.012 / 394.41= 0.3119

Ft= 2.49 (p<0.05)

Tabla 15. Promedio del diámetro del tallo (en mm) a diferentes períodos de desarrollo.

Tratamiento	35	42	56	63	70	84	91	100	110
TA	1.63	3.34	5.59	6.85	7.63	8.45	8.97	9.20	9.47
TF	1.73	2.52	4.27	6.36	7.99	9.46	10.86	11.06	11.72
Cd 10 ⁵	1.93	3.41	6.13	8.26	9.38	10.10	10.81	11.11	11.82
VS9 10 ⁵	2.08	3.94	6.49	7.90	8.65	9.70	10.81	11.05	11.17
VS9 10 ⁸	1.96	3.06	5.82	7.40	8.14	9.59	10.74	10.92	11.25
CPM167 10 ¹⁰	2.52	4.66	6.79	8.07	8.71	9.67	10.82	11.39	11.64

Tabla 16. Análisis de pendientes (Diámetro del tallo)

	Testigo sin fertilizante	Testigo fertilizado	Cd 10 ⁵	VS9 10 ⁵	VS9 10 ⁸	CPM-167 10 ¹⁰
b ₀	-0.51	-3.012	-1.28	-0.75	-1.66	-0.17
b ₁	0.1022	0.146	0.132	0.121	0.129	0.118
Σ x	728	728	728	728	728	728
Σ x ²	58360	58360	58360	58360	58360	58360
Σ y	69.33	76.37	83	80.29	77.60	84.47
Σ y ²	543.62	707.14	792.16	729.27	697.21	795.002
Σ xy	5595.19	6344.39	6748.19	6491.63	6342.67	6783.97
n	10	10	10	10	10	10

Ac= 350160

SC1= 7.19

SC6=17.43

Bc= 38306.04

SC2= 11.86

Cc= 4264.40

SC3= 7.19

SCc= 73.88

SC4= 7.88

SCp= 57.96

SC5= 6.41

GLp= 60-12= 48

K-1= 6-1= 5

$$F_0 = \frac{73.88 - 57.90 / 5}{57.96 / 48} = 3.18 / 1.21 = 2.64$$

Ft= 2.49 (p<0.05)

Ft= 3.50 (p<0.01)

Tabla 17. Formación de racimos florales a diferentes períodos de tiempo.

Tratamiento	60	70	90	110	120
TA	0.7	2.0	3.0	3.4	4.4
TF	0.5	1.5	3.4	3.6	4.6
Cd 10 ⁵	0.8	2.5	4.8	5.0	5.2
VS9 10 ⁵	1.0	3.0	4.6	4.9	5.1
VS9 10 ⁸	0.7	2.3	3.9	4.5	5.0
CPM-167 10 ¹⁰	1.0	3.0	4.3	4.7	5.0

Tabla 18. Análisis factorial para Producción.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	F _t
Métodos de siembra	192519215.203	1	192519215.203	38.410	4.08
Tratamientos	235713015.275	5	47142603.055	9.406	2.45
Métodos*Tratamientos	36578025.760	5	7315605.152	1.460	2.45
Error	240587176.636	48	5012232.847		
Total	4108969499.585	60			
	705397432.874	59			

Tabla 19. Diferencias estadísticas por tratamiento para producción (Tukey, HSD).

TRATAMIENTOS	c	b	a
TA	3.7370		
TF	6.3650	6.3650	
CPM 167 10 ¹⁰		7.9870	7.9870
VS9 10 ⁵		8.4290	8.4290
VS9 10 ⁸		8.9500	8.9500
Cd 10 ⁵			9.7190

Media armónica para el tamaño de muestra = 10.000.
(p < 0.05)

Tabla 20. Diferencias estadísticas por Método de Siembra (Tukey). Resultados en Kg m⁻²

Método de siembra	b	a
Siembra directa	5.740	
Transplante		9.322

▪ **BIOENSAYO 3**

Tabla 21. Promedio de altura (en cm) a diferente períodos de tiempo

Tratamiento/ Fertilización	42	56	63	70	84	91	100	110	120
T 0%	7.03	7.11	9.53	12.52	19.96	23.62	39.80	50.15	58.86
T 50%	6.34	8.11	14.09	22.69	39.20	45.44	65.07	81.69	100.56
T 100%	7.72	8.65	13.00	18.50	34.37	41.61	61.34	76.12	97.56
Cd 0%	8.04	8.39	11.89	16.43	26.56	26.86	52.31	64.22	80.76
Cd 50%	7.19	8.34	13.20	20.70	34.70	40.50	59.33	69.93	82.90
Cd 100%	7.09	8.28	13.07	19.56	33.37	40.12	57.56	70.83	83.99

Tabla 22. Análisis de pendientes de Altura

	Testigo 0%	Testigo 50%	Testigo 100%	Cd 0%	Cd 50%	Cd 100%
b ₀	49.7343	49.83	50.823	51.565	47.751	48.393
B ₁	0.7131	0.7504	0.776	0.9204	0.9093	0.932
Σ x	736	736	736	736	736	736
Σ x ²	65606	65606	65606	65606	65606	65606
Σ y	228.58	383	358	295.44	336.79	333.27
Σ y ²	8867.41	25440.44	22632.65	15355.631	18850.986	18695.143
Σ xy	22555.97	38184.35	35808.95	29367.27	33223.22	33543.77
N	10	10	10	10	10	10

Ac= 393636.00
 Bc= 191983.54
 Cc= 109842.26
 SCc= 16208.345
 SCp= 13953.80

SC1= 1112.452
 SC2= 3216.230
 SC3= 3844.149
 SC4= 2209.935
 SC5= 2026.524

SC6=1544.509

GLp= 54-12= 42

K-1= 6-1= 5

$$F_0 = \frac{16208.345 - 13953.8}{5} = \frac{450.9093}{332.233} = 1.357$$

Ft= 2.45 (p<0.05)

Ft= 3.51 (p<0.01)

Tabla 23. Promedio del diámetro del tallo (en mm).

Tratamiento/ Fertilización	42	56	63	70	84	91	100	110	120
T 0%	1.18	2.12	2.51	3.25	4.44	5.04	6.07	6.19	6.50
T 50%	1.68	2.49	3.40	5.00	7.15	7.53	8.24	8.40	9.07
T 100%	1.80	2.08	2.90	4.46	6.60	7.89	8.30	8.83	9.50
Cd 0%	1.79	2.28	2.87	3.68	5.17	5.90	6.55	6.68	7.20
Cd 50%	1.71	2.21	3.32	4.30	6.72	7.50	7.57	8.13	8.69
Cd 100%	1.56	2.27	3.40	4.42	6.63	8.00	8.53	9.73	10.01

Tabla 24 . Análisis de pendientes de diámetro del tallo.

	Testigo 0%	Testigo 50%	Testigo 100%	Cd 0%	Cd 50%	Cd 100%
b ₀	-1.9403	-2.638	-3.523	-1.687	-2.653	-3.878
b ₁	0.0744	0.1042	0.1142	0.0779	0.1005	0.1211
Σ x	736	736	736	736	736	736
Σ x ²	65606	65606	65606	65606	65606	65606
Σ y	373.3	52.93	52.36	42.12	50	54.25
Σ y ²	185.273	373.585	387.784	231.086	336.592	408.523
Σ xy	3453.41	4892.83	4900.67	3866.25	4639.82	5092.64
n	10	10	10	10	10	10

Ac= 393636.00

Bc= 26845.66

Cc= 1972.843

SCc= 141.991

SCp= 133.82

SC1= 3.493

SC2= 3.688

SC3= 21.724

SC4= 3.246

SC5= 58.457

SC6=13.212

GLp= 54-12= 42

K-1= 6-1= 5

$$F_0 = \frac{141.991 - 103.82 / 5}{103.82 / 42} = 7.6342 / 2.4719 = 3.09$$

Ft= 2.45 (p<0.05)

Ft= 3.51 (p<0.01)

Tabla 25. Aparición de racimos florales

	60	70	80	90	100	110	120
T0%	0	0	1.0	1.5	2.0	3.0	4.4
T50%	0	0.5	1.0	2.0	3.0	3.8	5.2
T100%	0	1.0	2.0	2.1	3.0	3.8	5.2
Cd0%	0.8	1.2	2.0	2.0	2.4	3.0	4.4
Cd50%	1	1.4	2.0	2.4	3.0	3.8	5.2
Cd100%	1	1.5	2.2	3.0	3.7	4.0	5.4

Tabla 26. Análisis Factorial de Producción.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	Ft
Tratamientos	5.590	1	5.590	.701	4.08
Dosis de fertilización	388.628	2	194.314	24.362	3.23
TRAT * FERTIL	3.157	2	1.579	.198	3.23
Error	295.116	37	7.976		
Total	2397.367	43			
	691.866	42			

Tabla 27. Diferencias estadísticas en producción (en Kg m⁻²) . Factor: Dosis de fertilización por la prueba de Tukey HSD

% DE FERTILIZACIÓN	b	a
0%	2.07829	
50%		7.56404
100%		9.16076

Media armónica para el tamaño de muestra = 14.318.

Alpha = .05.