

1 00369



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

SELECCION E IDENTIFICACION DE  
RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL DESARROLLO  
VEGETAL AISLADAS DE CULTIVOS REGADOS CON  
AGUAS RESIDUALES Y SU EFECTO SOBRE EL  
DESARROLLO DEL JITOMATE (*Lycopersicon  
esculentum*)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS**  
(EDAFOLOGIA)

P R E S E N T A :  
**BIOL. ROSALBA ESQUIVEL COTE**

TUTOR: M. en C ROSA MARIA RAMIREZ GAMA

MEXICO, D. F.

ENERO DEL 2002

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA.

UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA  
LIBRARY

# DEDICATORIA

---

*A la mujer que más admiro en el mundo: mi mamá*

*Sra. Catalina Cote Soto*

*A mi papá, por apoyar y comprender todo lo que hago, y por ayudar a formar esta bonita familia:*

*Sr. Jorge Esquivel Vázquez*

*A mis hermanos, por su interés en mí y por el amor que nos tenemos:*

*Marisol Esquivel Cote*

*Anibal Rodrigo Esquivel Cote*

*A mis sobrinos, por la alegría que me dan:*

*Pedro Armando Zúñiga Esquivel*

*Jesús Esteban Zúñiga Esquivel*

*Ariana Esquivel González*

*A mis cuñadazos, por ser mi otra familia:*

*Pedro Zúñiga Lugo*

*Alicia González García*

*A quién ha sido mi guía en mi madurez profesional:*

*M. en C. Rosa María Ramírez Gama*

*Y por supuesto al amor de mi vida, "mi chinito":*

*Q.A. Mario Alberto Hernández Bautista*

# AGRADECIMIENTOS

---

*A la Universidad Nacional Autónoma de México.*

*A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por financiar el presente trabajo a través del proyecto 27972B.*

*A la Facultad de Química (UNAM), por el apoyo brindado a través de los Sub-programas 121 (Formación de profesores) y 128 (Formación de Técnicos Académicos).*

*A mi jurado revisor:*

*M. en C. Rosa María Ramírez Gama (Facultad de Química, UNAM)*  
*Dra. Norma Eugenia García Calderón (Facultad de Ciencias, UNAM)*  
*Dr. Gilberto Hernández Silva (Instituto de Geología, UNAM)*  
*Dr. David Flores Román (Instituto de Geología, UNAM)*  
*Dr. Ronald Ferrera-Cerrato (IRENAT, Colegio de Postgraduados)*  
*Dr. Víctor Manuel Luna Pabello (Facultad de Química, UNAM)*  
*M. en C. Manuel Faustino Rico Bernal (FES Zaragoza, UNAM)*

- *Del Laboratorio de Microbiología Experimental (Facultad de Química):*

*A mi tutora:*

*M. en C. Rosa María Ramírez Gama, por su constante apoyo y cariño hacia mí y mi trabajo, ¡maestra es usted correspondida!*

*A las profesoras:*

*Quienes estandarizaron la técnica para la determinación de sustancias parecidas al ácido indol-3-acético: la M. en C. Ma. Guadalupe Tsuzuki Reyes, quien fungió como mi asesor técnico, por su amistad, su interés y apoyo en todo momento, y la Q.F.B. Beatriz Luna Millán, por todo su apoyo e interés en mí y en mi trabajo.*

*A mis compañeras:*

*Biol. Ma. Del Carmen Urzúa Hernández y Q.F.B. Hilda Ma. del Carmen Ruiz Sotelo, por su interés y comentarios para la mejor realización del presente trabajo, así como por haber compartido conmigo la Maestría ¡muchachas ya la hicimos!.*

*A los alumnos Tesistas de Licenciatura:*

*Pas. I. Agr. José Luis Rodríguez Chávez, por el apoyo brindado en la realización del Bioensayo 2.*

*Pas Q.F.B. Ma. Elena Tenorio Zamora, por su valiosa colaboración en la caracterización primaria de cepas del género Azospirillum y bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.*

*Pas. Q.F.B. Dante González Salmorán, por su participación en la cuantificación de ácido indol-3-acético y ácido giberélico por HPLC, y por el apoyo en la obtención del suelo en el Bioensayo 6.*

*Pas. Q. A. Mario Alberto Hernández Bautista, por su apoyo y valiosísima colaboración en la realización de los Bioensayos 4 y 5, en la cuantificación de ácido indol-3-acético y ácido giberélico por HPLC, así como en la caracterización primaria e identificación por el Sistema Api, de cepas solubilizadoras de fósforo.*

*A los alumnos de Servicio Social:*

*Tonantzin Zapata Lilly (mi ahijada), por su apoyo en las determinaciones físicas y químicas de suelo.*

*Nadya Teresa Castillo Ocampo, por su apoyo en la caracterización primaria e identificación por el Sistema Api, de cepas del género Pseudomonas.*

*A mis ex compañeros de trabajo:*

*Valentín, Lizette, Berenice, Natalia y Marco Aurelio.*

*Al Laboratorista y Auxiliar de Laboratorista:*

*Roberto Saldívar y Crisóstomo Lugo, por su paciencia y apoyo brindado.*

- *Del Laboratorio de Edafología (Facultad de Ciencias):*

*A la Dra. Norma Eugenia García Calderón, por su asesoría y apoyo en las salidas a campo y el muestreo de suelos, en el Valle del Mezquital, Hidalgo.*

*A M, en C, Abel Ibáñez y Pas. Biol. Ivan Emanuel Solís, por su colaboración en la toma de muestras de suelo y plantas en el Valle del Mezquital, Hidalgo.*

*A la M. en C. Rosalía Ramos Bello, por su apoyo en la cuantificación de cationes en suelo, por flamometría. Así como a la laboratorista "Chelito".*

- *Del Instituto de Química (UNAM):*

*A el Dr. Roberto Arreguín Espinoza, por su apoyo con el equipo HPLC y asesoría en la cuantificación de ácido indol-3-acético y ácido giberélico.*

- *Del IRENAT (Colegio de Postgraduados, Chapingo):*

*Dr. Ronald Ferrera-Cerrato, por sus valiosos comentarios para la mejor realización del presente trabajo, así como por la donación de las cepas PGPR: T2P10Az, R1B, R2P2B y S5BE*

*A todos quienes de una u otra manera participaron conmigo en  
la feliz culminación de esta Tesis  
¡GRACIAS!*

# INDICE

CAPÍTULO	PÁGINA
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	4
1. ANTECEDENTES.....	5
1.1 MICROORGANISMOS DE LA RIZOSFERA.....	5
1.2 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL DESARROLLO VEGETAL (PGPR).....	8
1.3 SUSTANCIAS REGULADORAS DEL DESARROLLO VEGETAL.....	11
1.4 SISTEMAS CONTAMINADOS.....	14
1.5 EL JITOMATE ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ).....	18
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1 MUESTREO.....	26
2.2 CUANTIFICACIÓN DE CUATRO GRUPOS DE RIZOBACTERIAS: <i>Pseudomonas, Azospirillum, fijadoras de nitrógeno de vida libre y de fosfobacterias solubilizadoras</i> .....	29
2.3 AISLAMIENTO DE RIZOBACTERIAS: <i>Pseudomonas, Azospirillum, fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadoras de fósforo</i> .....	31
2.4 SELECCIÓN DE CEPAS PGPR DEL JITOMATE BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.....	32
2.5 IDENTIFICACIÓN DE RIZOBACTERIAS SELECCIONADAS.....	41
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
3.1 ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE SUELOS.....	43
3.2 CUANTIFICACIÓN DE CUATRO GRUPOS DE RIZOBACTERIAS: <i>Pseudomonas, Azospirillum, fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadoras de fósforo</i> .....	44
3.3 AISLAMIENTO DE RIZOBACTERIAS: <i>Pseudomonas, Azospirillum, fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadoras de fósforo</i> .....	46
3.4 SELECCIÓN DE CEPAS PGPR DEL JITOMATE BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.....	47
3.5 IDENTIFICACIÓN DE RIZOBACTERIAS SELECCIONADAS.....	84
CONCLUSIONES.....	92
CONSIDERACIONES FINALES.....	94
LITERATURA CITADA.....	95
ANEXO 1. ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE SUELO.....	106
ANEXO 2. MEDIOS DE CULTIVO.....	109
ANEXO 3. CROMATOGRAMAS DE HPLC.....	112
ANEXO 4. SISTEMA API LAB PLUS DE BioMERIEUX.....	122
ANEXO 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	128

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



1941  
1942  
1943  
1944  
1945  
1946  
1947  
1948  
1949  
1950  
1951  
1952  
1953  
1954  
1955  
1956  
1957  
1958  
1959  
1960  
1961  
1962  
1963  
1964  
1965  
1966  
1967  
1968  
1969  
1970  
1971  
1972  
1973  
1974  
1975  
1976  
1977  
1978  
1979  
1980  
1981  
1982  
1983  
1984  
1985  
1986  
1987  
1988  
1989  
1990  
1991  
1992  
1993  
1994  
1995  
1996  
1997  
1998  
1999  
2000  
2001  
2002  
2003  
2004  
2005  
2006  
2007  
2008  
2009  
2010  
2011  
2012  
2013  
2014  
2015  
2016  
2017  
2018  
2019  
2020  
2021  
2022  
2023  
2024  
2025

---

---

## RESUMEN

El presente trabajo formó parte del Proyecto de Investigación de CONACyT 27972-B "Estudio comparativo del efecto de bacterias promotoras del desarrollo vegetal sobre el crecimiento y rendimiento del jitomate".

En la agricultura moderna, basada en el suministro de grandes cantidades de energía para la obtención de rendimientos máximos, se ha soslayado la sostenibilidad de la productividad agrícola. El uso de agroquímicos ha permitido obtener incrementos sustanciales en la producción; no obstante, sus efectos adversos están impactando de manera significativa la sostenibilidad de la agricultura; estas prácticas aunadas a la producción de monocultivos muy demandantes y de la contaminación por el uso indiscriminado de agroquímicos, origina inestabilidad en los agroecosistemas, la cual se manifiesta, entre otros efectos nocivos en una mayor incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos. Por otro lado la escasez de agua en suelos agrícolas de zonas áridas y semiáridas, ha contribuido al riego indiscriminado con aguas residuales, como es el caso del Valle del Mezquital, Hgo. que utiliza las aguas provenientes de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México para riego, lo que ha provocado la contaminación de sus suelos.

En esta región se han efectuado estudios aislados respecto a la actividad microbiana total y al efecto de las aguas residuales sobre el género *Rhizobium*, pero no existen reportes respecto a otros microorganismos promotores del desarrollo vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) como fijadores de nitrógeno de vida libre, solubilizadores de fósforo, productores de fitohormonas o de sideróforos, los cuales establecen interacciones de tipo benéfico con las plantas, por lo que muchas de ellas se utilizan en la biofertilización. Esta última, intenta reducir la aplicación de agroquímicos, minimizar la contaminación ambiental y permitir de esta forma una producción agrícola sostenible. Por lo que hoy, día con día, las investigaciones son encaminadas a seleccionar aquellas cepas bacterianas que promuevan de una forma más eficiente el desarrollo de los cultivos, sin causar deterioro en el medio ambiente.

Considerando la posibilidad de que las rizobacterias que se encuentran en sitios contaminados sean más resistentes y por lo tanto tengan mayor posibilidad de sobrevivir a diferentes tipos de suelo, en este estudio se planteó como objetivo general: seleccionar e identificar rizobacterias aisladas de cultivos regados con aguas residuales, con capacidad para producir fitohormonas y que promuevan el desarrollo del jitomate (*Lycopersicon esculentum*).

Con tal fin se eligieron suelos regados con aguas residuales por diferentes períodos de tiempo. En estos se observó que la cantidad de materia orgánica va de valores medios a altos, lo que indica una influencia directa del sistema de riego, y una repercusión en la acidificación del suelo; no obstante se registraron valores de pH que van de ligeramente alcalinos a alcalinos lo que se debe a la presencia de  $\text{CaCO}_3$ .

Para la selección de bacterias, se muestrearon raíces de cuatro tipos de cultivo y se procedió después a la cuantificación y aislamiento de cepas.

En los cuatro tipos de cultivo estudiados en suelos regados con aguas residuales y con aguas blancas la cantidad de rizobacterias fue variable. Las rizobacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre se encuentran en mayor proporción; la población que resultó menor corresponde a la del segundo muestreo que coincide con la época más calurosa y seca del año. No se logró establecer ninguna relación entre el tiempo de riego con aguas residuales y su efecto sobre los diferentes grupos de rizobacterias en estudio.

Para el aislamiento se emplearon medios selectivos para *Pseudomonas*, *Azospirillum*, fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadoras de fósforo, lo que permitió la obtención de 50 cepas. 38 de ellas junto con 11 cepas de referencia fueron sometidas al proceso de selección en el que se emplearon dos criterios: a) capacidad para promover el desarrollo vegetal y b) capacidad para producir auxinas. Con tal fin, se realizaron 6 bioensayos y la determinación de auxinas por los métodos de Bric *et al.*, (1990) y de Gordon y Weber (1951), aspecto que fue confirmado en algunas cepas mediante HPLC.

En los tres primeros bioensayos (B1, B2, B3) se seleccionaron 28 cepas, cuyo efecto se confirmó en otros dos bioensayos (B4, B5); en el cuarto se confirmó el efecto observado a los 35 días; el quinto a los 70 días, permitió evaluar si los cambios observados a nivel de plántula, permanecen o se desvanecen en las etapas de maduración del cultivo. Con base en los resultados obtenidos, en el sexto bioensayo (B6) se evaluó el efecto de tres cepas seleccionadas, experimento que se condujo hasta producción y en el que se empleó suelo como sustrato.

En términos generales se observó que el efecto a los 35 días no permanece a los 70 días en todas las variables.

Algunas cepas de *Azospirillum* junto con las del género *Pseudomonas*, producen aumentos mayores al 100% en el diámetro del tallo y 500% en peso fresco de la parte aérea, respecto a su testigo, lo que se manifestó en los valores de peso seco, con proporciones de 1065-1208%.

Las cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, promovieron en más del 100% el desarrollo de todas las variables a 70 días de desarrollo, respecto al testigo.

El menor efecto se registró con las bacterias solubilizadoras de fósforo, respecto a su testigo, ya que a 70 días de desarrollo, en la altura de la parte aérea se registró desde un efecto detrimental (-8.3%), hasta sólo un 89% de incremento. No obstante, con las otras cepas se registraron aumentos de 365% a 501% peso fresco de la parte aérea y de 275% a 480% en longitud de raíz.

Al tratar de correlacionar los resultados de los bioensayos con la cantidad de auxinas producidas *in vitro* no se observó la correlación esperada, ya que algunas de las cepas seleccionadas en el bioensayo produjeron de 3.8 a 100 ppm de auxinas, en tanto que algunas de las no seleccionadas produjeron hasta 227 ppm.

Lo anterior se confirmó al cuantificar, por HPLC, el ácido indol-3-acético (AIA) y ácido giberélico (AG) en cultivos de 12 cepas, de las cuales 5 fueron seleccionadas en el B5 por promover el desarrollo de jitomate. Los resultados mostraron que 2 de las cepas producen ambas fitohormonas, mientras que una tercera sólo produce AG, todas pertenecientes al género *Azospirillum*. En tanto que aquellas que promovieron y no promovieron el crecimiento y en las que se habían detectado cantidades elevadas de compuestos indólicos, no produjeron AIA ni tampoco AG, por lo que las lecturas iniciales se atribuyen a la presencia de otros compuestos indólicos, algunos de carácter regulador del crecimiento o, a interferencias por los compuestos en los medios de cultivo empleados.

Los resultados del rendimiento (B6) permitieron la separación de los tratamientos en tres grupos, dos estadísticamente diferentes entre sí y uno intermedio. El primero incluye un tratamiento inoculado (a); el segundo al testigo con la fertilización media (b) y el intermedio (ab) incluye al testigo con fertilización completa y dos tratamientos inoculados con fertilización media, lo que indica que, mediante la inoculación, es factible reducir las necesidades de la fertilización química y así obtener rendimientos iguales, que cuando se emplea una dosis completa.

Finalmente, mediante pruebas específicas, se identificaron 5 cepas como pertenecientes al género *Azospirillum*, 8 se lograron caracterizar como fijadoras de nitrógeno de vida libre, una de ellas como del género *Beijerinckia* y mediante el Sistema Api una como *Klebsiella terrigena*. A través de este mismo Sistema, se identificaron 10 como *Pseudomonas fluorescens*, 1 como *Pantoea agglomerans* y 1 de la familia Brevibacteriaceae.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCCIÓN

Es sabido que durante el crecimiento de las plantas, éstas interactúan íntimamente con los microorganismos del medio ambiente. Aquellos que establecen interacciones de tipo benéfico se conocen como promotores del desarrollo vegetal (Plant Growth Promoting Rizobacteria, PGPR); y se incluyen a aquellos que aumentan la disponibilidad de nutrientes esenciales para la planta, así como aquellos que son capaces de producir una serie de reguladores del crecimiento vegetal, tales como las auxinas y las giberelinas. Entre los principales géneros de microorganismos PGPR se tienen a *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas* y *Beijerinckia*. No obstante, el efecto de la actividad microbiana siempre estará regido por el tipo de microorganismos que predominen, el tipo de vegetales, así como las características del suelo y las condiciones ambientales que predominen.

En México el 48% de su territorio comprende zonas áridas y semiáridas, factor que influye en la producción agrícola, debido a la escasez de agua, por lo que se han buscado alternativas para suministrar de este vital líquido a los campos de cultivo. A este respecto, en el Valle del Mezquital, la productividad agrícola se basa en el riego con aguas residuales, en las cuales abundan una gran variedad de sustancias tóxicas provenientes de la industrias, así como desechos domésticos y agroquímicos (plaguicidas, herbicidas y fertilizantes) que contienen diversas clases de metales pesados. En esta región del estado de Hidalgo, se han efectuado estudios aislados respecto a la actividad microbiana total, pero no existen reportes respecto a microorganismos promotores del desarrollo vegetal, los cuales pueden tener ventaja respecto a PGPR aislados de suelos regados con aguas blancas debido a su adaptación a condiciones de stress.

La utilización de este tipo de microorganismos constituye una alternativa para mejorar las condiciones de cultivo, ya que estos son capaces de mejorar la absorción de nutrimentos por la planta, incluyendo a aquellos cultivos de importancia económica, como sucede con el cultivo de jitomate, que es la hortaliza de mayor consumo y exportación en México.

Por lo anterior en este trabajo se planteó como objetivo principal seleccionar e identificar rizobacterias aisladas de cultivos regados con aguas residuales, con capacidad para producir fitohormonas y que promuevan el desarrollo del jitomate (*Lycopersicon*

*esculentum*).

# 1. ANTECEDENTES

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1.1 MICROORGANISMOS DE LA RIZOSFERA

Existe una amplia diversidad de microorganismos que se asocian con las hojas, los tallos, las flores, las semillas y las raíces de las plantas. Los microorganismos que se encuentran comúnmente en el suelo incluyen bacterias, hongos, actinomicetos, protozoarios y algas (Paul y Clark, 1996). Siendo las bacterias el tipo más común, posiblemente porque pueden crecer rápidamente y tener la habilidad para utilizar un amplio rango de sustancias, como fuente de carbono, de nitrógeno y de energía. Muchas de estas bacterias se encuentran ligadas a la superficie de las partículas en los agregados del suelo; sin embargo, la concentración de microorganismos (por gramo de suelo) que se encuentra alrededor de las raíces es generalmente mucho más abundante que la encontrada en el resto del suelo (Lynch 1990). Según cálculos directos (microscópicamente) e indirectos (medios de cultivo) indican que frecuentemente las bacterias cubren la superficie de la raíz en rangos de 5 a 10% (Paul y Clark, 1996).

Hiltner en 1904 definió por primera vez a la rizosfera como el volumen de suelo alrededor de las raíces de leguminosas en la cual se estimula el desarrollo de las bacterias. La raíz es la fuente de compuestos orgánicos como son azúcares, aminoácidos o vitaminas lo que hace de este sitio una zona ideal para el crecimiento microbiano, los que al establecerse, interactúan con las plantas y realizan diferentes funciones relacionadas con el desarrollo de las mismas (Elliott *et al.*, 1984). En suelos fértiles, que tienen más poblaciones microbianas, el efecto no es tan pronunciado como ocurre en suelos menos fértiles (Prescott, *et al.*, 1999).

Los microorganismos son la parte integral del sistema raíz-suelo afectando morfológica y fisiológicamente a la raíz (Campbell, 1985). Pueden promover el crecimiento vegetal a través de las transformaciones (síntesis y degradación) de materia orgánica en el suelo, la movilización de nutrientes inorgánicos, y la producción de sustancias promotoras del desarrollo vegetal (auxinas, giberelinas y citoquininas) o por actuar contra patógenos, del cual deriva su potencial biotecnológico.

De acuerdo con Bowen y Rovira (1991) citado por Marschner (1995), los microorganismos del suelo son clasificados dentro de dos categorías con relación a sus efectos sobre el desarrollo vegetal:

- A. Negativo (**detrimental**): incluye a patógenos de la raíz, patógenos subclínicos, rizobacterias detriminales productores de cianida.

B. Positivo (**benéficos**): engloba a aquellos que se conocen como rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal (PGPR). Los mecanismos que involucran esta promoción han sido clasificados como indirectos y directos:

- a) Los mecanismos indirectos pueden envolver muchos aspectos de control biológico, en donde las PGPR suprimen a los fitopatógenos y plagas por la vía de producción de sideróforos, de enzimas líticas o tóxicas; antibióticos; predación o parasitismo; o inducción de mecanismos de resistencia para las plantas (Luzun y Kloepper, 1994 en Glick, 1995).
- b) Los efectos directos favorecen la nutrición vegetal por lo que se les considera responsables de la biofertilización (Ramírez-Gama, 1997).

### **1.1.1 Mecanismos de efecto directo**

Las PGPR pueden fijar el nitrógeno atmosférico y suministrárselo a las plantas, sintetizan sideróforos que pueden solubilizar y/o secuestrar el hierro del suelo y proveérselo a las células vegetales; pueden tener mecanismos de solubilización de minerales tales como el fósforo que llegan a ser disponibles para el desarrollo de las plantas; y pueden sintetizar algunos compuestos de bajo peso molecular o enzimas que pueden modular el crecimiento y desarrollo vegetal (Glick, 1995); sintetizan diferentes fitohormonas tales como auxinas, giberelinas y citoquininas, las que actúan en varias etapas del desarrollo vegetal (Barbieri y Galli, 1993; Bashan y Levanony, 1990; Srinivasan *et al.*, 1996).

### **1.1.2 Comunidad microbiana PGPR en el suelo**

La diversidad de la comunidad bacteriana en suelo es conocida a través de su amplia escala espacial, la cual está asociada a diferentes regiones geográficas, o a su escala de micrositos, incluyendo a la existente entre la raíz y la rizosfera de diferentes especies de plantas. Las PGPR cuentan con la capacidad de sobrevivir, proliferar y estimular el desarrollo de la planta-hospedero bajo la influencia de variables bióticas y abióticas, existentes en el medio ambiente; variables que comúnmente se ven reflejadas en la respuesta del desarrollo vegetal (Shishido y Chanway, 1997).

Lo anterior ha provocado múltiples estudios con fines de aplicación; no obstante el desarrollo comercial de las PGPR en la agricultura y especies forestales ha sido lento, en gran parte por la variabilidad de la respuesta en el desarrollo de la planta después de la inoculación. Dicha variabilidad está relacionada a los efectos bióticos asociados a la rizosfera. Las interacciones bióticas también involucran al inoculante bacteriano, los microorganismos nativos del suelo y a la planta hospedero, que han mostrado afectar la magnitud y dirección de desarrollo vegetal al responder a la inoculación con PGPR.

La textura y estructura del suelo en relación al contenido de nutrimentos y de humedad, aireación y pH, son factores abióticos que pueden influir tanto en el crecimiento vegetal como en el microbiano en el suelo. A los factores anteriores, se suma la interacción del efecto del clima, el cual promueve el ecosistema microbiano del suelo que es diverso y dinámico (Shishido y Chanway, 1997).

Chanway y Holl (1992) así como O'Neill *et al.*, (1992), proveyeron de evidencia para sostener que los cambios en la composición microbiana del suelo causan variabilidad en la respuesta del desarrollo vegetal. Sin embargo, pese a tales evidencias, pocos trabajos han llegado a investigar la relación entre la eficacia de las PGPR y los cambios en la comunidad microbiana del suelo y la función de estas rizobacterias.

Los sistemas rizosfera-micorizosfera pueden, por tanto, proporcionar la ayuda para que las plantas puedan estabilizarse y sobrevivir en condiciones deficientes de nutrientes, hábitat degradado o durante períodos de estrés. No obstante, la aplicación de esta tecnología depende de la efectividad e infectividad de microorganismos nativos y sobre las interacciones entre los principales participantes: los hongos o las bacterias y la rizosfera (Biró *et al.*, 2000).

### ***1.1.3 Métodos para contar los microorganismos del suelo***

La determinación de la cantidad y tipo de microorganismos presentes en el suelo es de gran importancia, debido a que son indicadores sensibles de la salud del mismo; para ello, se emplean métodos que permiten el conteo de los microorganismos presentes en el suelo, los cuales se dividen en dos grupos:

- A. **Dependientes del medio de cultivo** (método de dilución y cultivo en placa, y método de perfiles fisiológicos del nivel de la comunidad microbiana).
- B. **Independientes del medio de cultivo** (análisis de ácidos grasos fosfolipídicos, técnicas de ácidos nucleicos, análisis filigenético e hibridación fluorescente *in situ*).

Tradicionalmente el análisis de la comunidad microbiana en el suelo, se ha efectuado mediante métodos dependientes del medio de cultivo, para ello se emplea una variedad de medios de cultivo selectivos, diseñados para maximizar el descubrimiento de diferentes especies de microorganismos. Estos métodos se han usado en el estudio de la salud del suelo y han revelado una diversidad de microorganismos asociados con varias variables de calidad de suelo, tales como enfermedades y descomposición de la materia orgánica. Se ha estimado que menos del 0.1% de los microorganismos encontrados en suelos típicos de agricultura son cultivables. Esto está basado en los resultados obtenidos entre la cuenta directa microscópica en muestras de suelo y por las unidades formadoras de colonias (Hill *et al.*, 2000).



## 1.2 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL DESARROLLO VEGETAL (PGPR)

Dentro de los microorganismos PGPR existen algunos que son de vida libre (Glick, 1995), en tanto que otros se introducen en las raíces formando asociaciones mutualistas altamente especializadas. Los microorganismos que predominantemente se encuentran en la rizosfera son bacilos gram negativos, incluyendo *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Alcaligenes spp* (Alexander, 1977); fijadores de nitrógeno como *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, desnitrificantes como *Pseudomonas* y bacterias anaerobias facultativas; bacterias solubilizadoras y mineralizadoras de fósforo, conocidas como fosfobacterias (Brock y Madigan, 1993); y en menor proporción, bacilos Gram positivos o Gram variables como el género *Bacillus*, que generalmente constituye un amplio porcentaje del total, por cuenta en placa, en horizontes superiores de suelo (Paul y Clark, 1996).

### 1.2.1 *Azospirillum*

#### 1.2.1.1 Generalidades

Es un vibroide grueso o bacilo recto, mide de 0.9-1.2  $\mu\text{m}$  de largo, frecuentemente con extremos terminados en punta. Es una bacteria Gram negativa o Gram variable. Presenta gránulos intracelulares de poli- $\beta$ -hidroxibutirato. Son células con un movimiento característico helicoidal ó vibratorio en medio líquido, debido principalmente a su único flagelo polar. *A. brasilense*, *A. lipoferum* y *A. irakense* al ser cultivadas en medios sólidos forman un flagelo lateral el cual usan para desplazarse sobre la superficie. Las colonias de algunas cepas forman un pigmento rosa intenso u oscuro en agar papa. La temperatura óptima de crecimiento es de 34-37°C; algunas cepas crecen bien a pH 7 otros prefieren condiciones más ácidas; son fijadores de nitrógeno, actividad que exhiben sólo bajo condiciones de microaerofilia. Crecen bien bajo aire atmosférico en presencia de una fuente de nitrógeno fijado, como puede ser una sal de amonio. *Azospirillum* posee un tipo respiratorio y metabolismo dependiente del  $\text{O}_2$ ; bajo severas limitaciones de oxígeno algunas cepas pueden utilizar  $\text{NO}_3^-$  como aceptor final de electrones y reducirlo a  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$ . Son oxidasa positivos, quimiorganótrofos; sin embargo, algunas cepas pueden ser facultativas autótrofas del hidrógeno. Se desarrollan bien en sales de ácidos orgánicos, tales como malato, succinato, lactato y piruvato y ciertos carbohidratos pueden servir también como fuentes de carbono. Algunas especies requieren biotina (Holt *et al.*, 1994; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

#### 1.2.1.2 Especies reportadas

La primera descripción de *Azospirillum* reportó dos especies: *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* (Tarrand *et al.*, 1978).

Posteriormente y empleando el medio de cultivo semisólido libre de nitrógeno (Döbereiner, 1980) fue posible aislar y describir tres especies más: *Azospirillum amazonense* (Magalhães *et al.*, 1983), *Azospirillum halopraeferens* (Reinhold *et al.*, 1987) y *Azospirillum irakense* (Khammas *et al.*, 1989). Más tarde mediante estudios basados en rARN 16S e hibridación de ADN-ADN se reportó la especie *Azospirillum largimobile* (Sly y Stackebrandt, 1999 citado en Eckert *et al.*, 2001). Finalmente, y con estas mismas técnicas, se reportó una nueva especie: *Azospirillum doebereineriae*, la que se aisló a partir de raíces de la gramínea tipo C<sub>4</sub>, *Miscanthus* (Eckert *et al.*, 2001).

### 1.2.1.3 Distribución ecológica

Las especies de *Azospirillum* son de vida libre en suelo o en asociaciones con raíces de cultivos de cereales, plantas y plantas con tubérculos. No inducen la formación de nódulos (Holt, *et al.*, 1994). Su distribución es muy amplia, han sido aisladas a partir de suelos tropicales, subtropicales y templados de todo el mundo, incluso en países donde por sus características, no es posible tener una agricultura muy amplia como Japón (Gunarto, 1995; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

### 1.2.1.4 Importancia ecológica

Las bacterias del género *Azospirillum* fueron reconocidas como PGPR desde hace ya algunos años (Okon, 1994; Okon y Vanderleyden, 1997). *Azospirillum* puede estimular positivamente el crecimiento de las plantas, el rendimiento de los cultivos y el contenido de nitrógeno en las plantas, sin embargo éste último a menudo ha sido cuestionado (Bashan y Levanony, 1990). De este modo otros factores como la producción de sustancias promotoras del desarrollo vegetal y el incremento de la absorción de minerales debido al aumento en la longitud de la raíz, así como el número de pelos radicales, han sido considerados como los mecanismos más importantes por medio de los cuales *Azospirillum* incrementa el rendimiento de los cultivos (Lyn *et al.*, 1983).

## 1.2.2 *Pseudomonas*

### 1.2.2.1 Generalidades

Son bacilos rectos ligeramente curvados, pero no son helicoidales, miden de 0.5-1.0 x 1.5-5.0  $\mu\text{m}$ . Muchas especies acumulan poli- $\beta$ -hidroxibutirato como reserva de carbono, los cuales aparecen en inclusiones sudanofílicas. Son células Gram negativo. La movilidad se debe a la presencia de uno o varios flagelos polares, raramente son inmóviles. En algunas especies puede formarse un flagelo lateral con cortas longitudes de onda. Son aerobios, tienen un tipo de respiración y metabolismo dependientes del oxígeno como aceptor final de electrones; en algunos casos el nitrato puede ser usado como aceptor final de electrones, por lo que puede desarrollarse en condiciones anaerobias.

Muchas especies, si no es que todas, no pueden crecer bajo condiciones ácidas (pH 4.5), muchas también, no requieren factores de crecimiento orgánicos. La oxidasa puede ser positiva o negativa, y la catalasa es positiva. Son quimiorganotróficas, algunas especies son facultativas quimiolitotróficas, capaces de usar H<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub> como fuente de energía (Holt *et al.*, 1994).

#### 1.2.2.2 Especies reportadas

Existe un gran número de especies, entre las cuales se encuentran: *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *P. cepacia*, *P. diminuta*, *P. facilis*, *P. mallei*, *P. mendocina*, *P. saccharophila*, *P. solanacearum*, etc, las cuales han sido clasificadas con base en su homología de ARN ribosomal (Holt *et al.*, 1994).

#### 1.2.2.3 Distribución ecológica

El género *Pseudomonas* es metabólicamente muy versátil. Es común encontrarlo en el suelo y en aguas dulces y frecuentemente son patógenos oportunistas de plantas y humanos (Chakrabarty, 1999).

#### 1.2.2.4 Importancia ecológica

Se ha reportado que cepas de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* incrementan la elongación de raíz en plantas de canola, lechuga y tomate (Glick *et al.*, 1995) así como el rendimiento de la papa, arroz, caña de azúcar, tomate, lechuga, manzana, cítricos, frijol, trigo y plantas ornamentales (Kloepper *et al.*, 1988).

### 1.2.3 Bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre

Este proceso es llevado a cabo por bacterias que viven libremente en la rizosfera, sobre las raíces o en el interior de las mismas, sin formación de estructuras especializadas, y por las bacterias que penetran a las raíces formando estructuras altamente especializadas. A cambio las plantas le proveen a los microorganismos, el carbono necesario para su crecimiento. Como ejemplos de bacterias asociativas formadoras de estructuras altamente especializadas se tienen a *Rhizobium* y *Frankia*; de bacterias asociativas no formadoras de estructuras especializadas se encuentra a *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Bacillus azotofixans*, *Campylobacter nitrofigilis*, *Enterobacter*, *Erwinia* y *Pseudomonas*. Algunas de éstas, además de fijar nitrógeno solubilizan el fósforo, como *Azotobacter* o bien producen sustancias reguladoras del desarrollo vegetal, tal es el caso de *Azospirillum* y *Pseudomonas* (Bashan y Levanony, 1990).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre asociadas a plantas resultaron muy atractivas especialmente desde el punto de vista de la ecología microbiana.

Algunas de ellas han sido consideradas como una posible alternativa para la fertilización nitrogenada en el rendimiento de las plantas (Emtsev *et al.*, 1994) y también como agentes de control biológico (Thompson *et al.*, 1976).

#### 1.2.4 Fosfobacterias

Son microorganismos capaces de transformar el fósforo del suelo a formas que pueden ser asimiladas por las plantas. Los mecanismos mediante los que el fósforo es movilizado microbiológicamente, corresponden a: solubilización de compuestos inorgánicos de fósforo, mineralización de compuestos orgánicos con la liberación de fósforo inorgánico y oxidación o reducción de compuestos inorgánicos de fósforo.

A menudo es posible encontrar este tipo de bacterias en el suelo; sin embargo, su número no es lo suficientemente alto como para competir con otros tipos de microorganismos comúnmente establecidos en la rizosfera; por lo cual se considera que la cantidad de fósforo que liberan, generalmente no es suficiente para provocar un incremento significativo en el crecimiento de las plantas (Rodríguez y Fraga, 1999), por lo que este efecto frecuentemente es atribuido a la producción de otros metabolitos benéficos para las plantas como fitohormonas, antibióticos o sideróforos (Barea *et al.*, 1978). Estos procesos son llevados a cabo por un gran número de microorganismos del suelo, entre las bacterias se menciona a *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter*, *Bacillus megatherium*, *Cellulomonas*, *Mycobacterium* y *Streptomyces*, y como ejemplo de hongos se puede mencionar a *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Gutiérrez, 1980; Gómez de la Serna, 1986).

#### 1.2.5 Microorganismos productores de fitohormonas

Un gran número de bacterias del suelo, por ejemplo *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, y algunos hongos como *Fusarium* son capaces de producir una serie de reguladores del crecimiento vegetal tales como auxinas, giberelinas y citoquininas. De estos microorganismos sólo *Fusarium* ha alcanzado importancia industrial. En tanto que el estudio de las bacterias, particularmente *Azospirillum*, se ha limitado a demostrar el efecto que produce su inoculación sobre el desarrollo de diferentes vegetales (Klibansky y González, 1996).

### 1.3 SUSTANCIAS REGULADORAS DEL DESARROLLO VEGETAL

Las fitohormonas constituyen uno de los grupos de sustancias promotoras del desarrollo vegetal más importantes. Una hormona vegetal es definida generalmente como un compuesto orgánico sintetizado en una parte de la planta y traslocado a otra parte donde, a bajas concentraciones produce una respuesta fisiológica (Salisbury y Ross, 1992).

Las fitohormonas pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: a) estimuladores del crecimiento vegetal, los cuales incluyen a las auxinas, las giberelinas y las citoquininas; y b) inhibidores del crecimiento vegetal o antagonistas, en donde se incluye al etileno y al ácido abscísico (Taiz y Zeiger, 1991).

### **1.3.1 Auxinas**

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas en ser descubiertas y probablemente las mejor conocidas entre todas las fitohormonas. Las auxinas tienen una amplia variedad de efectos sobre el desarrollo y morfogénesis de las plantas, así como su respuesta al crecimiento de plantas por estimulación unidireccional, conocida como tropismo. Estas promueven la elongación en el desarrollo de los tallos y coleóptilos; sin embargo, también pueden inhibir la elongación de la raíz. Promueven la división celular en tallos pero pueden inhibir el desarrollo de yemas laterales. El desarrollo de frutos puede depender de la presencia de auxinas. La variedad de efectos de auxinas frecuentemente depende de numerosos factores, incluyendo el estado de desarrollo de los tejidos y los órganos, la concentración de auxinas, el tipo de auxinas (natural o sintética).

El que las auxinas tengan múltiples efectos sobre las células de las plantas, dificulta determinar cual de estos efectos están directamente relacionados a la promoción del desarrollo vegetal y cuales no. Además, las auxinas pueden influir indirectamente el alargamiento de las células a través de un número de variables biofísicas, incluyendo las propiedades de los mecanismos de las paredes celulares, presión turgente, presión osmótica, permeabilidad al agua y conductividad eléctrica.

Aunque las auxinas se encuentran en toda la planta, las concentraciones más altas se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo. Se les encuentra tanto como moléculas libres o en formas conjugadas inactivas. La concentración de auxinas libre en la planta varía de 1 a 100 mg/kg de peso fresco. En contraste, la concentración de auxinas conjugadas en ocasiones es sustancialmente más elevada (González *et al.*, 1999).

A mediados de los años 30's, dos grupos de investigación, uno en Holanda y otro en Estados Unidos, descubrieron la naturaleza química de las auxinas: el llamado ácido indol-3-acético (AIA), que existe en todas las plantas superiores. Posteriormente una gran variedad de compuestos fueron identificados también como auxinas: ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido indol láctico (AIL), ácido  $\alpha$ -naftalen acético (A $\alpha$ -NA), ácido fenilacético (AFA), ácido 2,3,6-triclorobenzóico, de éstos, el de mayor importancia es el AIA (Taiz y Zeiger, 1991). La semejanza obvia entre el aminoácido triptofano y el ácido indol acético llevó a una propuesta inicial que el triptofano representaba el precursor de la hormona. Pruebas subsecuentes utilizando el triptofano, marcado demostraron su papel como precursor (González *et al.*, 1999).

### 1.3.2 Giberelinas

En los años 50's el segundo grupo de fitohormonas que fue caracterizado corresponde a las giberelinas. Estas son un grupo de diterpenoides ácidos, encontrados en angiospermas, gimnospermas, helechos, algas, hongos y algunas bacterias. Se han aislado alrededor de 80 compuestos, definidos no sólo por su acción biológica sino por su estructura química; de hecho, algunas son biológicamente inactivas. Los efectos que han sido atribuidos a estas fitohormonas son: la elongación de tallos en plantas enanas, inducción de flores masculinas, favorecen el amarre y crecimiento de frutos, inducen la germinación de semillas, así como la producción de enzimas durante la germinación (González *et al.*, 1999; Taiz y Zeiger, 1991).

Los niveles más altos de giberelinas ocurren en la semilla; las concentraciones de giberelinas pueden variar dependiendo del tipo y tamaño. Esto es particularmente verdadero para la cubierta y embrión de la semilla, ya que representan el tejido "maternal" de los cuales derivaran los tejidos de la próxima generación de la planta. Hasta ahora no se tiene clara la función de los altos niveles de giberelinas en el desarrollo de las semillas. Sin embargo, éstas aparecen en muchos embriones jóvenes y juegan un papel muy importante en el desarrollo del suspensor<sup>1</sup> (Taiz y Zeiger, 1991).

### 1.3.3 Citoquininas

Las citoquininas fueron descubiertas como resultado del esfuerzo para encontrar factores que pudieran estimular la división celular de las plantas. Posteriormente, estas fueron conocidas por una gran variedad de efectos fisiológicos y procesos en el desarrollo vegetal, que incluyen la dilatación de la senescencia en órganos desprendibles, la movilización de nutrientes, maduración de cloroplastos, la expansión de cotiledones y el control de la morfogénesis. Las concentraciones mayores de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo, en los que existe una división celular rápida. La presencia de niveles altos de citoquininas puede facilitar su habilidad de actuar como un demandante fuerte de nutrientes. Las citoquininas también se forman en las raíces y son trasladadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles (González *et al.*, 1999).

### 1.3.4 Etileno y ácido abscísico

El etileno y el ácido abscísico (AAB) controlan los procesos que son característicos de los estados del desarrollo de las plantas, tales como la senescencia, abscisión, marchitamiento de flores y maduración de frutos.

<sup>1</sup> Células que se agrupan para que a los embriones jóvenes, probablemente, se les facilite la absorción de nutrimentos.

Además, ambas fitohormonas controlan la tasa de crecimiento bajo condiciones ambientales desfavorables por inhibición en los procesos de la división celular, síntesis de proteínas y transporte de iones. El etileno incrementa no sólo bajo condiciones de estrés de humedad, sino también en respuesta a tejidos dañados, contaminación del aire, presencia de patógenos, enfermedades por insectos, inundación y condiciones de anaerobiosis. El AAB es conocido como la hormona del estrés de la planta, regulador del crecimiento, síntesis de proteínas y otros procesos bioquímicos, principalmente bajo condiciones de sequía (Taiz y Zeiger, 1991).

### ***1.3.5 Empleo de fitohormonas en la horticultura***

Las fitohormonas o reguladores de crecimiento vegetal actúan en diferentes formas, entre otras: a) regulan la composición química de las plantas y/o el color de los frutos, b) inician o terminan la dormancia de semillas, injertos y tubérculos, c) promueven el enraizamiento y propagación, d) controlan el tamaño de las plantas o tamaño de los órganos, e) promueven, retrasan o previenen la floración, e) inducen o previenen la abscisión de hojas y/o la caída de frutos, f) controlan el tamaño del fruto y características del fruto desarrollado, g) influyen en la absorción de minerales del suelo, h) cambian la época de desarrollo del cultivo, i) incrementan la resistencia de plantas a plagas, j) aumentan la resistencia de plantas a factores ambientales, tales como temperatura, agua y contaminación del aire y k) previenen el deterioro postcosecha (Nickell, 1994).

## ***1.4 SISTEMAS CONTAMINADOS***

### ***1.4.1 Generalidades***

Se considera como un sistema contaminado aquel que presenta un cambio indeseable en las características físicas, químicas y biológicas del aire, agua, suelo o alimentos que pueden influir de diversas formas en la salud, sobrevivencia o actividades de los seres humanos u otros organismos vivos. Sin embargo, la contaminación del suelo ha recibido menos atención que la contaminación del aire y de los cuerpos de agua. Una forma de clasificar la contaminación del suelo es la siguiente: a) por aplicación directa de químicos tales como pesticidas y fertilizantes, b) por disposición de residuos antropogénicos, c) por derrames accidentales y d) por deposición de contaminantes atmosféricos. El daño causado a los suelos depende, tanto de la cantidad, como de la naturaleza física y química del contaminante (Vogel, 1997).

Los reportes más comunes en estudios de suelo, son las mediciones de diferentes procesos relacionados con el ciclo del carbono y del nitrógeno (Brookes, 1995). En tales estudios, la comunidad microbiana es frecuentemente considerada como la "caja negra". Sin embargo, son escasos los estudios sobre esta "caja negra", referentes a la composición de

especies y niveles de tolerancia de la comunidad, que pueden ser usados como indicadores de efectos tóxicos por la contaminación. Algunos estudios reportan que la presencia de concentraciones elevadas de metales puede ejercer una presión selectiva sobre la comunidad microbiana en donde son incrementados los niveles de tolerancia a metales y especies resistentes (Baath *et al.*, 1998).

#### **1.4.2 Contaminación del suelo por aguas residuales**

El uso de aguas residuales en la agricultura es una práctica frecuente en muchos Estados del país. Los beneficios del reciclamiento de aguas residuales esta basado en sus constituyentes, particularmente nitrógeno, fósforo y potasio, los cuales son de alto valor como fertilizantes para muchos cultivos. Por otro lado, el uso de este tipo de agua conlleva la degradación del suelo a través de la salinización/alcalinización, que es una de las formas más serias de degradación del suelo, afectando aproximadamente el 10% del total de la superficie de la tierra en el mundo. El problema ocurre en más de 120 países, y es más prominente en áreas áridas y semiáridas (Surange *et al.*, 1997).

La mala distribución geográfica y temporal del recurso agua, hace que resulte escaso para el 75 por ciento del país. Estas áreas están clasificadas como áridas y semiáridas (SEMARNAP, 1996).

#### **1.4.3 El Valle del Mezquital, Hidalgo**

El Valle del Mezquital está dentro de los límites del estado de Hidalgo. Situado en lo alto de la meseta mexicana, con una altitud entre 1,700 y 2,100 m. Los 495,000 habitantes del valle se dedican principalmente a actividades agrícolas, complementándose con la producción ganadera. El estándar de vida es mayor que el de la población que no tiene acceso al uso del agua residual para el riego (Romero, 1994).

Los distritos de riego 03 Tula y 100 Alfajayucan usan aguas residuales crudas del área Metropolitana de la Ciudad de México. Estas aguas residuales han recibido un tratamiento no convencional. Debido al inmenso tamaño del área de cultivo (83,000 ha en 1993-1994) y su antigüedad (91 años en operación continua), la región es uno de los ejemplos más importantes de riego con aguas residuales. El agua residual cruda, parcialmente tratada o mezclada con agua de lluvia, es altamente valorada por los agricultores debido a que se mejora la calidad del suelo por su carga de nutrientes, lo que permite aumentar la productividad (SARH, 1994; CNA, 1995). No obstante es importante considerar que las aguas residuales están contaminadas con organismos patógenos y sustancias químicas tóxicas lo que constituye un riesgo para la salud de los agricultores y consumidores de esos productos.



1.4.3.1 Localización geográfica y política

El Valle del Mezquital (Fig. 1) se ubica entre los paralelos 20° 34' 25" y 21° 09' 35" de latitud Norte y los meridianos 98° 54' 25" a 99° 34' 25" de longitud Oeste con una altitud mínima de 1800 y una máxima de 2800 m. La extensión que ocupa es de aproximadamente 387 500 ha. Políticamente se localiza en la porción central-oeste del estado de Hidalgo; el área es conocida como Valle del Mezquital, e incluye a los municipios de Actopan, Ajacuba, Cardonal, Chilcuautla, Fco. I. Madero, Ixmiquilpan, Mixiahuala, Progreso, San Salvador, Santiago de Anaya, Tasquillo, Tezontepec, Tlahuelilpan y Tlaxcoapan (Muñoz y López, 1997; Delgado y Rojas, 1987).

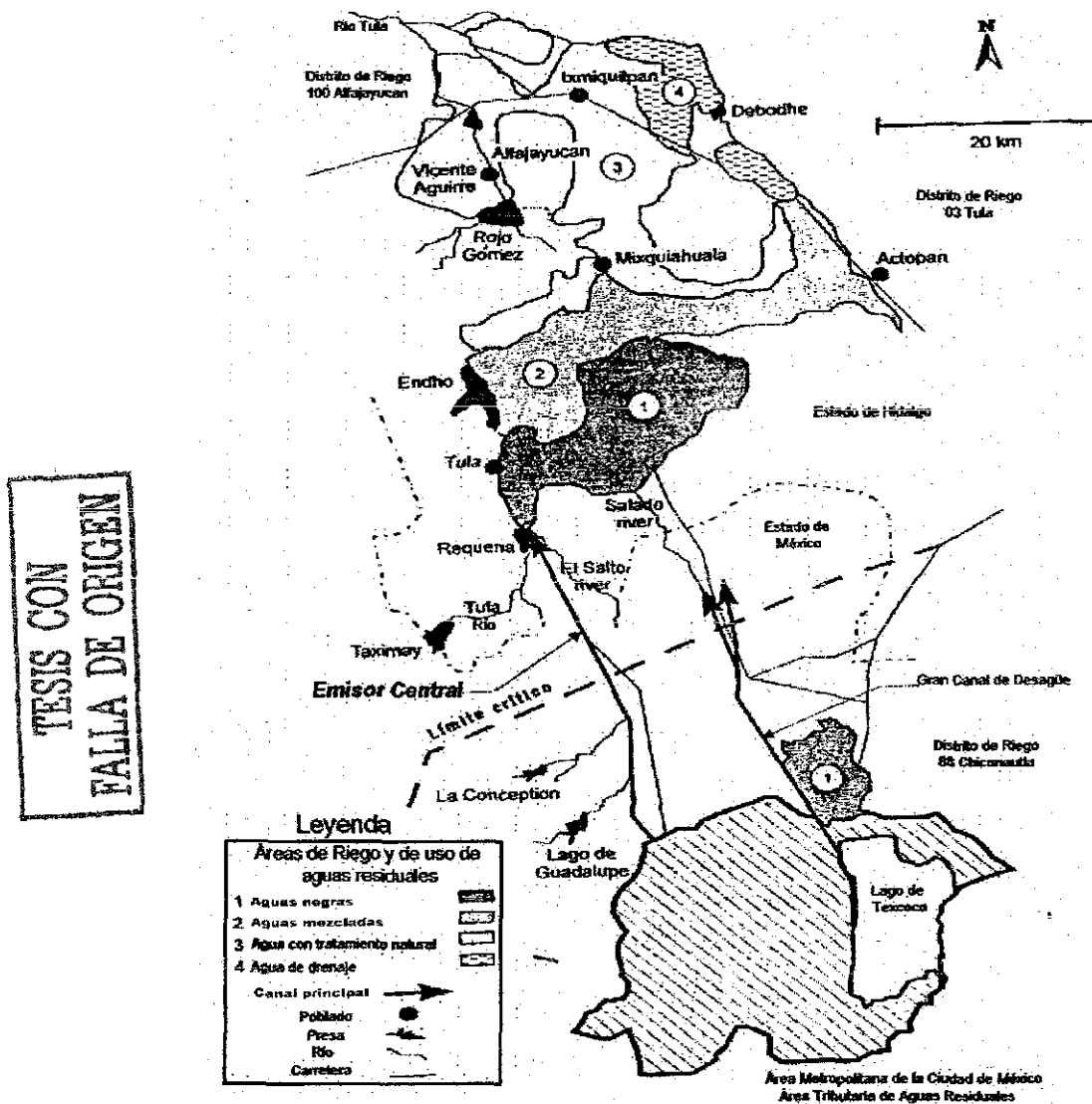


Figura 1. Mapa del sistema de riego con aguas residuales en Valle del Mezquital, Hidalgo (Romero-Alvarez, 1997).

#### 1.4.3.2 Fisiografía

De acuerdo al esquema de regionalización fisiográfica de SEDESOL (1993), el Valle del Mezquital se encuentra en las zonas árida y templada; por otra parte se ubica dentro de dos regiones fisiográficas de primera magnitud como la Sierra Madre Oriental y la del Eje Neovolcánico.

#### 1.4.3.3 Hidrología

El Valle del Mezquital pertenece a la gran cuenca del Pánuco y a la subcuenca del Río Tula, el cual confluye con el Río Salado. Otro río de importancia es el de Actopan.

#### 1.4.3.4 Climatología

Presenta temperaturas anuales, que fluctúan entre 16.3 y 18.4 °C. La precipitación es en general pobre, ya que varía entre 430 y 550 mm anuales. El período de estiaje comprende de diciembre a febrero y la estación lluviosa va de junio a septiembre con un período interestival en julio. El clima en todo el Valle del Mezquital presenta algunas fluctuaciones microclimáticas en cuanto a precipitación, período interestival, temperaturas medias y oscilación térmica; sin embargo, el tipo climático predominante de acuerdo al sistema Köppen modificado por García (1973) es BS, KW (w)(i)g; que corresponde a un clima seco, templado con estación lluviosa en el verano y sequía interestival con poca oscilación térmica.

#### 1.4.3.5 Vegetación

La zona presenta varios tipos de vegetación con una gran riqueza florística en cada uno de ellos. Sin embargo, cabe aclarar que a la fecha la vegetación ha sido muy perturbada, llegando a desaparecer algunos tipos o bien, restringiéndose a pequeños manchones. Según González-Quintero citado por Muñoz y López (1997) se presentan los siguientes tipos: a) Matorral desértico aluvial, b) Matorral crasicaule, c) Matorral de *Fouquieria*, d) Matorral desértico calcícola, e) Matorral de *Juniperus*, f) Matorral de Encinar y g) Vegetación de galería.

#### 1.4.3.6 Suelos

Las unidades taxonómicas detectadas y descritas según el sistema de clasificación de suelos de la FAO/UNESCO (1988) son: Feozems cálcicos, vérticos y háplicos, Fluvisoles cálcicos, Vertisoles háplicos, Regosoles calcáricos, Leptosoles líticos y mólicos y Leptosoles rendzínicos (Muñoz y López, 1997).

### 1.4.3.7 Agricultura

Los principales cultivos son alfalfa, maíz, trigo, avena, frijol, jitomates, chiles y betabel. Hay una pequeña, pero importante producción de cultivos restringidos en una sección menor del valle (Distrito de Riego 100), que incluye lechuga, col, cilantro, rábano, zanahoria, espinacas y perejil. Esta restricción de cultivos es parte de la regulación para el reuso de aguas residuales para la protección de la salud.

## 1.5 EL JITOMATE (*Lycopersicon esculentum*)

### 1.5.1 Anatomía

El jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill<sup>2</sup>) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas (Fig. 2).

#### 1.5.1.1 La planta

La estructura de la planta es la de un simpodio. Es perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual. La planta puede desarrollarse de forma rastroja, semierecta o erecta, y el crecimiento es limitado en las variedades determinadas e ilimitado en las variedades indeterminadas, pudiendo llegar, en éstas últimas, a 10 m en un año (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995). Aunque el jitomate es una planta herbácea en su etapa inicial de crecimiento, el tallo se lignifica parcialmente en etapas posteriores, pero la debilidad de su cuello exige el empleo de soportes o tutores (Infoagro, 2001).

#### 1.5.1.2 La raíz

El sistema radical del jitomate está constituido por la raíz principal (corta y débil), las raíces secundarias (numerosas y potentes) y las raíces adventicias. Seccionando transversalmente la raíz principal de afuera hacia dentro encontramos: la epidermis, la cual está especializada en la absorción de agua y nutrientes y que generalmente tiene pelos absorbentes, que son extensiones tubulares de células epidérmicas; el córtex y el cilindro central, donde se sitúa el xilema, el cual forma un sistema tetraarco con cuatro alas en cruz.

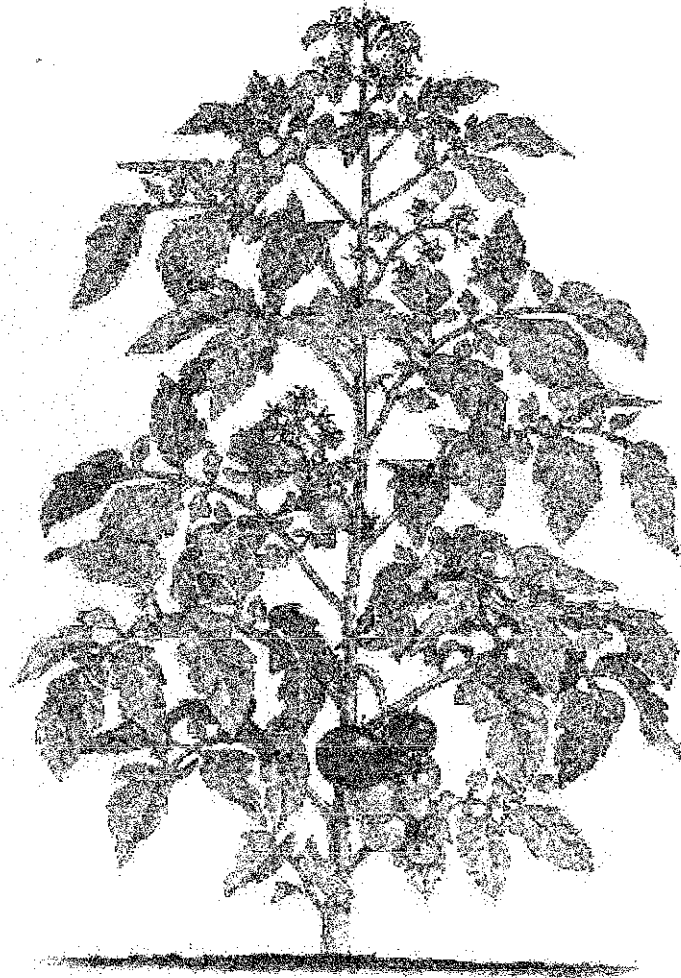
#### 1.5.1.3 Tallo principal

El tallo típico tiene de 2 a 4 cm de diámetro en la base y está cubierto por pelos glandulares y no glandulares que salen de la epidermis. Tiene forma de cúpula y está protegido por las hojas recién formadas.

---

<sup>2</sup> Miller en 1754 designó al jitomate dentro del género *Lycopersicon*

El tallo principal forma de 6 a 12 hojas, antes de que la yema principal se transforme en una inflorescencia. El crecimiento subsiguiente se produce a partir de la yema axilar de la última hoja, la cual desarrolla un tallo secundario que crece como una prolongación del tallo primario y desplaza lateralmente la inflorescencia. Los sucesivos segmentos del tallo se desarrollan de forma similar, produciendo una inflorescencia cada tres hojas.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Figura 2. Anatomía de la planta del jitomate (Tomada de Rick, M., 1978).*

#### 1.5.1.4 Las hojas

Las hojas del jitomate son compuesta e imparipinnadas. Una hoja típica de las plantas cultivadas tiene unos 0.5 m de largo, algo menos de anchura, con un gran foliolo terminal y hasta ocho foliolos laterales, que pueden, a su vez, ser compuestos. Los foliolos son usualmente peciolados y lobulados irregularmente con bordes dentados y se disponen de forma alternativa alrededor del tallo. El mesófilo o tejido parenquimático está recubierto por una epidermis superior e inferior (alto número de estomas), ambas sin cloroplastos (Infoagro, 2001).

### 1.5.1.5 La flor

La flor es perfecta, regular e hipógina y consta de 5 ó más sépalos y de 5 ó más pétalos de color amarillo dispuestos de forma helicoidal a intervalos de 135°, con un número igual de estambres que se alternan con los pétalos y forman un cono estaminal que envuelve al gineceo, y de un ovario bi o plurilocular (Chamarro, 1995). Las flores, en número variable, se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso (dicasio). La primera flor se forma en la yema apical y las demás se disponen lateralmente por debajo de la primera, alrededor del eje principal (Infoagro, 2001).

### 1.5.1.6 El fruto

El fruto es una baya bi o plurilocular que se desarrolla a partir de un ovario de unos 5-10 mg y alcanza un peso final en la madurez que oscila entre los 5 y 500 g, en función de la variedad y las condiciones de desarrollo (Chamarro, 1995). Está constituido por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas. El fruto puede recolectarse separándolo por la zona de abscisión del pedicelo (Infoagro, 2001).

## 1.5.2 Condiciones para el cultivo

### 1.5.2.1 Exigencias climáticas

El manejo racional de los factores climáticos de forma conjunta es fundamental para el funcionamiento adecuado del cultivo, ya que todos se encuentran estrechamente relacionados y la acción de uno de estos incide sobre el resto.

La temperatura óptima de desarrollo oscila entre 20 y 30 °C durante el día y entre 1 y 17 °C durante la noche; temperaturas superiores a los 30-35 °C afectan a la fructificación. Temperaturas inferiores a 12-15 °C también originan problemas en el desarrollo de la planta. La germinación de la semilla tiene lugar a valores óptimos de temperatura entre 18°C y 24°C. A temperaturas superiores a 25°C e inferiores a 12°C la fecundación es defectuosa o nula. La maduración del fruto es muy influida por la temperatura en lo referente a la precocidad como a la coloración, de tal forma que, valores cercanos a los 10°C así como superiores a los 30°C originan tonalidades amarillentas.

La humedad relativa óptima oscila entre un 60% y un 80%. Humedades relativas muy elevadas favorecen el desarrollo de enfermedades aéreas y el agrietamiento del fruto y dificulta la fecundación; esta última también favorecida con una humedad relativa baja.

La luminosidad reducida puede incidir de forma negativa sobre el proceso de la floración, fecundación así como el desarrollo vegetativo de la planta.

En los momentos críticos durante el período vegetativo resulta crucial la interacción existente entre la temperatura diurna y nocturna y la luminosidad.

El jitomate se desarrolla bien en un amplio rango de latitudes, y es moderadamente tolerante a la salinidad. Prefiere ambientes cálidos, con buena iluminación y drenaje (Castilla, 1995).

#### *1.5.2.2 Exigencias en suelo*

El jitomate no es muy exigente, puede crecer en cualquier tipo de suelos (preferentemente de pH entre 5 y 7), excepto en lo que se refiere al drenaje, aunque prefiere suelos sueltos de textura silíceo-arcillosa y ricos en materia orgánica. No obstante, se desarrolla perfectamente en suelos arcilloso arenosos (Infoagro, 2001). Dependiendo de las condiciones concretas de cada caso, la fertilización del jitomate varía notablemente. Es necesario el análisis previo del suelo (Castilla, 1995).

#### *1.5.3 Métodos para el cultivo*

##### *1.5.3.1 El cultivo en suelo*

El cultivo del jitomate se realiza a nivel de campo, en donde para el cultivo intensivo se emplea plantas procedentes de semillero, no siendo normal en la actualidad la siembra directa, que sólo se emplea en algunos casos en cultivo extensivo. Hoy en día, el alto costo de la semilla ha generalizado el uso de huecos prensados con turba, macetitas de papel o plástico rellenas de sustrato, bandejas de alvéolos o procedimientos similares para transplantar con cepellón. A los 30-35 días de la siembra, la planta con tres hojas verdaderas (unos 12 cm de altura) está en condiciones de transplante (Arizona's College of Agriculture, 2000; Castilla, 1995).

##### *1.5.3.2 El cultivo en hidroponía*

El cultivo del jitomate también se realiza en sistemas sin suelo (hidropónicos), estos tienen una gran sensibilidad ante cualquier modificación introducida, lo que permite una conducción fácil y rápida en respuesta, que se traduce en una optimización de resultados si el desarrollo es correcto. Los sustratos inertes son más fáciles de manejar que los que tienen algún tipo de actividad, dentro de los cuales se emplea la arena, la perlita, agrolita, tezontle, tierra volcánica, turba, corteza de pino y fibra de madera (Abad, 1995). Al diseñar la solución nutritiva, se debe cuidar el equilibrio y concentración de sales a fin de aportar elementos minerales necesarios en cantidades capaces de satisfacer la absorción óptima. (Arizona's College of Agriculture, 2000; Cánovas, 1995).

### 1.5.4 Plagas

#### 1.5.4.1 Ácaros

Se han censado como plagas del tomate tres especies de grupos taxonómicos y características bien diferenciadas, en las regiones templadas y cálidas. De ellas *Aculops lycopersici* es la más específica, *Polyphagotarsonemus latus* la menos frecuente —excepción hecha de ambientes tropicales y subtropicales— y *Tetranychus urticae* la más extendida, polífaga y con mayores repercusiones para el cultivo.

#### 1.5.4.2 Insectos

Con el nombre vulgar de “moscas blancas” se conocen a especies de la familia Aleyrodidae cuyos adultos tienen el cuerpo recubierto de una fina capa de polvillo blanco de aspecto harinoso. Dos especies tienen particular significado en el cultivo del tomate: *Trialeurodes vaporariorum* (la mosca blanca de los invernaderos) y *Bemisia tabaci* (la mosca blanca del tabaco).

#### 1.5.4.3 Pulgones

Un amplio número de especies de orden Homóptera, pertenecientes a la familia Aphidae, se asocian con mayor o menor grado de intimidad e incidencia, al cultivo del jitomate: el pulgón verde del melocotonero (*Myzus persicae*), el pulgón del algodónero (*Aphis gossypii*), el pulgón de las habas (*Aphis fabae*) y el pulgón de los invernaderos o pulgón verde de la papa (*Macrosiphum euphorbiae*).

### 1.5.5 Importancia económica

El jitomate es una de las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial alcanzando el segundo lugar, únicamente rebasado por el cultivo de papa (Tabla 1). En los últimos cuatro años la producción mundial prácticamente se ha mantenido estable, con un nivel promedio anual de más de 90 millones de toneladas.

De acuerdo a estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), los seis principales países productores de jitomate obtienen aproximadamente 57% de la producción anual. A nivel mundial, México destaca por ser uno de los primeros exportadores de esta hortaliza, cuyo destino principal son los Estados Unidos. En 1999, de acuerdo con los datos del Foreign Agricultural Service del USDA, Estados Unidos importó 615 mil toneladas de jitomate fresco de origen mexicano, lo que representó el 83% del volumen total que importó de esta hortaliza en ese año. Cabe destacar que de enero a septiembre del 2000, Estados Unidos había importado 457 mil toneladas de jitomate fresco mexicano.

**Tabla 1. Principales países productores de jitomate 1994-2000\* (millones de toneladas)**

PAÍSES	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
China	12.03	13.17	15.54	16.37	17.10	17.90	18.35
E.U.A.	12.13	11.72	11.70	11.70	10.01	13.25	13.25
Italia	5.13	5.17	6.53	5.26	6.60	7.09	7.09
Turquía	6.35	7.25	7.30	7.30	5.85	6.60	6.60
Egipto	5.01	5.03	5.04	5.04	5.75	5.90	5.95
India	4.80	5.00	5.00	5.00	5.45	5.45	5.45
<b>Subtotal</b>	<b>45.45</b>	<b>47.34</b>	<b>51.11</b>	<b>50.67</b>	<b>50.76</b>	<b>56.19</b>	<b>56.69</b>
<b>Otros</b>	<b>35.81</b>	<b>37.60</b>	<b>37.62</b>	<b>37.75</b>	<b>41.36</b>	<b>43.03</b>	<b>42.44</b>
<b>Total Mundial</b>	<b>81.26</b>	<b>84.94</b>	<b>88.73</b>	<b>88.42</b>	<b>92.12</b>	<b>99.22</b>	<b>99.13</b>

\*Elaborado por el Centro de Estadística Agropecuaria (CEA), SAGARPA, con datos de la FAO.

### 1.5.5.1. Producción nacional.

El jitomate es una de las principales hortalizas que se producen en México (Tabla 2). Durante el año agrícola 2001 (30 de noviembre del 2001), se cosechó el 84% de lo esperado de una superficie de 76,224 has sembradas a nivel nacional en donde se levantó una producción de 1,789,402 toneladas, con un rendimiento promedio nacional obtenido de 28,591 toneladas por hectárea, en cultivos de riego como de temporal (Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2001).

**Tabla 2. Producción de jitomate (Toneladas), de 1995 a Primavera-Verano 2001**

ESTADOS	1995	1996	1997	1998	1999	2000 <sup>1</sup>	2001 <sup>2</sup>
Sinaloa	845,406	800,125	666,911	896,288	801,600	830,037	20,633
Baja California	289,695	318,335	468,270	480,383	459,603	202,612	60,492
Michoacán	93,712	116,873	114,816	173,455	274,958	241,850	59,269
San Luis Potosí	121,950	154,306	109,555	139,316	179,320	176,315	121,645
Jalisco	50,147	59,154	60,571	82,720	134,222	102,852	15,062
Nayarit	90,559	95,154	37,655	56,464	78,589	75,621	77
<b>Subtotal</b>	<b>1,491,469</b>	<b>1,544,181</b>	<b>1,457,778</b>	<b>1,828,626</b>	<b>1,928,292</b>	<b>1,629,287</b>	<b>277,178</b>
<b>Otros</b>	<b>454,573</b>	<b>471,071</b>	<b>478,092</b>	<b>446,542</b>	<b>500,821</b>	<b>541,054</b>	<b>183,010</b>
<b>Total</b>	<b>1,946,042</b>	<b>2,015,252</b>	<b>1,935,870</b>	<b>2,275,168</b>	<b>2,429,113</b>	<b>2,170,341</b>	<b>460,188</b>

<sup>1</sup>Elaborado por el Centro de Estadística Agropecuaria (CEA), SAGARPA, con datos de la FAO. <sup>2</sup>Elaborado por el Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las delegaciones de la SAGARPA en los estados. (SIACAPW).

A nivel de año agrícola el estado de Sinaloa, que contribuye con el 38%, continúa manteniéndose como el principal productor a nivel nacional de jitomate (pese a los reportes de la cosecha primavera-verano del 2001), le sigue Michoacán con 11.3%, Baja California 9.4%, entre otros.



Las épocas altas de cosecha de jitomate del otoño-invierno ocurren de febrero a abril, mientras que la recolección de Primavera-Verano se realiza principalmente en los meses de septiembre a diciembre.

Los principales estados productores que aportan alrededor del 61.7% de la producción de jitomate a nivel nacional son: Michoacán 20.4%, Baja California 17%, San Luis Potosí 15.1% y Jalisco 9.2%.

## **JUSTIFICACIÓN**

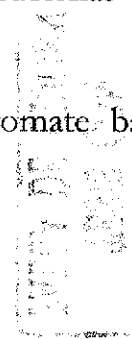
Considerando la importancia de las rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal, la posibilidad de que aquellas que se encuentran en sitios contaminados sean más resistentes y por tanto tengan mayor posibilidad de sobrevivir en diferentes tipos de suelo al ser introducidas como biofertilizantes, así como la importancia económica del jitomate, se plantearon los siguientes objetivos:

## OBJETIVO GENERAL

Seleccionar e identificar rizobacterias aisladas de cultivos regados con aguas residuales, con capacidad para producir fitohormonas y que promuevan el desarrollo del jitomate (*Lycopersicon esculentum*).

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar cuantitativamente la población de cuatro grupos de rizobacterias (*Pseudomonas*, *Azospirillum*, fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadoras de fósforo) presentes en la rizosfera de dos leguminosas y dos gramíneas.
- Aislar rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal procedentes de cultivos diferentes al jitomate, regados con aguas residuales, así como rizobacterias de jitomate regado con aguas blancas.
- Comparar el efecto de las cepas aisladas sobre el desarrollo del jitomate bajo condiciones controladas.
- Seleccionar rizobacterias promotoras del desarrollo del jitomate.
- Seleccionar rizobacterias productoras de auxinas.
- Evaluar el potencial biofertilizante en suelo de las rizobacterias seleccionadas.
- Identificar las rizobacterias seleccionadas.



## 2. MATERIALES Y METODOS

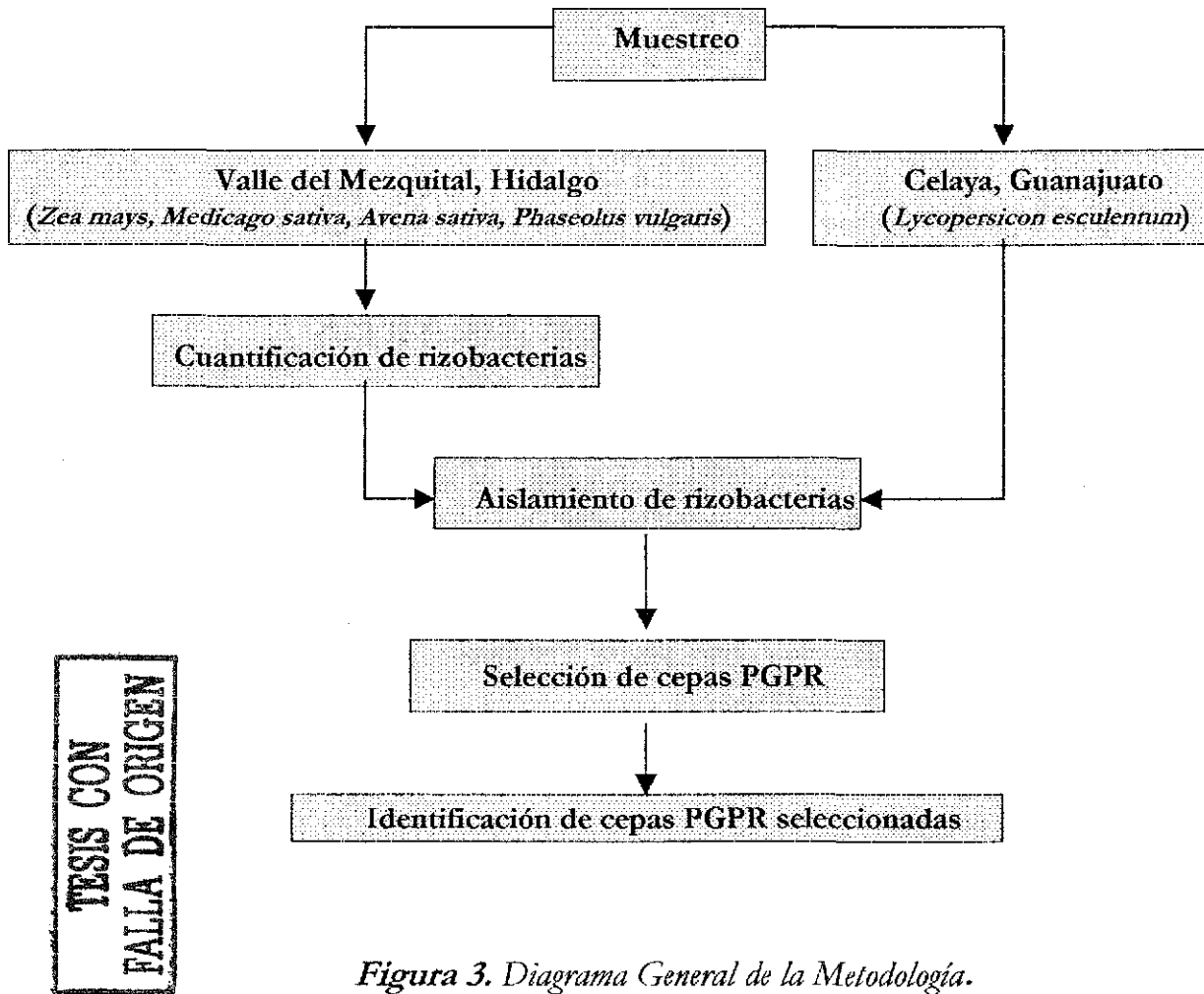


Figura 3. Diagrama General de la Metodología.

### 2.1 MUESTREO

El muestreo se realizó en dos localidades: a) en cultivos del Valle del Mezquital, Hgo., y b) en zonas de cultivo de jitomate en Celaya, Gto.

### 2.1.1 Muestreo en el Valle del Mezquital, Hidalgo

Los sitios de muestreo se localizaron en el Distrito de Desarrollo Rural 063, ubicado en el Valle del Mezquital (Fig. 4); en el cual se seleccionaron 11 sitios sometidos a riego con aguas residuales, por diferentes períodos de tiempo (Tabla 3) y 3 sitios control, regados con aguas blancas.

**Tabla 3.** Sitios de muestreo en suelos del Distrito de Desarrollo Rural 063, en el Valle del Mezquital, Hidalgo.

No. EN MAPA	SITIO DE MUESTREO	TIEMPO DE RIEGO CON AGUAS RESIDUALES (AÑOS)	CULTIVO(S)	FECHA DE MUESTREO
1	Quemthá *	90	<i>Medicago sativa</i> , <i>Zea mays</i> y <i>Phaseolus vulgaris</i>	23-agosto-1997
2	Caxuxi	90	<i>Medicago sativa</i>	13-febrero-1998
3	San Salvador	90	<i>Medicago sativa</i>	16-octubre-1998
4	Boxthá	80	<i>Medicago sativa</i>	13-febrero-1998
5	Motovatha	70	<i>Zea mays</i>	29-mayo-1998
6	El Bondhó	50	<i>Zea mays</i> y <i>Phaseolus vulgaris</i>	16-octubre-1998
7	Demacú	25	<i>Medicago sativa</i> y <i>Zea mays</i>	29-mayo-1998
8	Tepatepec *	7	<i>Medicago sativa</i> y <i>Phaseolus vulgaris</i>	23-agosto-1997
9	Denganzhá *	7	<i>Zea mays</i>	23-agosto-1997
10	Tetepango	6	<i>Avena sativa</i>	13-febrero-1998
11	La Tumba	2	<i>Avena sativa</i>	13-febrero-1998
12	Denganzhá *	0	<i>Zea mays</i>	23-agosto-1997
13	Patria Nueva	0	<i>Medicago sativa</i>	13-febrero-1998
14	Bahía de Cortéz	0	<i>Medicago sativa</i>	29-mayo-1998

\*Sitios que sólo se consideraron en el aislamiento de rizobacterias.

#### 2.1.1.1 Toma de muestras de plantas y suelo.

En cada sitio se recolectaron diez plantas con raíces de los cultivos existentes (*Zea mays*, *Avena sativa*, *Medicago sativa* y *Phaseolus vulgaris*). Para tomar las muestras se usaron bloques de suelo de 25 cm<sup>3</sup>. Las plantas junto con las respectivas muestras de suelo, se colocaron en bolsas de plástico y se conservaron en refrigeración (5-10°C) hasta su procesamiento en el laboratorio.

#### 2.1.1.2 Análisis físicos y químicos de suelos en la zona de estudio.

Las muestras fueron secadas al aire y tamizadas con luz de malla de 2 mm. Posteriormente se realizaron los análisis físicos y químicos expresados en la Tabla 4.

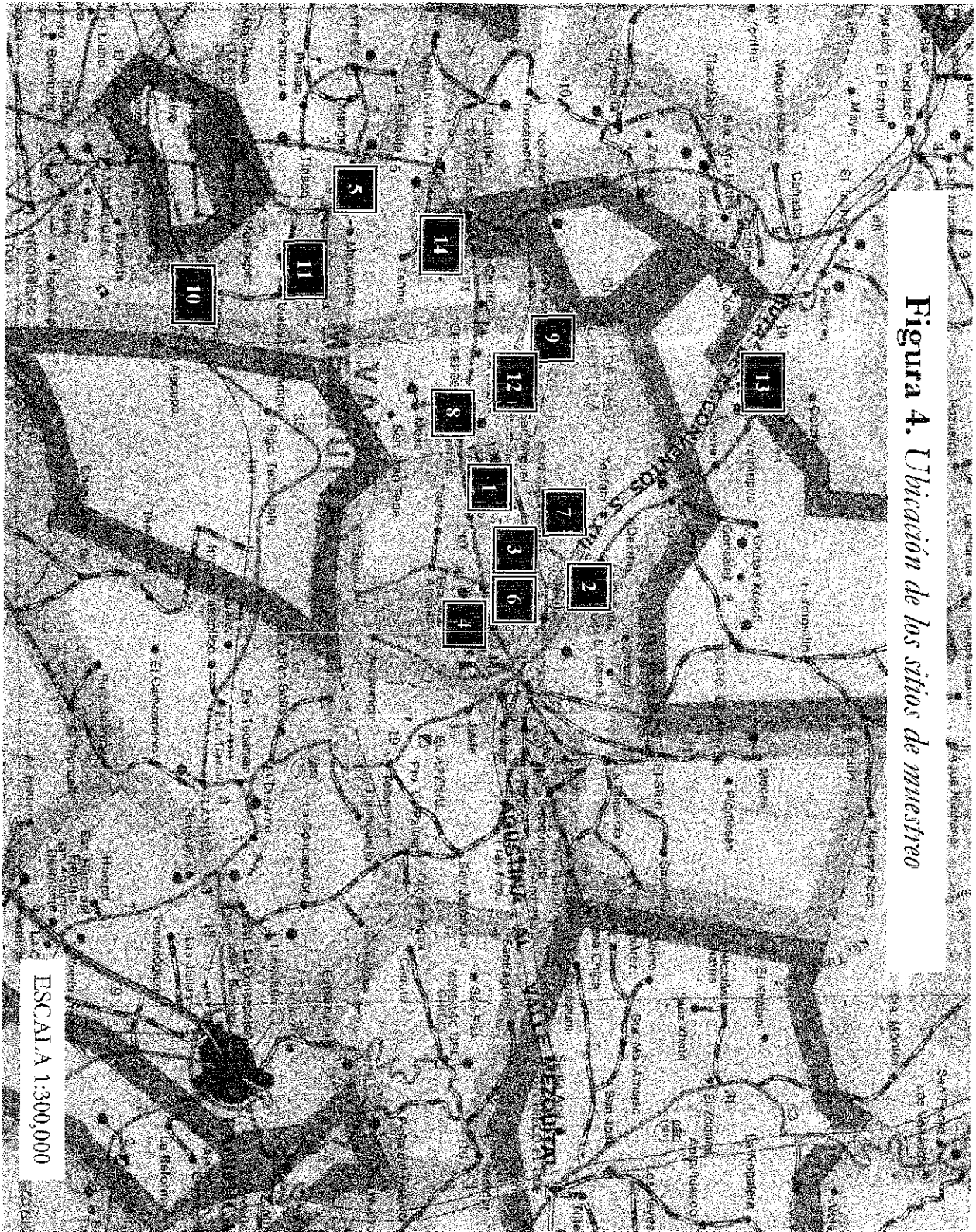


Figura 4. Ubicación de los sitios de muestreo

**Tabla 4.** Análisis físicos y químicos del suelo.

ANÁLISIS*	MÉTODO	REFERENCIA
Reacción al HCl (10%)		
Textura	Bouyoucos	Gavande, 1979
Densidad aparente (D.A.)	probeta	Gaucher, 1971
pH (suelo:agua, 1:2.5)	potenciométrico	Jackson, 1976
Materia orgánica (M.O.)	Walkley and Black	Ruíz y Ortega, 1979

\*Anexo 1

### 2.1.2 Muestreo en Celaya, Guanajuato

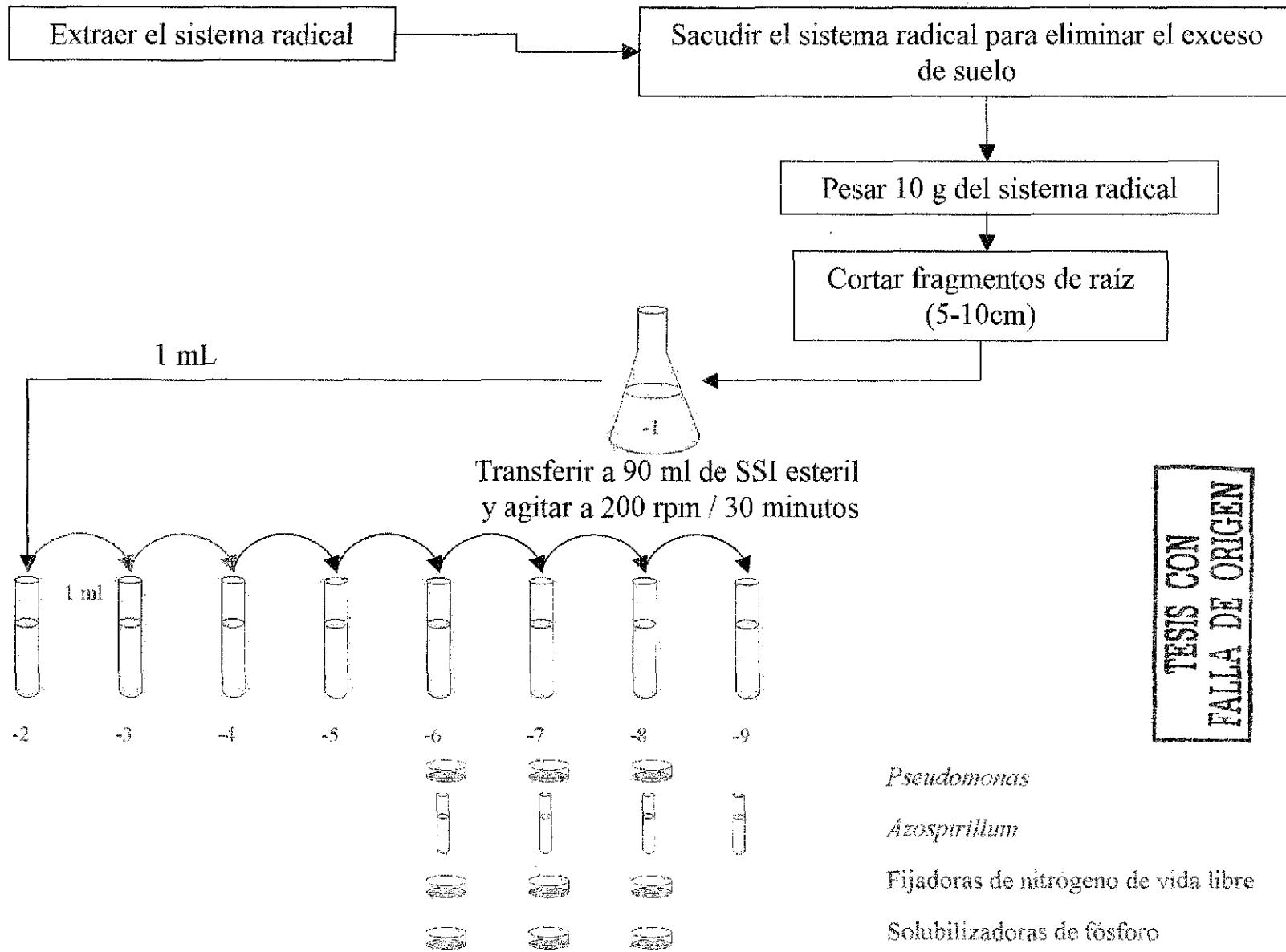
Considerando que en este estudio se empleó al jitomate (*Lycopersicon esculentum*) como hospedero, se decidió llevar a cabo un muestreo (ver sección 2.1.1.1) de plantas de jitomate desarrollado en suelos de Celaya, Guanajuato; posteriormente se realizó el aislamiento de rizobacterias de estas plantas.

### 2.2 CUANTIFICACIÓN DE CUATRO GRUPOS DE RIZOBACTERIAS: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, fijadoras de nitrógeno de vida libre y fosfobacterias solubilizadoras

La cuantificación se llevó a cabo en 8 sitios regados con aguas residuales y 2 sitios control, regados con aguas blancas; ésta se realizó individualmente en cada planta. Para ello, las raíces se separaron del suelo, el exceso de éste se eliminó por sacudimiento, posteriormente y bajo condiciones de asepsia, se efectuó el procedimiento indicado en la Figura 5. Para determinar el número de microorganismos viables/g de raíz, se utilizó el método de dilución y siembra en tubo o en placa vertida. En los primeros se determinó el número más probable (NMP) de *Azospirillum*, y en placas las unidades formadoras de colonias (UFC) (Fig. 5). En los tubos se empleó el medio de cultivo Nfb semisólido (Tarrand *et al.*, 1978) y en las placas se utilizaron cuatro tipos de medios de cultivo selectivos. En la Tabla 5 se muestra los medios de cultivo y condiciones de incubación empleados. De cada dilución, la inoculación se hizo en placa por duplicado y en tubo por triplicado.

En el caso de tubos se consideraron como positivos a aquellos que presentaron las características típicas de *Azospirillum*: alcalinización del medio y formación de una película blanca de 2-3 mm por debajo de la superficie del medio (Tarrand *et al.*, 1978). En el caso de las placas con Waksman 77 se consideraron todas las UFC desarrolladas. En tanto que, en los otros medios de cultivo, sólo se registraron como UFC a aquellas que presentaron la producción típica de piocianina o fluoresceína (*Pseudomonas*) o las que mostraron el halo de solubilización o mineralización de fósforo (fosfobacterias).

Figura 5. Cuantificación de rizobacterias



**Tabla 5.** Condiciones de inoculación e incubación en la cuantificación de rizobacterias.

RIZOBACTERIA	MEDIO DE CULTIVO*	CONDICIONES DE INCUBACIÓN
<i>Pseudomonas</i>	King A y King B	28°C, de 2 a 7 días
<i>Azospirillum</i>	Nfb (semisólido)	34°C de 1 a 3 días
Bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre	Waksman 77	28°C, de 7 a 10 días
Solubilizadoras de fósforo	Ramos-Callao	28°C, de 2 a 7 días

\*Anexo 2.

### 2.3 AISLAMIENTO DE RIZOBACTERIAS: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadoras de fósforo

Del desarrollo obtenido a partir de la rizosfera de cada cultivo en estudio se tomaron 5 tubos positivos y 5 placas de cada uno de los medios selectivos (Tabla 5). El crecimiento bacteriano obtenido en tubos fue transferido a placas, lo que permitió la separación de colonias. Posteriormente de cada placa se seleccionaron numerosas colonias y se procedió a su aislamiento. En la selección de colonias se consideró su forma, elevación, textura, opacidad y, en algunos casos, la producción de pigmentos (Smibert y Krieg, 1981), y además que representaran los tipos más abundantes.

#### 2.3.1 Purificación de cultivos bacterianos

Se realizó por la técnica de vertido y estriado en placa (*Pseudomonas*, *Azospirillum*, fijadoras de nitrógeno de vida libre y fosfobacterias). En la Tabla 6 se muestran los medios de cultivo y tiempos de incubación empleados para cada rizobacteria. Se tomó una colonia de las UFC presentes en placas con los medios de cultivo selectivos, la cual fue suspendida en un tubo de ensaye con 1mL de SSI estéril; posteriormente se estriaron en placas con los medios de cultivo indicados, el procedimiento se repitió tres veces. En cada ocasión se realizaron observaciones microscópicas y observaciones de características culturales, lo que permitió verificar su pureza (Stucki *et al.*, 1984).

**Tabla 6.** Condiciones de incubación para la purificación de cultivos.

RIZOBACTERIA	MEDIO DE CULTIVO*	CONDICIONES DE INCUBACIÓN
<i>Pseudomonas</i>	Agar Cetrimida	28°C, de 2 a 7 días
<i>Azospirillum</i>	Gelosa Nutritiva	34°C de 1 a 3 días
Bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre	Sacarosa Agar con nitrógeno (Lipman)	28°C, de 7 a 10 días
Fosfobacterias solubilizadoras	Gelosa Nutritiva	28°C, de 2 a 7 días

\*Anexo 2.



### 2.3.2 Conservación de cepas

Una vez confirmada la pureza se verificó la actividad de cada cepa empleando los medios selectivos, así como las condiciones de incubación indicados en la Tabla 5. Posteriormente se conservaron en tubos con medio de cultivo inclinado, empleando para ello Gelosa Nutritiva para *Pseudomonas*, solubilizadoras de fósforo y *Azospirillum*, para este último; también se empleó el medio de cultivo Nfb semisólido; medio Lipman sin nitrógeno para fijadoras de nitrógeno de vida libre. Se sembraron por triplicado y se conservaron en refrigeración (4-10°C).

### 2.4 SELECCIÓN DE CEPAS PGPR DEL JITOMATE BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

La selección se hizo con base en los siguientes criterios (Fig. 6):

- **Capacidad para promover el desarrollo del jitomate a 35 y 70 días de desarrollo.** Este involucró dos etapas: a) la estandarización de la metodología para la producción de inoculantes y b) la determinación del efecto de PGPR sobre el crecimiento de jitomate.
- **Capacidad para producir auxinas.** Para ello se emplearon dos métodos: a) Método de Bric, *et al.* (1991), conocido como Técnica de Ensayo rápido *in situ* sobre una Membrana de Nitrocelulosa, y b) Método de Gordon y Weber (1951), mediante la reacción de Salkowski.

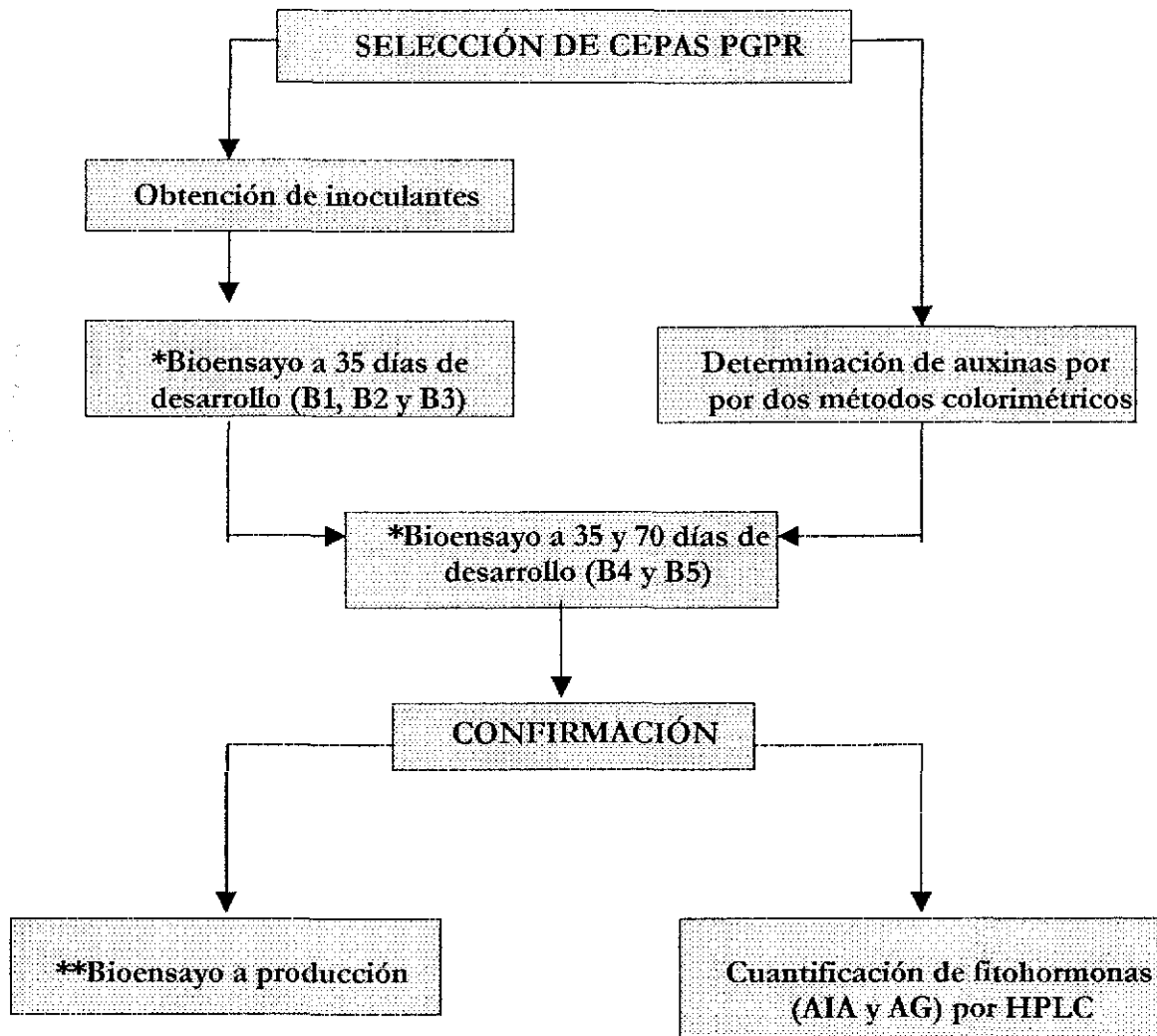
#### 2.4.1 Capacidad para promover el desarrollo del jitomate

##### 2.4.1.1 Estandarización de la metodología para la obtención de inoculantes

La literatura indica que para probar el efecto de PGPR se utilizan cultivos que se encuentren en la fase logarítmica de crecimiento por lo que se procedió a establecer dicha fase en cada una de las cepas a probar, así como su tiempo de generación.

Cinética de desarrollo en tres grupos de rizobacterias: *Azospirillum*, fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadoras de fósforo. De los cultivos activos de cada cepa, se transfirió una asada a medios de cultivo líquidos (100 mL), estos se incubaron en agitación a 200 rpm por 48 h, después en cada cultivo se ajustó la población a 10 Unidades Klett (UK), mediante la adición de medio de cultivo estéril, en un nefelómetro Klett-Summerson con filtro verde. Posteriormente a partir de esta suspensión se inoculó un matraz nefelométrico (100 mL de medio) con 1 mL del cultivo y se tomó como tiempo cero. La temperatura de incubación fue de 28°C, para fijadoras de nitrógeno de vida libre y fosfobacterias, y de 34°C para *Azospirillum*.

Para las solubilizadoras de fósforo, se empleó el medio antes indicado, en tanto que para fijadoras de nitrógeno y *Azospirillum* se utilizó el medio Lipman y Malato sales líquido más biotina (como factor de crecimiento), respectivamente (Anexo 2). Posteriormente se realizaron lecturas en UK hasta observar la fase estacionaria en desarrollo de cada cepa.



\*Bioensayos (B) en sistema hidropónico \*\*Bioensayo en suelo  
AIA=ácido indol-3-acético, AG=ácido giberélico

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Diagrama de la selección de cepas PGPR de jitomate.

Tiempo de generación. Esta se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} (N_i) (2^z) &= N_f & \text{donde;} & N_i = \text{número inicial de células} \\ \log N_f &= \log N_i + z (\log 2) & & 2 = \text{duplicación en cada generación} \\ \log N_i &= \log N_f - z (\log 2) & & z = \text{número de generaciones} \\ z &= \log N_f - \log N_i / \log 2 & & N_f = \text{número final de células} \end{aligned}$$

Inoculantes. Los inóculos se obtuvieron según los resultados en la cinética de crecimiento. En la fase logarítmica, de cada cultivo, se determinó la absorbancia, en unidades Klett y se procedió a usarlo como inóculo.

Control de calidad de los inóculos y de la técnica de inoculación. Para determinar las UFC por mililitro de inóculo y por semilla inoculada, se aplicó el método de dilución y vertido en placa, empleando como medios de cultivo: Gelosa Nutritiva (*Pseudomonas*, *Azospirillum*), Lipman (fijadoras de nitrógeno de vida libre) y Ramos Callao (solubilizadoras de fósforo). Para determinar las UFC/semilla se tomaron 10 semillas de cada inóculo.

#### ***2.4.2 Determinación del efecto de PGPR sobre el crecimiento de jitomate***

Se hizo a través de 6 bioensayos. La selección comprendió 3 bioensayos que se realizaron por el método de bolsa; la evaluación se realizó a los 35 días. La confirmación del efecto de las cepas seleccionadas incluyó dos bioensayos, uno de 35 días (B4) y otro con duración de 70 días para evaluar si los cambios observados a nivel de plántula permanecen o se desvanecen en etapas de maduración del cultivo, así como su posible efecto en la producción (B5). Con base en los resultados de B4 y B5 se seleccionaron tres cepas que fueron probadas en un sexto bioensayo (B6), en el que se confirmó el efecto de las cepas en presencia de suelo, experimento que se condujo hasta producción. En la Tabla 7 se indican las variables que se evaluaron en los diferentes bioensayos.

##### ***2.4.2.1 Inoculación de semillas***

Se utilizó semilla certificada de jitomate de crecimiento indeterminado, tipo saladette, variedad Lucas. Las semillas se lavaron 15 veces con agua estéril para eliminar el fungicida y se sumergieron en 10 mL de la suspensión bacteriana correspondiente o en medio de cultivo estéril (testigos), en donde permanecieron por una hora a temperatura ambiente.

Tabla 7. Variables evaluadas en los bioensayos.

VARIABLES <sup>1</sup> DÍAS DE DESARROLLO	7	35	42	49	56	63	70	70	98	120	127	134	141	148	155	162	169	176	183	
Porcentaje de germinación	●																			
Altura		●	●	●	●	●	●	●	●											
Número de hojas		●	●	●	●	●	●	●	●											
Diámetro de tallo		●	●	●	●	●	●	●	●											
Infección de raíces		●					●	●												
Peso fresco de parte aérea		●					●													
Peso seco de parte aérea*		●					●													
Número de raíces adventicias*		●																		
Longitud de raíz*		●					●													
Peso fresco de raíz		●					●													
Peso seco de raíz*							●													
Aparición de racimos florales							●													
Porcentaje de racimos florales								●												
Número de flores									●	●		●								
Número de frutos										●										
Corte de frutos (cosecha)															●	●	●	●	●	●

● Bioensayo 1, 2, 3, 4, 5 y 6 ● Bioensayo 1, 2, 3 y 4 ● Bioensayo 5 ● Bioensayo 6

\*Las determinaciones son las consideradas por Fulchieri *et al.*, 1993.

<sup>1</sup> La altura se determinó considerando desde la base de la planta hasta la zona de reproducción (apical). El peso seco de la parte aérea y de la raíz se determinó colocando el material en bolsas de papel estraza y se llevó a peso constante a 70°C. El corte de frutos se realizó una vez que estos se encontraban rojos y turgentes, girándolos desde la base del pedúnculo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**2.4.2.2 Determinación del efecto de la inoculación sobre la germinación de las semillas**

En condiciones de asepsia se tomaron 10 semillas de cada tratamiento y se colocaron en cajas de Petri estériles que contenían papel filtro húmedo; éstas se incubaron a 28°C en oscuridad por un período de 6-7 días.

**2.4.2.3 Riego**

En todos los bioensayos hidropónicos, después de la siembra, la humedad se mantuvo con agua corriente estéril durante los primeros 7 días.

Posterior a la germinación y después de 10 días, se empleó la solución nutritiva recomendada por González (1994) (Anexo 2) a 50% de concentración, y después de los 15 días de desarrollo se empleó a concentración completa.

El riego se realizó cada tres o cuatro días (según las exigencias del cultivo). Para evitar la concentración de sales en las unidades experimentales cada 15 días se procedió a regar con agua corriente estéril.

**2.4.2.4 Comprobación de infección de cepas PGPR en raíces**

A 35 días de desarrollo, bajo condiciones de asepsia, se extrajo el sistema de la raíz y se maceró en tubos con SSI estéril. A 70 días de desarrollo, bajo condiciones de asepsia, se eliminó el exceso de agrolita del sistema radical y se tomó 1g, el cual se maceró en tubos con SSI estéril. Posteriormente se tomó una asada y se estiraron en placa (*Pseudomonas*, fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo) o se sembró en tubos para el caso de cepas de *Azospirillum*, con los medios selectivos y condiciones de incubación especificados en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Condiciones de inoculación e incubación en la comprobación de infección de cepas PGPR en raíces de jitomate.

RIZOBACTERIA	MEDIO DE CULTIVO*	CONDICIONES DE INCUBACIÓN
<i>Pseudomonas</i>	Agar Cctrimida	28°C, de 2 a 7 días
<i>Azospirillum</i>	Nfb (semisólido)	34°C de 1 a 3 días
Bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre	Lipman	28°C, de 7 a 10 días
Solubilizadoras de fósforo	Ramos-Callao con glucosa y fósforo inorgánico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10% y CaCl <sub>2</sub> 10%)	28°C, de 2 a 7 días

\*Anexo 2

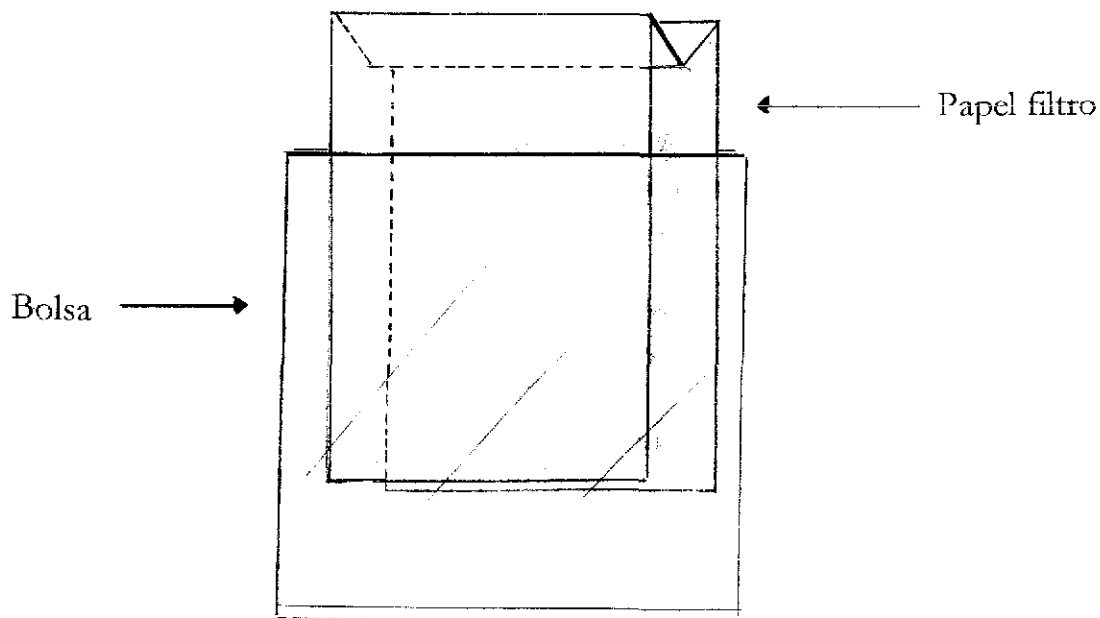
## 2.4.2.5 Bioensayos 1, 2 y 3

En estos se evaluó un total de 49 cepas, en ellos se comparó el efecto de 27 rizobacterias aisladas de diferentes cultivos desarrollados en suelos regados con aguas residuales, con el de 11 rizobacterias aisladas de la rizosfera de *Lycopersicon esculentum*, así como con 11 cepas de referencia. La clave y procedencia de estas últimas se describen en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Cepas de colección de referencia empleadas en la selección de cepas PGPR.

RIZOBACTERIA	CEPAS	PROCEDENCIA
<i>Azospirillum brasilense</i>	Cd y Sp7	ATCC 29710 y 29145
<i>Azospirillum brasilense</i>	VS9, VS7, C4 y Pox	Laboratorio de Microbiología Experimental (Facultad de Química, UNAM)
<i>Azospirillum lipoferum</i>	VS1	Laboratorio de Microbiología Experimental (Facultad de Química, UNAM)
Bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (no identificadas)	T2P10Az, S5BE, R2P2B y R1B	Colegio de Postgraduados (Montecillos, México)

**Condiciones de cultivo.** Se utilizaron bolsas de polietileno negras (20x15cm); cada bolsa contenía una hoja de papel filtro estéril, doblada por el centro formando un canal, en donde se le hicieron dos pequeñas perforaciones; se humedeció con agua estéril, y bajo condiciones de asepsia se colocaron dos semillas (Fig. 7). Las bolsas se colocaron en soportes y se colocaron en el invernadero a 30/18°C (día/noche) y 70 % de humedad relativa.



**Figura 7.** Método de la bolsa.

### 2.4.2.6 Bioensayos 4 y 5

En esta fase se probaron 28 cepas que fueron seleccionadas por su capacidad para promover el desarrollo vegetal en los bioensayos 1, 2 y 3, así como su capacidad para producir auxinas. Los bioensayos 4 y 5 se instalaron simultáneamente. En estos casos la población microbiana de los inóculos se estandarizó a una absorbancia (560 nm) de 0.017 a 0.019 para *Pseudomonas*; 0.026 a 0.029 para fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo, y de 0.007 a 0.009 para *Azospirillum*; para ello se utilizó un espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec 3000.

Condiciones del cultivo. En el bioensayo 4 se llevó a cabo la confirmación del comportamiento de las cepas seleccionadas en la primera selección por lo que se realizó bajo las mismas condiciones de cultivo y a 35 días de desarrollo. Para tener más información respecto al efecto de las cepas seleccionadas como PGPR sobre el desarrollo de plantas de jitomate, en el bioensayo 5 se realizó el seguimiento de tres variables (altura, número de hojas y diámetro de tallo) a diferentes tiempos, hasta los 70 días de desarrollo. Para ello se utilizaron macetas de 12 L de capacidad con agrolita inerte como soporte, la cual se humedeció con agua estéril, y bajo condiciones de asepsia, se colocaron dos semillas por maceta a una profundidad de 1.5 cm aproximadamente. Las macetas se cubrieron con papel kraf y se colocaron en el invernadero a 30/18°C (día/noche) y 70 % de humedad relativa.

### 2.4.2.7 Bioensayo 6

Se emplearon tres cepas que presentaron diferencias estadísticamente significativas en el mayor número de variables del bioensayo 5.

Suelo. El suelo fue colectado en Alfajayucan, Hidalgo. Para realizar los análisis físicos y químicos del suelo, expuestos en la Tabla 10, se tomó una muestra y se secó al aire bajo la sombra. Posteriormente se tamizó por una malla de 2 mm.

Fertilización. La dosis empleada se calculó por el método de Morgan (SARH, 1977) en función de los análisis físicos y químicos del suelo.

Tratamientos. Cepa 1 + Fertilización Media, Cepa 2 + Fertilización Media, Cepa 3 + Fertilización Media, Testigo con Fertilización Media (TFM) y Testigo con Fertilización Completa (TFC).

Tabla 10. Análisis físicos y químicos del suelo colectado de Alfajayucan, Hidalgo.

ANÁLISIS*	MÉTODO	REFERENCIA
Reacción al HCl (10%)		
Color	Tablas de Munsell	
Textura	Bouyoucos	Gavande, 1979
Densidad aparente (D.A.)	probeta	Gaucher, 1971
Densidad real(D.R.)	picnómetro	Gaucher, 1971
Porosidad (P)	Relación de densidades	Gaucher, 1971
pH (suelo:agua, 1:2.5)	potenciométrico	Jackson, 1976
pH (suelo:CaCl <sub>2</sub> 0.05M, 1:2)	potenciométrico	Jackson, 1976
Materia orgánica (M.O.)	Walkley and Black	Ruíz y Ortega, 1979
Nitrógeno total (NT)	macro-Kjeldhal	Ruíz y Ortega, 1979
Fósforo total (P1)	vanadato de Amonio	Cajuste, 1986
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>++</sup> , Mg <sup>++</sup>	flamometría	Domínguez y Aguilera, 1984

\*Anexo 1.

Condiciones del cultivo. El método de siembra utilizado fue por almácigo, para el cual se utilizaron 5 charolas de germinación de plástico negro, con 15 huecos cada una. Se desinfectaron con alcohol al 70% y como soporte se empleó turba inerte (turba rubia de *Sphagnum*, PRO-MOSS "TBK").

Siembra. Se colocó una semilla a 1cm de profundidad, por cada hueco en las charolas de germinación, con la turba humedecida previamente con agua filtrada. Posteriormente se colocaron en el invernadero a 30/18°C (día/noche) y 70 % de humedad relativa.

Transplante. El transplante se llevó a cabo a los 35 días de desarrollo, cuando las plántulas presentaron una altura de 10 a 15 cm; y se colocaron en macetas de 8 L de capacidad con suelo no estéril.

Riego. Durante el almácigo, las charolas se colocaron en palanganas para realizar así el riego por la parte inferior, el cual se llevó a cabo con agua estéril. Posterior al transplante el riego se realizó con agua de la llave.

#### 2.4.2.8 Diseño experimental

En todos los casos se empleó un diseño unifactorial completamente aleatorizado con un  $\alpha=0.05$ . En las variables donde se encontraron diferencias significativas se empleó la prueba de comparación múltiple de Tukey. El análisis estadístico se efectuó con el paquete estadístico SPSS V.9.



### **2.4.3 Capacidad de rizobacterias para producir auxinas**

#### **2.4.3.1 Técnica del Ensayo Rápido *in situ* sobre una Membrana de Nitrocelulosa (Bric *et al.*, 1991)**

La siguiente técnica fue modificada por Tsuzuki y Luna, quienes sustituyeron el medio de cultivo de Agar Luria Bertani por medios de cultivo específicos para cada grupo de rizobacterias, e inocularon directamente sobre una membrana Millipore; a cada medio se le agregó triptofano (0.01g/100ml). La incubación se hizo hasta obtener el desarrollo de colonias de 0.5 a 2.0 mm de diámetro. De cada placa se removió la membrana y se colocó en cajas de Petri que contenían papel filtro humedecido con 2.5 ml del reactivo de Salkowski modificado por Bric *et al.* (Anexo 2) durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Las rizobacterias productoras de sustancias parecidas al ácido indol-3-acético (AIA) se identificaron por la formación de un halo rojo alrededor de la colonia.

#### **2.4.3.2 Reacción de Salkowski (Gordon y Weber, 1951)**

Se obtuvieron los inóculos según se muestran en la Tabla 5. Posteriormente se centrifugaron 5 mL del cultivo. A un mL del sobrenadante se le agregaron 4 mL del reactivo de Salkowski (Anexo 2). Después de 30 minutos se desarrolló un color rosado el cual se midió en el espectrofotómetro, a una absorbancia de 530 nm (Sarwan y Kremer, 1995).

#### **2.4.3.3 Cuantificación de fitohormonas (ácido indol-3-acético y giberelinas) por HPLC<sup>2</sup>**

Con base en los resultados derivados de los bioensayos, así como la determinación de auxinas, se decidió confirmar la producción de AIA y evaluar la producción de giberelinas por un método más sensible.

Obtención de los inóculos. En la Tabla 11 se muestran las condiciones de cultivo para la obtención de los inóculos en la cuantificación de fitohormonas por HPLC.

Obtención de extractos. En la Figura 8 se muestra la metodología que se siguió a partir de la reportada por Tien *et al.*, (1979) y Crozier *et al.*, (1988).

Estándares de ácido indol-3-acético y ácido giberélico. Se prepararon soluciones de AIA y ácido giberélico (AG), ambas a una concentración de 100 ppm, en metanol (grado HPLC).

---

<sup>2</sup> Hight Performance Liquid Chromatography.

Cuantificación de fitohormonas. Se empleó un cromatógrafo Beckman con un "loop" o volumen de 20  $\mu$ L, una columna C<sub>18</sub>ODS-DDAPS de fase reversa (Ultrasphere analítica), con un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m y un tamaño de columna de 4.6mm x 25cm, la velocidad de flujo fue de 1 mL/min. La fase móvil fue metanol-agua (35:65) hasta los 20 min. Posterior a este tiempo la fase fue metanol (100%). Todas las muestras fueron analizadas a temperatura ambiente.

**Tabla 11.** Obtención de inóculos para la cuantificación de fitohormonas.

GRUPO MICROBIANO	MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDOS*	CONDICIONES DE INCUBACION	ACTIVACIÓN	ADAPTACIÓN	PROPAGACIÓN
<i>Pseudomonas</i>	King B	28°C/ 200 rpm	48 horas	48 horas	24 horas
<i>Azospirillum</i>	Tyler	35°C/ 125 rpm	72 horas	48 horas	72 horas
Fijadoras de nitrógeno de vida libre	Lipman	28°C/ 200 rpm	5 días	5 días	10 días

\*Los medios de cultivo fueron adicionados con DL-Triptofano (100  $\mu$ g/L). Los medios Lipman y Tyler (Jain y Patriquin, 1984) fueron además adicionados con una fuente de nitrógeno (NH<sub>4</sub>Cl 1g/L).

## 2.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS RIZOBACTERIAS SELECCIONADAS

Se llevó a cabo en dos etapas: a) Mediante la caracterización primaria de cada grupo bacteriano, y b) Pruebas bioquímicas específicas para *Pseudomonas* y Solubilizadoras de fósforo, empleando para ello el Sistema Apilab de BioMerieux; y en el caso de *Azospirillum* las pruebas recomendadas por Tarrand *et al.* (1978).

### 2.5.1 Caracterización primaria

Se realizó mediante la observación de características microscópicas, características coloniales en medios selectivos (Anexo 2) y la prueba de la oxidasa, en los cuatro grupos de rizobacterias.

### 2.5.2 Pruebas bioquímicas con el Sistema Apilab Plus de BioMerieux

De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización primaria para cada rizobacteria se empleó la(s) galería(s) correspondiente(s), del Sistema Apilab Plus de BioMerieux. Los perfiles bioquímicos obtenidos se analizaron con el software Apilab V.3.3.3.

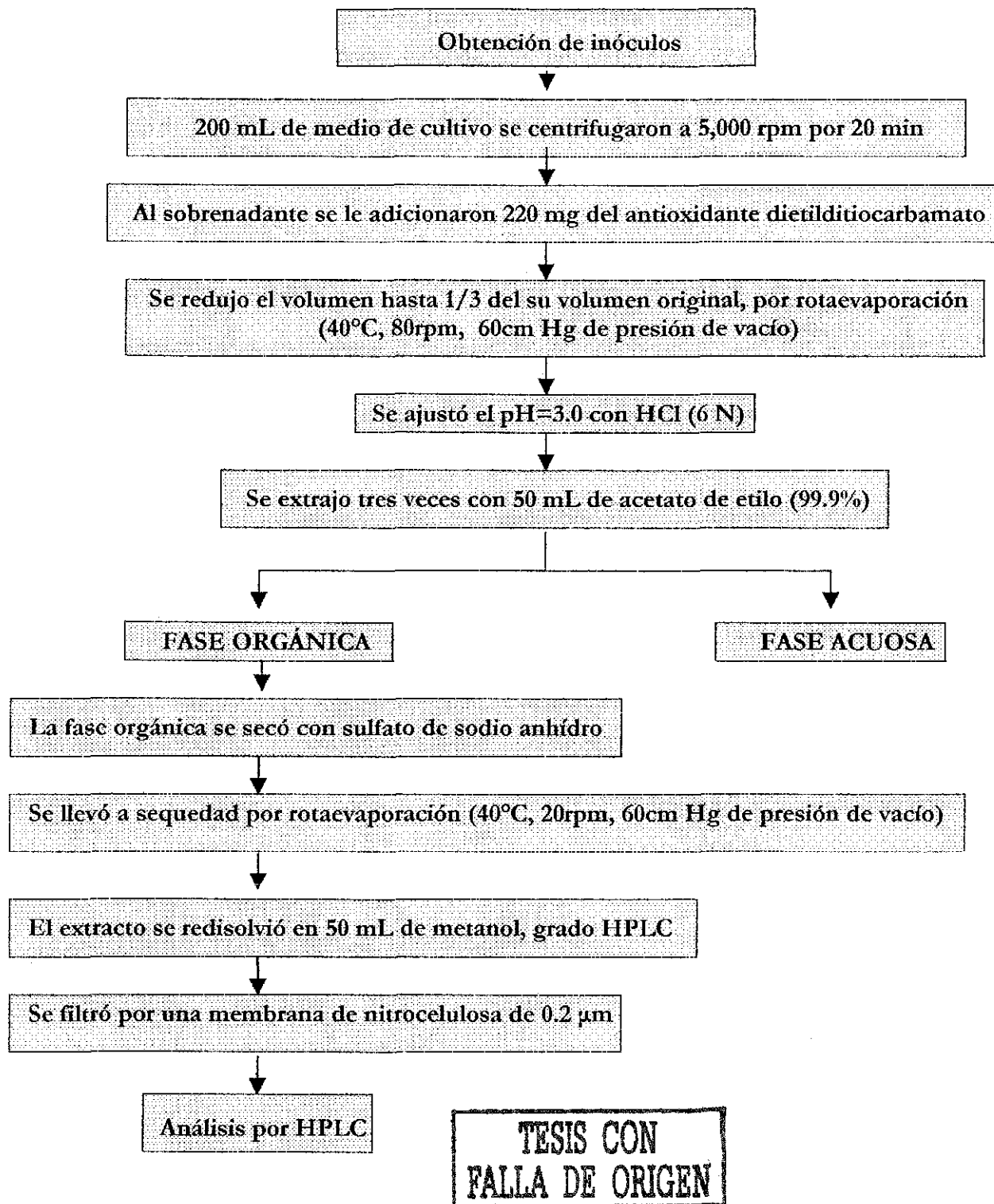


Figura 8. Obtención de extractos para la cuantificación de fitohormonas (ácido indol-3-acético y giberelinas).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE SUELOS

Los sitios muestreados en el Distrito de Desarrollo Rural 063 (DDR 063), presentaron suelos de consistencia gruesa, ya que se registró una textura que varió de arenosa a arena migajonosa (en su mayoría) y migajón arenosa (Tabla 12); lo que se corroboró con los valores de densidad aparente obtenidos (0.93-1.05 g/cc); los cuales según Gaucher (1971) corresponden a una estructura poco compactada.

*Tabla 12. Análisis Físicos y Químicos de suelos.*

SITIO DE MUESTREO	HCl (10%)	TEXTURA	DENSIDAD APARENTE (g/cc)	pH (1:2.5)	MATERIA ORGÁNICA (%)	TIEMPO DE RIEGO CON AGUAS RESIDUALES (AÑOS)
Quemthá	++	Migajón arenosa	0.97	8.15	3.13	90
Caxuxi	++	Arena migajonosa	0.98	7.20	3.08	90
San Salvador	++	Arena migajonosa	1.05	7.70	2.24	90
Boxthá	++	Arenosa	1.01	7.80	2.28	80
Motovatha	++	Arena migajonosa	0.95	7.22	3.48	70
El Bondhó	+++	Arena migajonosa	1.05	8.38	2.15	50
Demacú	++	Arenosa	1.05	8.05	4.50	25
Tepatpec	++	Migajón arcillo-arenosa	0.93	8.00	2.34	7
Denganzhá	++	Migajón arenosa	1.03	8.05	4.86	7
Tetepango	++	Arena migajonosa	0.95	7.80	2.30	6
La Tumba	++	Arenosa	1.05	7.48	2.70	2
Denganzhá	++	Migajón arenosa	1.01	7.95	4.87	0
Patria Nueva	+++	Arenosa	1.00	7.85	2.95	0
Bahía de Cortéz	+++	Arenosa	1.05	8.22	3.32	0

++ reacción agresiva, +++ reacción muy agresiva

Este tipo de suelos presentan buen drenaje, aireación y poca resistencia para el desarrollo radical; el inconveniente es que con más del 70% de arena, son pobres reservorios de materia orgánica (0.2-0.8%), como ocurre comúnmente en suelos de zonas áridas y semiáridas (Aguilera, 1989; Troch y Thompson, 1993).

Sin embargo, los suelos en estudio regados con aguas blancas presentan porcentajes de materia orgánica entre 2.95 y 4.87 (Tabla 12) debido a que son tierras de cultivo intensivo; por otro lado los suelos que han sido regados con aguas residuales por diferentes períodos de tiempo, se encontraron valores de 2.15% y hasta 4.86%, lo que indica una influencia directa por este sistema de riego. No obstante, los valores de pH registrados van de ligeramente alcalinos a alcalinos (7.20-8.38) lo que se atribuye a la presencia de  $\text{CaCO}_3$  (Porta *et al.*, 1994), aspecto que fue confirmado en todos los sitios en cuestión debido a que reaccionaron con efervescencia al ácido clorhídrico. Lo anterior coincide con lo reportado por Fassbender y Bornemisza (1987) y Troeh y Thompson (1993), quienes indican que las calizas neutralizan la acidez, que en este caso sería provocada por la presencia de materia orgánica adicionada con las aguas residuales, lo que sumado a la presencia de calcio en el suelo, provoca la floculación entre las partículas de arena, lo que induce la formación de agregados y favorecen la agricultura.

### **3.2 CUANTIFICACIÓN DE CUATRO GRUPOS DE RIZOBACTERIAS: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadoras de fósforo**

En la Tabla 13 se observa que la cantidad de rizobacterias en suelos regados con aguas residuales y con aguas blancas es variable y que en los cuatro tipos de cultivo, las rizobacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre se encuentran en mayor proporción. Así mismo se observa que los valores más bajos registrados corresponden al segundo muestreo, que coincide con la época más calurosa y seca del año.

*Azospirillum* se reporta como particularmente abundante en la rizosfera de gramíneas  $10^3$ - $10^8$  (Bashan y Levany, 1990); en cactáceas alrededor de  $10^3$  (Mascarúa-Esparza *et al.*, 1988) y en tomate alrededor de  $3 \times 10^5$  en la endorizosfera y  $2 \times 10^6$  en el rizoplano (Mohandas, 1988). En este estudio la población de esta bacteria, en gramíneas y en alfalfa fluctuó de  $2 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$ .

No se logró establecer ninguna relación entre el tiempo de riego con aguas residuales y su efecto sobre los diferentes grupos de rizobacterias en estudio, lo que coincide con Roane y Kellog (1996), quienes indican que la acumulación de Cd, Zn y Mn no se correlacionan significativamente con variaciones bióticas. Estos mismos autores, al comparar el efecto tóxico de plomo acumulado en el suelo sobre la microbiota observaron que éste, sólo se presentó en suelos ácidos. Cabe destacar que en la zona de estudio, la acumulación de plomo se reporta en los horizontes profundos, en donde no existen raíces y que los suelos muestreados presentaron un pH neutro o alcalino (7.20 a 8.38), factor que influye en la inmovilización de metales pesados (Mejía *et al.*, 1990).

Tabla 13. Número de bacterias viables de cuatro tipos de PGPR por gramo de raíz.

FECHA DE MUESTREO	LOCALIDAD	TIEMPO DE RIEGO CON AGUAS RESIDUALES (AÑOS)	CULTIVO	R I Z O B A C T E R I A S				
				Pseudomonas		Fijadores de	Solubilizadores	Azospirillum
				P	F	Nitrógeno	de Fósforo	
				<sup>1</sup> UFC x 10 <sup>6</sup>		<sup>1</sup> NMPx10 <sup>6</sup>		
13-02-98	Boxthá	80	<i>M. sativa</i>	103	51	2,019	50	135
	Patria Nueva	0	<i>M. sativa</i>	80	120	6,248	101	72
	Tetepango	6	<i>A. sativum</i>	30	8	6,895	199	83
	La Tumba	2	<i>A. sativum</i>	26	104	4,673	62	116
20-05-98	Caxuxi	90	<i>M. sativa</i>	96	70	417	78	2
	Demacú	25	<i>M. sativa</i>	8	11	201	31	5
	B. de Cortéz	0	<i>M. sativa</i>	8	9	181	62	24
	Motovatha	70	<i>Z. mays</i>	8	14	516	36	5
	Demacú	25	<i>Z. mays</i>	7	9	97	13	59
16-10-98	San Salvador	90	<i>M. sativa</i>	12	9	4,239	8	ND
	El Bondhó	50	<i>Z. mays</i>	9	86	5,921	1	ND
	El Bondhó	50	<i>P. vulgaris</i>	579	126	288	1	ND

<sup>1</sup>Media de 10 plantas con dos (placa) o tres (tubo) repeticiones por dilución.

P= productoras de piciamina, F= productoras de fluorescína ND= no determinado.

**3.3 AISLAMIENTO DE RIZOBACTERIAS: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadoras de fósforo**

Se aislaron 50 cepas de rizobacterias, de éstas 16 corresponden al género *Pseudomonas*, 11 a *Azospirillum*, 12 a fijadoras de nitrógeno de vida libre y 11 a solubilizadoras de fósforo. En la Tabla 14 se indican las claves asignadas, así como los cultivos de las que fueron aisladas.

**Tabla 14.- Clave de cepas de rizobacterias aisladas en suelos del Valle del Mezquital, Hgo y Celaya, Gto.**

RIZOBACTERIA	CULTIVO DE PROCEDENCIA				
	<i>Zea mays</i> (Zm)	<i>Medicago sativa</i> (Ms)	<i>Avena sativum</i> (As)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Pv)	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Le)
<b><i>Pseudomonas</i> (P)</b>	*PZm1 *PZm2 PZm3	*PMs1 *PMs2 *PMs3 *PMs4 PMs5	*PAs1 *PAs2 PAs4		*PLe1 *PLc2 *PLc3 *PLe4 PLe5
<b><i>Azospirillum</i> (A)</b>	*AZm1 *AZm2 *AZm3 *AZm4 *AZm5	*AMs1 *AMs2 *AMs3 AMs4	*AAs1	*APv1	
<b>Fijadoras de N de vida libre (F)</b>	*FZm1 *FZm2	*FMs1 FMs2	*FAs1		*FLe1 FLe2 FLe3 *FLe4 *FLe5 *FLe6 *FLe7
<b>Solubilizadoras de fósforo (S)</b>	*SZm1 *SZm2	*SMs1 *SMs2	*SAs1 SAs2		*SLe1 *SLe2 SLe3 SLe4 SLe5

\*Cepas evaluadas como PGPR

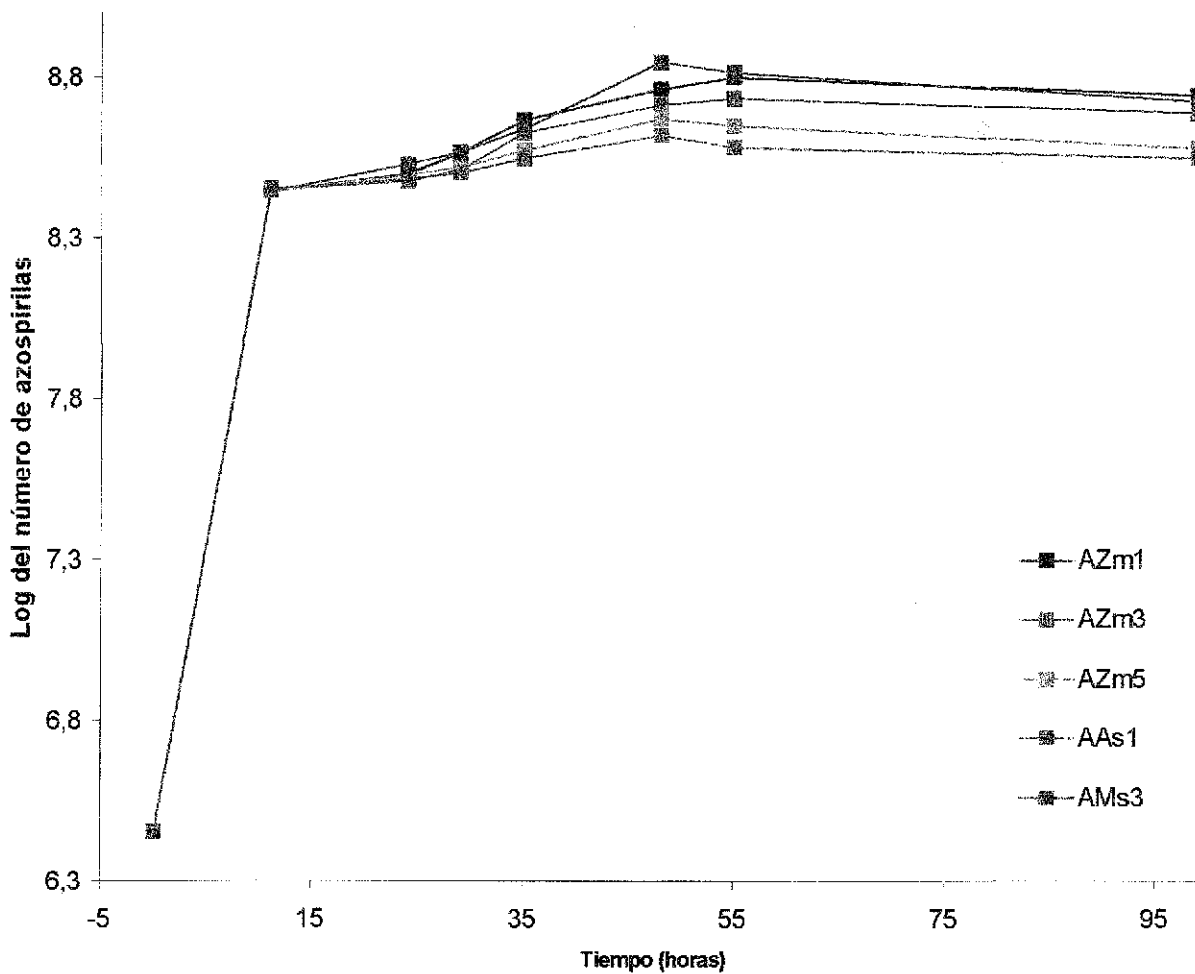
Los resultados de la caracterización primaria efectuada en esta etapa se discuten al final junto con los resultados de las pruebas bioquímicas, lo que permitió un mejor seguimiento de las pruebas aplicadas para la identificación.

3.4 SELECCIÓN DE CEPAS PGPR DEL JITOMATE BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

3.4.1 Estandarización para la obtención de inoculantes

3.4.1.1 Cinética de desarrollo en tres grupos de rizobacterias: *Azospirillum*, fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadoras de fósforo.

En la Gráfica 1 se muestra la cinética de desarrollo obtenida para cepas del género *Azospirillum* (AZm1, AZm3, AZm5, AMs3 y AAs1), en ésta se observó que la fase logarítmica de AZm5, AMs3 y AAs1 se encuentra entre las 11 y 48 horas de desarrollo, mientras que AZm1 y AZm3 se encuentra entre las 11 y 55 horas; y que AMs3 dió lugar al mayor número de bacterias.



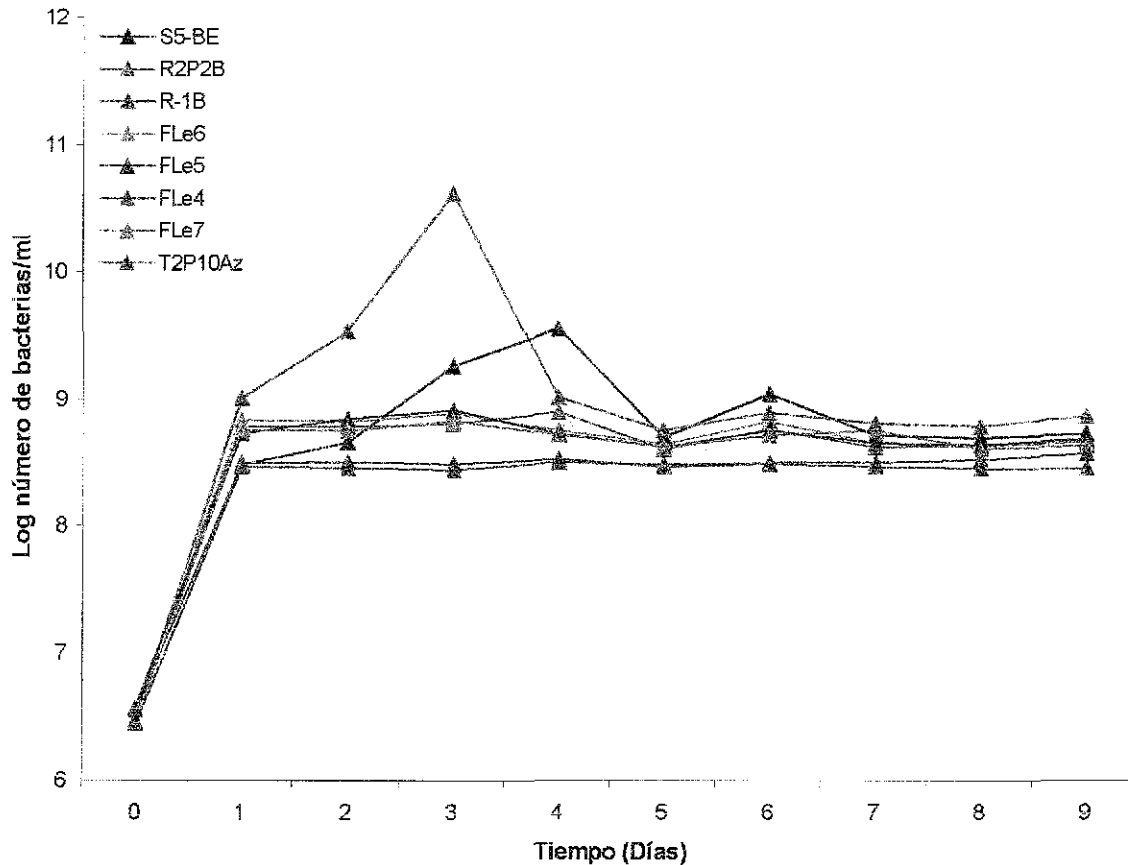
Gráfica 1. Cinética de desarrollo de cepas del género *Azospirillum*.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



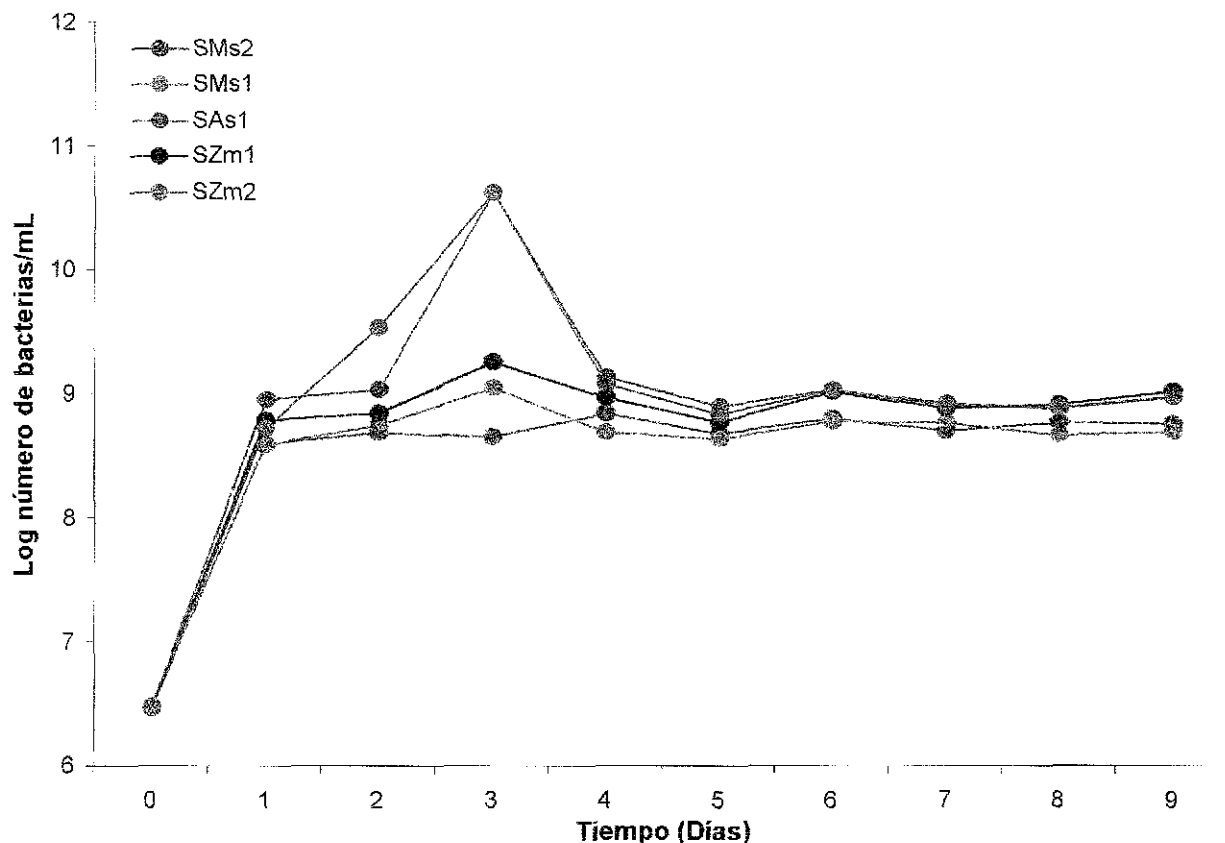
En la Gráfica 2 se muestran los resultados obtenidos con las cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre; e

n ésta se observa que dos de las cepas (T2P10Az y S5BE) tienen una fase logarítmica (log) más larga, la cual se extiende hasta el tercero y cuarto día de incubación, respectivamente. En tanto que con las otras, la fase log se mantiene hasta las 24 hrs.



**Gráfica 2.** Cinética de desarrollo de cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre.

En la Gráfica 3 se observa que la fase logarítmica para bacterias solubilizadoras de fósforo es muy similar a la observada en las cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre, en este caso las cepas SZm2 y SAs1 la presentan hasta los 3 días



Gráfica 3. Cinética de desarrollo de cepas solubilizadoras de fósforo.

Tabla 15. Tiempo de generación de diferentes grupos bacterianos.

<i>Azospirillum</i>	h/gen *	Fijadoras de nitrógeno de vida libre	h/gen *	Solubilizadoras de fósforo	h/gen *
AZm1	1.66	T2P10Az	2.85	SZm1	3.10
AZm3	1.66	R2P2B	3.25	SZm2	3.20
AZm5	1.66	R-1B	3.72	SMs1	3.41
AMs3	1.66	S5BE	3.75	SMs2	3.39
AAs1	1.66	FLc4	3.58	SAs1	2.92
		FLc5	3.35		
		FLc6	3.19		
		FLc7	3.15		

\*Tiempo que tarda una población en duplicarse.

El tiempo de duplicación para todas las bacterias del género *Azospirillum* fue de 1.66 h/gen, para fijadoras de nitrógeno de vida libre entre 2.85 y 3.75 h/gen, y para solubilizadoras de fósforo de 2.92 a 3.41 h/gen (Tabla 15).

### 3.4.1.2 Inoculantes.

Con base en los resultados anteriores y para la obtención de inóculos a emplear en los bioensayos, se decidió utilizar cultivos de 24 horas de los cuatro grupos bacterianos.

### 3.4.1.3 Control de calidad de los inóculos y de la técnica de inoculación.

En la Tabla 16 se muestran los resultados de la densidad poblacional que alcanzaron los cultivos a las 24 horas de incubación: en el caso de *Pseudomonas* la absorbancia fluctuó de 0.020 a 0.029; para el caso de *Azospirillum*, de 0.016 a 0.022; para fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadoras de fósforo, de 0.023 a 0.038. Los resultados del número de bacterias viables por mL de inóculo, a excepción de la cepa S5BE y FLe7, fueron superiores a  $10^8$  UFC/mL. El efecto de las PGPR se ha asociado con características específicas de las mismas como lo es la capacidad de las bacterias para adherirse a las semillas y desplazarse a través de las raíces (Bashan y Levanony, 1987), así como con la concentración de inóculo (Bashan y Levanony, 1990). En todos los casos se logró una buena adhesión de células a la semilla.

La concentración de inóculos de *Pseudomonas* fluctuó de  $10^8$ - $10^{11}$  UFC/mL, la que es superior a la empleada en otros estudios. Algunos reportes indican que el jitomate responde positivamente a concentraciones de  $10^6$  (Ikeda *et al.*, 1998); sin embargo Conn *et al.*, (1997) emplean concentraciones de  $10^8$  en otra solanácea como lo es la papa, mientras que esta misma concentración fue empleada por Nairn y Chanway (1999) en trigo.

Respecto a la concentración de inóculos de *Azospirillum*, se tiene que las UFC/mL fluctuaron de  $10^9$  a  $10^{13}$ . En este sentido Hadas y Okon (1987) reportan concentraciones superiores a  $10^8$  UFC/mL como niveles óptimos para jitomate *in vitro*.

Los resultados obtenidos muestran que, independientemente de la concentración del inóculo, en las semillas se registran cantidades de  $10^5$  UFC, lo que nos indica un punto de saturación de las semillas, con este tipo de bacterias. En estudios previos Esquivel-Cote (1997) y Urzúa (1997) encontraron buena respuesta en plantas de jitomate inoculadas con cultivos de *Azospirillum* en el orden de  $10^{10}$ . No obstante, para otros cultivos se indica que las concentraciones que inducen una mayor respuesta corresponden a  $10^6$ ; con concentraciones menores no se registra respuesta y con concentraciones superiores a  $10^8$  hay un efecto detrimental (Okón y Kapulnik, 1986).

Tabla 16. Número de bacterias presentes en el inóculo inicial y adheridas a semilla.

GRUPO MICROBIANO	CEPA	A (560)	UFC/mL	UFC/Semilla
<i>Pseudomonas</i>	PZm1	0.029	>3x10 <sup>11</sup>	2x10 <sup>6</sup>
	PZm2	0.021	>3x10 <sup>11</sup>	1x10 <sup>6</sup>
	PMs1	0.021	2x10 <sup>11</sup>	2x10 <sup>6</sup>
	PMs2	0.029	>3x10 <sup>11</sup>	7x10 <sup>5</sup>
	PMs3	0.028	>3x10 <sup>11</sup>	3x10 <sup>7</sup>
	PMs4	0.026	2x10 <sup>10</sup>	1x10 <sup>7</sup>
	PAAs1	0.029	8x10 <sup>10</sup>	1x10 <sup>4</sup>
	PAAs2	0.028	>3x10 <sup>11</sup>	5x10 <sup>5</sup>
	PLe1	0.026	4x10 <sup>8</sup>	2x10 <sup>4</sup>
	PLe2	0.026	5x10 <sup>9</sup>	2x10 <sup>4</sup>
	PLe3	0.020	>3x10 <sup>11</sup>	3x10 <sup>7</sup>
	PLe4	0.027	>3x10 <sup>11</sup>	8x10 <sup>6</sup>
<i>Azospirillum</i>	Cd	0.020	4x10 <sup>9</sup>	1x10 <sup>5</sup>
	Sp7	0.022	4x10 <sup>11</sup>	9x10 <sup>5</sup>
	VS1	0.016	4x10 <sup>11</sup>	4x10 <sup>5</sup>
	VS7	0.024	4x10 <sup>9</sup>	1x10 <sup>5</sup>
	VS9	0.026	3x10 <sup>12</sup>	5x10 <sup>5</sup>
	C4	0.020	1x10 <sup>10</sup>	9x10 <sup>5</sup>
	Pox	0.020	3x10 <sup>12</sup>	1x10 <sup>5</sup>
	AZm1	0.022	2x10 <sup>10</sup>	1x10 <sup>5</sup>
	AZm2	0.022	3x10 <sup>10</sup>	7x10 <sup>5</sup>
	AZm3	0.018	1x10 <sup>11</sup>	3x10 <sup>5</sup>
	AZm4	0.018	2x10 <sup>10</sup>	6x10 <sup>5</sup>
	AZm5	0.018	3x10 <sup>13</sup>	2x10 <sup>5</sup>
	AMs1	0.018	3x10 <sup>10</sup>	5x10 <sup>5</sup>
	AMs2	0.020	2x10 <sup>10</sup>	8x10 <sup>5</sup>
	AMs3	0.020	3x10 <sup>11</sup>	4x10 <sup>5</sup>
	AAAs1	0.020	4x10 <sup>12</sup>	6x10 <sup>5</sup>
APv1	0.020	5x10 <sup>11</sup>	2x10 <sup>5</sup>	
Fijadoras de nitrógeno de vida libre	T2P10Az	0.028	5x10 <sup>10</sup>	2x10 <sup>6</sup>
	R2P2B	0.026	>3x10 <sup>9</sup>	8x10 <sup>5</sup>
	R-1B	0.025	>3x10 <sup>9</sup>	2x10 <sup>6</sup>
	S5BE	0.030	2x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>5</sup>
	FZm1	0.033	1x10 <sup>8</sup>	2x10 <sup>4</sup>
	FZm2	0.035	1x10 <sup>8</sup>	8x10 <sup>4</sup>
	FMs1	0.032	2x10 <sup>8</sup>	6x10 <sup>3</sup>
	FAs1	0.038	>1x10 <sup>10</sup>	2x10 <sup>7</sup>
	FLe1	0.037	1x10 <sup>8</sup>	8x10 <sup>3</sup>
	FLe4	0.035	3x10 <sup>9</sup>	3x10 <sup>5</sup>
	FLe5	0.023	3x10 <sup>9</sup>	5x10 <sup>5</sup>
	FLe6	0.028	>3x10 <sup>9</sup>	9x10 <sup>5</sup>
	FLe7	0.025	9x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>2</sup>

Solubilizadores de fósforo	SZm1	0.029	ND	ND
	SZm1	0.032	3x10 <sup>8</sup>	<1x10 <sup>4</sup>
	SZm2	0.034	3x10 <sup>8</sup>	2x10 <sup>5</sup>
	SMs1	0.023	>3x10 <sup>11</sup>	9x10 <sup>3</sup>
	SMs2	0.037	>3x10 <sup>11</sup>	2x10 <sup>4</sup>
	SAs1	0.038	1x10 <sup>11</sup>	7x10 <sup>6</sup>
	SLe1	0.026	1x10 <sup>8</sup>	ND
	SLe2	0.038	>3x10 <sup>11</sup>	9x10 <sup>4</sup>

ND = no determinado

En el caso de las concentraciones de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, a excepción de S5BE y FLe7 se observa que, las UFC/mL de inóculo, son similares a las empleadas por otros investigadores: Kumar y Narula (1999) reportan concentraciones de inóculo de 10<sup>9</sup> UFC de *Azotobacter chroococcum* en semillas de trigo. La concentración encontrada tanto en inóculo (10<sup>6</sup>) como por semilla (10<sup>5</sup>), en la cepa S5BE, puede deberse a la producción de polisacáridos formados en el cultivo, lo que genera una gran adhesión de células a la semilla.

En relación a las bacterias solubilizadoras de fósforo Kim, *et al.*, (1998), en estudios con jitomate, reportan concentraciones de 7x10<sup>7</sup> UFC/mL de inóculo de *Enterobacter agglomerans*, en tanto que en el presente estudio la concentración de inóculo fluctuó de 10<sup>8</sup> a 10<sup>11</sup> UFC/mL.

Dichas concentraciones son similares a las empleadas por de Freitas, *et al.* (1997) quienes con concentraciones de 10<sup>10</sup> UFC/mL lograron 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> UFC/semilla de canola, mientras que otros autores reportan concentraciones de 10<sup>8</sup> UFC/mL de inóculo en *Vigna radiata* (Singh y Kapoor, 1998) y de 10<sup>9</sup> UFC/mL en diferentes semillas como trigo y *Prosopis* (Kumar y Narula, 1999; Kumar, *et al.*, 1999; Nautiyal, 1999).

Existen estudios en donde el inóculo de cepas PGPR se estandariza a una misma población, independientemente del género bacteriano en estudio, logrando la infección de rizobacterias en el hospedero en estudio (Becker, *et al.*, 1990; de Freitas y Germida, 1990b; de Freitas *et al.*, 1992). De manera similar Conn *et al.*, (1997), emplearon rizobacterias de diferentes géneros, como *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Serratia* y *Enterobacterium*, en donde la población del inóculo se ajustó en 10<sup>8</sup> UFC/mL, lo que permitió una buena infección en plántulas de papa a 6 semanas de desarrollo.

El efecto de la concentración de inóculo sólo se ha estudiado con *Azospirillum*, en tanto que no hay información respecto a los otros grupos, ya que sólo se indican las concentraciones empleadas en la inoculación.

Considerando que en el caso de *Azospirillum* se indica que, concentraciones elevadas de inóculo inducen respuestas desfavorables en el crecimiento de los vegetales, y en virtud de que los resultados de *Azospirillum* así como de UFC/mL fueron más altos que los reportados en la literatura se decidió disminuir la concentración de inóculo a emplear en los siguientes bioensayos.

### 3.4.2 Selección de rizobacterias con capacidad para promover el desarrollo vegetal y para producir auxinas

El efecto de la inoculación de las PGPR se manifiesta con diferentes variables de crecimiento de las plantas, tales como: germinación de las semillas, marcado aumento en el desarrollo del sistema radical (aumento en la longitud, volumen, cantidad de pelos absorbentes y peso fresco y seco); incrementos en la longitud del tallo, área foliar y peso de las plantas; aparición temprana de la floración y aumento del rendimiento; aspectos que han sido reportados en diferentes tipos de cultivos (Conn *et al.*, 1997; de Freitas y Germida, 1990b; de Freitas y Germida, 1991; de Freitas *et al.*, 1993; El-Khawas y Adachi, 1999; Fulchieri *et al.*, 1993; Noel, *et al.*, 1995). En estos estudios se ha establecido que la respuesta inducida depende del tipo de bacteria y hospedero, y desde luego de las condiciones ambientales (Pillay y Nowak, 1996). En algunos casos la interacción de la bacteria y la planta es altamente específica; por ejemplo *Azotobacter* y *Rhizobium*, en tanto que otras bacterias no son específicas por lo que se asocian y promueven el desarrollo de diferentes vegetales (de Freitas y Germida, 1990a).

La información coincide con los resultados del presente estudio, en las que de manera general se observa que las cepas probadas varían en su capacidad para promover el desarrollo de las raíces y de la parte aérea; efecto que fue observado con bacterias aisladas de la rizosfera de jitomate y de otros vegetales, estas últimas indujeron mejores respuestas, lo que indica que no hay especificidad. De las 49 cepas probadas en la primera selección, se descartaron 18 y de las 32 seleccionadas, 6 proceden de la rizosfera de jitomate, y de las 26 de la rizosfera de otras plantas, 24 fueron aisladas en el presente estudio y 2 son de colección. A continuación se discuten detalladamente los resultados de cada bioensayo.

#### 3.4.2.1 Bioensayo 1 (B1).

Los tratamientos con las cepas PMs2, PMs3, PAs1 y FLe1 inhibieron la germinación. Es conveniente aclarar que en el caso de las cepas PAs1, se alcanzó el 100% de germinación hasta los 10 días, en tanto que con las otras tres sólo fue de 83% (Tabla 17).

Respecto a la promoción del desarrollo de la raíz: las cepas PZm1, PMs1 y PMs3 presentaron aumentos con diferencias estadísticamente significativas (DES) en longitud, respecto al testigo; aún cuando las cepas FZm2 y FMs1 no presentaron dicha diferencia, dieron lugar a incrementos sobresalientes (71% y 87%, respectivamente).

En el peso fresco de la raíz no se registraron DES; sin embargo, con las cepas FMs1 y SZm1 se registraron incrementos del 160% y el 157%, respecto al testigo.

En cuanto al efecto en el desarrollo de la parte aérea: sólo se presentaron DES en altura, en donde la mejor respuesta se dio con la cepa FMs1; las cepas FZm2 y SZm1 también presentaron considerables incrementos respecto al testigo. La absorción de agua hacia la parte aérea fue favorecida por las cepas PZm2, PMs3, PAs2, FZm2 y SZm1, ya que se obtuvieron incrementos que fluctuaron entre el 130% y el 120% en peso fresco; este efecto repercute en la generación de biomasa, con las cepas PZm2 (114%) y SZm1 (128%) respecto al testigo. Cabe mencionar que la cepa FLe1 presentó un efecto detrimental con la que se registraron valores inferiores al testigo en altura y peso seco de la parte aérea.

Considerando las diferencias estadísticamente significativas y el número de variables promovidas por los tratamientos inoculados, de las 16 cepas se seleccionaron 11, las cuales se ubicaron en orden decreciente en tres grupos: a) FMs1, SZm1 y PMs3; b) PZm1, PZm2, PAs2 y FZm2; y c) PMs1, PMs2, PAs1 y FAs1.

**Tabla 17. B1.** Efecto de la inoculación de PGPR en la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas de jitomate a 35 días de desarrollo.

CEPAS	% DE GERMINACIÓN (6 DÍAS)	RAÍZ		PARTE AÉREA			
		LONGITUD (cm)	PESO FRESCO (g)	ALTURA (cm)	NÚMERO DE HOJAS	PESO FRESCO (g)	PESO SECO (g)
PZm1	100	26.917 a	0.227	5.683 ab	2.000	0.247	0.019
PZm2	100	21.400 ab	0.212	6.400 ab	2.200	0.386	0.030
PMs1	100	27.717 a	0.167	5.800 ab	1.833	0.218	0.017
PMs2	83	20.020 ab	0.196	6.280 ab	2.200	0.312	0.024
PMs3	0 **	26.920 a	0.222	6.640 ab	2.400	0.370	0.026
PMs4	100	18.367 ab	0.168	5.917 ab	1.333	0.192	0.018
PAs1	83 *	20.383 ab	0.217	6.083 ab	1.833	0.317	0.024
PAs2	100	20.867 ab	0.225	6.267 ab	2.167	0.377	0.025
PLe1	100	21.560 ab	0.220	6.200 ab	1.800	0.256	0.019
PLe2	100	21.050 ab	0.148	5.083 ab	1.333	0.300	0.013
FZm1	100	21.200 ab	0.212	5.550 ab	1.333	0.267	0.020
FZm2	100	24.233 ab	0.212	6.917 ab	2.000	0.377	0.027
FMs1	100	26.500 ab	0.268	7.300 a	2.200	0.356	0.026
FAs1	100	22.400 ab	0.184	6.140 ab	1.400	0.236	0.016
FLe1	50 **	17.320 ab	0.126	3.840 b	1.200	0.060	0.010
SZm1	100	22.300 ab	0.265	6.833 ab	2.167	0.388	0.032
Testigo	100	14.167 b	0.103	5.833 ab	1.000	0.168	0.014

Los tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ). Anexo 5. \*Germinación del 100% después de 6 días, \*\*germinación del 83% después de 6 días.

3.4.2.2 Bioensayo 2 (B2).

Las cepas que promovieron la germinación a los 6 días fueron: Cd, Sp7, VS9, AZm4, AZm5, AMs2, AMs3, AAs1. Respecto a la promoción del desarrollo vegetal, se registraron DFS en longitud de la raíz, altura, peso fresco y seco de la parte aérea (Tabla 18).

En longitud de la raíz la cepa Pox corresponde al mejor tratamiento, seguido de la cepa APv1 con un incremento del 51%, respecto al testigo; aspecto que no se manifestó en el peso fresco de la raíz, en donde la cepa Pox incrementó un 179% su peso respecto al testigo; en tanto que las cepas VS9 y AZm5, promovieron un aumento del 288% y 293%, respectivamente.

**Tabla 18.** B2. Efecto de la inoculación de PGPR en la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas de jitomate a los 35 días de desarrollo.

CEPAS	% DE GERMINACIÓN (6 DÍAS)	RAÍZ		PARTE AÉREA			
		LONGITUD (cm)	PESO FRESCO (g)	ALTURA (cm)	NÚMERO DE HOJAS	PESO FRESCO (g)	PESO SECO (g)
Cd	100	16.183 ab	0.343	5.750 abc	2.000	0.237 ab	0.0153 bc
Sp7	100	13.417 b	0.313	5.583 abc	1.667	0.262 ab	0.0210abc
VS1	67 **	15.083 ab	0.368	5.333 bc	2.000	0.265 ab	0.0150 bc
VS7	83 *	17.083 ab	0.235	6.500 abc	2.000	0.335 ab	0.0200abc
VS9	100	19.300 ab	0.420	7.100 ab	2.000	0.435 ab	0.0330abc
C4	50 **	11.833 b	0.197	5.833 abc	1.500	0.232 ab	0.0140 bc
Pox	83 *	25.583 a	0.302	5.833 abc	1.833	0.205 ab	0.0220abc
AZm1	67 **	19.083 ab	0.228	7.167 ab	2.167	0.352 ab	0.0237abc
AZm2	50 *	12.667 b	0.112	5.667 abc	1.000	0.135 b	0.0133 c
AZm3	50 **	18.500 ab	0.243	6.500 abc	2.000	0.278 ab	0.0423 a
AZm4	100	15.167 ab	0.345	5.833 abc	2.000	0.372 ab	0.0186 bc
AZm5	100	18.583 ab	0.425	7.250 ab	1.333	0.513 a	0.0475 a
AMs1	67 *	18.033 ab	0.210	7.000 ab	1.500	0.250 ab	0.0178 bc
AMs2	100	17.917 ab	0.247	6.500 abc	2.000	0.282 ab	0.0400abc
AMs3	100	20.000 ab	0.317	7.667 ab	2.000	0.373 ab	0.0290abc
AAAs1	100	19.917 ab	0.320	8.583 a	1.833	0.327 ab	0.0270abc
APv1	67	22.500 ab	0.175	4.917 bc	2.000	0.188 b	0.0205abc
Testigo	50 **	14.583 ab	0.108	3.500 c	1.833	0.162 b	0.0149 bc

Los tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ). Anexo 5. \*Germinación del 100% después de 6 días, \*\*Germinación del 83% después de 6 días.

En cuanto a la promoción en la parte aérea, el mejor tratamiento en altura corresponde a la cepa AAs1 y en un segundo grupo (ab) las cepas VS9, AZm1, AZm5, AMs1 y AMs3 con incrementos que fluctuaron del 100% al 119%, respecto al testigo.



En relación a la absorción de agua y producción de biomasa, la mejor cepa fue AZm5 con la que se registró un incremento de 216% (peso fresco) y 218% (peso seco). La cepa AZm2 presentó un efecto detrimental en esta última variable, ya que presentó valores inferiores al testigo.

Para la selección de cepas, se consideraron sólo aquellas que promovieron el mayor número de variables (al menos 5 de los 6 evaluados) y de acuerdo al grado de incremento, éstas se clasificaron en tres grupos: a) VS9, AMs3, AAs1 y AZm5; b) AMs2, AZm1 y AZm3; y c) Cd, Pox, VS7, AMs1, AZm4 y APv1.

*3.4.2.3 Bioensayo 3 (B3).*

Los resultados obtenidos en el B3 muestran que todas las cepas respecto al testigo promovieron la germinación a los 6 días (Tabla 19).

**Tabla 19.** B3. Efecto de la inoculación de PGPR en la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas de jitomate a los 35 días de desarrollo.

CEPAS	% DE GERMINACIÓN (6 DÍAS)	RAÍZ			P A R T E A É R E A		
		LONGITUD (cm)	PESO FRESCO (g)	ALTURA (cm)	NÚMERO DE HOJAS	PESO FRESCO (g)	PESO SECO (g)
T2P10Az	100	9.167	0.050	4.600	1.167	0.212	0.009 ab
R2P2B	100	11.833	0.050	5.083	1.667	0.157	0.011 ab
R1B	83 *	8.000	0.060	4.917	1.167	0.117	0.007 b
S5BE	83 *	19.600	0.160	6.100	3.000	0.472	0.024 ab
PLe3	67 *	10.250	0.047	5.083	2.000	0.260	0.011 ab
PLe4	50 **	13.000	0.068	5.600	1.600	0.258	0.013 ab
FLe4	50 ***	7.167	0.033	3.667	2.000	0.147	0.007 b
FLe5	83 *	15.417	0.127	6.917	2.333	0.385	0.019 ab
FLe6	50 **	14.200	0.096	7.260	2.000	0.436	0.020 ab
FLe7	83 **	15.250	0.108	5.875	1.750	0.368	0.020 ab
SZm1	83	15.600	0.134	6.400	2.800	0.362	0.027 ab
SZm2	83 *	13.500	0.122	6.833	2.667	0.360	0.022 ab
SMs1	67 **	14.600	0.130	7.300	2.800	0.482	0.036 a
SMs2	67 *	17.833	0.130	7.717	2.833	0.452	0.023 ab
SAs1	83	13.000	0.088	6.200	2.200	0.304	0.011 ab
SLe1	67 *	8.500	0.042	4.800	2.000	0.192	0.008 b
SLe2	67	12.375	0.063	5.875	1.750	0.255	0.015 ab
Testigo	17	8.500	0.039	4.825	1.500	0.210	0.010 ab

Los tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ). Anexo 5. \*Germinación del 100% después de 6 días, \*\*Germinación del 83% después de 6 días, \*\*\*Germinación del 50% después de 6 días

Sólo se encontraron DES en peso seco de la parte aérea, en donde la cepa SMs1 fue el mejor tratamiento con un incremento del 260% respecto al testigo, en tanto que las cepas R1B, FLe4 y SLe1 presentaron un efecto detrimental. Por otro lado se observa que, las cepas S5BE y SMs2 presentaron resultados sobresalientes, al aumentar la longitud de la raíz, en un 130% y 109%, respecto al testigo. El peso fresco de la raíz fue estimulado por las cepas S5BE, SZm1, SMs1 y SMs2 de un 233% a un 310%, respecto al testigo.

En altura los tratamientos que presentaron mejor respuesta fueron aquellos inoculados con las cepas FLe5, FLe6, SZm2, SMs1 y SMs2 con incrementos de 41% al 60%, respecto al testigo. La cepa S5BE promovió la aparición de hojas a los 35 días de desarrollo. El peso fresco de la parte aérea fue incrementado por las cepas S5BE, FLe6, SMs1 y SMs2 de un 107% a un 129% respecto al testigo. La cepa FLe4 tuvo un efecto detrimental, ya que en 5 de las 6 variables evaluados, registró valores por debajo del testigo, incluso el porcentaje de germinación. Así mismo se confirma el efecto de la cepa SZm1 (una de las seleccionadas en el B1).

Con base en la capacidad para promover 6, 5 y 4 de las 6 variables evaluadas, las cepas se clasificaron en orden decreciente en tres grupos: a) S5BE, SMs1 y SMs2, b) FLe5, FLe6 y SZm1; y c) FLe7 y SZm2.

#### 3.4.2.4 Comprobación de infección de cepas PGPR en raíces.

Todas las cepas infectaron exitosamente la raíz en plantas de jitomate a 35 días de desarrollo. Las PGPR procedentes de la rizosfera de *Lycopersicon esculentum* (PLc1, PLe2, PLe3, PLe4, FLe1, FLe4, FLe5, FLe6, FLe7, SLe1 y SLe2) se comportaron de manera similar a aquellas aisladas de otros cultivos; de este modo todas mostraron la capacidad para infectar al jitomate, lo que indica que no son específicas, lo que coincide con lo reportado por Ikeda *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998 y Pillay y Nowak, 1996.

#### 3.4.2.5 Capacidad de rizobacterias para producir auxinas.

En la Tabla 20 se observa que no existe correlación de las cepas seleccionadas en los tres primeros bioensayos con la producción de auxinas; resultados que no son sorprendentes, ya que se ha demostrado que aun cuando la producción de auxinas, especialmente el ácido indol-3-acético (AIA), juega un papel esencial en la estimulación del desarrollo de las plantas, no es posible atribuir únicamente a este fenómeno la respuesta observada, por lo que es necesario efectuar otros estudios en los que se consideren otros factores tales como producción de ácido giberélico (Bottini *et al.*, 1989; Leinhos y Birnstiel, 1989; Rademacher, 1994), la fijación de nitrógeno (Glick, 1995) ó la producción de NO<sub>2</sub> del que se ha demostrado provoca un incremento considerable en la formación de raíces laterales de trigo y promueve el crecimiento de plantas (Bothe *et al.*, 1992).

Los resultados muestran que de las 31 cepas seleccionadas por su capacidad para promover el desarrollo vegetal, sólo 14 mostraron capacidad para producir compuestos indólicos cuando se aplicó el método de Bric, *et al* (1991). En cambio los resultados obtenidos por el método de Gordon y Weber indican que todas las cepas produjeron compuestos indólicos en cantidades variables, las que fluctuaron de 3 a 227 ppm.

Tabla 20. Determinación de auxinas en cultivos de rizobacterias, por dos métodos colorimétricos.

CEPA (B1)	Bric, <i>et al.</i>	Gordon y Weber ppm*	CEPA (B2)	Bric, <i>et al.</i>	Gordon y Weber ppm*	CEPA (B3)	Bric, <i>et al.</i>	Gordon y Weber ppm*
<sup>2</sup> PZm1	+	ND	<sup>3</sup> Cd	+	11.03	T2P10Az	-	37.30
<sup>2</sup> PZm2	+	13.07	Sp7	+	227.87	R2P2B	+	11.8
<sup>3</sup> PMs1	-	6.96	VS1	+	8.65	R1B	+	2.00
<sup>3</sup> PMs2	+	6.20	<sup>3</sup> VS7	-	197.87	<sup>1</sup> S5BE	-	14.00
<sup>1</sup> PMs3	-	ND	<sup>1</sup> VS9	+	100.20	PLe3	-	4.20
PMs4	-	8.18	C4	+	161.61	PLe4	+	1.60
<sup>3</sup> PAs1	+	10.10	<sup>3</sup> Pox	-	ND	FLe4	-	21.30
<sup>2</sup> PAs2	-	3.80	<sup>2</sup> AZm1	-	24.14	<sup>2</sup> FLe5	+	10.00
PLe1	-	ND	AZm2	-	27.00	<sup>2</sup> FLe6	+	10.00
PLe2	-	ND	<sup>2</sup> AZm3	-	55.85	<sup>3</sup> FLe7	-	4.00
FZm1	-	12.60	<sup>3</sup> AZm4	-	20.87	<sup>2</sup> SZm1	+	25.00
<sup>2</sup> FZm2	+	9.00	<sup>1</sup> AZm5	+	28.10	<sup>3</sup> SZm2	+	7.00
<sup>1</sup> FMs1	-	16.50	<sup>3</sup> AMs1	-	111.93	<sup>1</sup> SMs1	-	18.00
<sup>3</sup> FAs1	+	10.65	<sup>2</sup> AMs2	+	12.97	<sup>1</sup> SMs2	-	8.00
FLe1	+	9.04	<sup>1</sup> AMs3	-	9.70	SAs1	-	6.30
<sup>1</sup> SZm1	+	25.00	<sup>1</sup> AAAs1	-	11.10	SLe1	+	ND
			<sup>3</sup> APv1	-	6.43	SLe2	ND	ND

Las cepas seleccionadas en los bioensayos B1, B2 y B3, se indican de acuerdo al nivel de selección (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>, <sup>3</sup>)

\*Partes por millón de sustancias parecidas al ácido indol-3-acético. + reacción, - sin reacción. ND=no determinado

Por otro lado, existen informes que indican que algunas cepas de *Azospirillum* pueden producir más de 30 µg/mL de ácido indol-3-acético en medios de cultivo enriquecidos con triptofano (Crozier *et al.*, 1988). Otros estudios reportaron que, bacterias solubilizadoras de fósforo del género *Bacillus*, produjeron de 5.33 a 9.43 µmol de sustancias parecidas al AIA/mL de medio de cultivo, mientras que *Xanthomonas maltophilia* produjo 2.31 µmol de sustancias parecidas al AIA/mL de medio de cultivo (de Freitas *et al.*, 1997).

Costacurta *et al.*, (1998) reportaron mediante el reactivo de Salkowski, que el género *Xanthomonas* es productor pobre de sustancias parecidas al AIA (1.25 µg/mL de medio de cultivo), comparado con *Azospirillum brasilense* (36 µg/mL de medio de cultivo) y *Rhizobium meliloti* (12.4 µg/mL de medio de cultivo). Sin embargo, Crozier *et al.*, (1988) afirman que el ensayo colorimétrico puede dar sobrevaluaciones del contenido de esta sustancia (26 µg/mL contra 0.5 µg/mL en HPLC).

Por otra parte, se tiene que de las cinco cepas en las que se registraron las cantidades más elevadas de compuestos indólicos, dos (Sp7 y C4) fueron descartadas en los bioensayos, y que los valores obtenidos en las cepas seleccionadas son muy variables, los que fluctúan de 3 a 55 ppm en la mayoría de las cepas y de 111 a 197 ppm en otras tres cepas.

Las variaciones registradas en los dos métodos se atribuyen a las condiciones de cultivo, ya que la prueba de Bric se aplica en cultivos en placa, en tanto que la otra determinación se realiza en cultivos líquidos incubados en agitación, condición que favorece la producción de compuestos indólicos.

Los resultados obtenidos coinciden con los reportes de Costacurta *et al.* (1998); de Freitas *et al.*, (1997); Kumar y Narula (1999) y Srinivasan *et al.*, (1996); quienes emplean este tipo de metodología que ofrece la posibilidad de efectuar una rápida selección de cepas PGPR; sin embargo, sólo debe aplicarse como criterio inicial, especialmente cuando se parte de una gran cantidad de cepas, ya que el efecto promotor debe ser confirmado mediante la inoculación en plantas, en donde en la interacción microorganismo-planta, los procesos bacterianos que afectan el desarrollo de las plantas, pueden operar simultáneamente o en sucesión, lo que dependerá de las condiciones ambientales (Bashan y Holguin, 1997); asimismo los cambios observados a nivel de plántula pueden permanecer o se desvanecerse en las etapas de maduración del cultivo (Bashan *et al.*, 1996) y especialmente determinar su efecto en la producción.

Lo anterior indica que para recomendar cepas para la producción de biofertilizantes es indispensable efectuar la evaluación de su efecto en etapas más avanzadas de crecimiento y preferentemente hasta producción, resultados que deberán ser validados en experimentos de campo.

### ***3.4.3 Confirmación del efecto promotor del desarrollo de las cepas seleccionadas a los 35 y 70 días (B4 y B5)***

En esta etapa se reevaluaron 28 cepas, las que corresponden a 23 (de las 31) seleccionadas en los primeros bioensayos, las que además mostraron ser productoras de AIA y 5 que solo presentaron la capacidad de producir auxinas.

#### ***3.4.3.1 Control de calidad de los inóculos.***

En la Tabla 21 se muestran los resultados de control de calidad de los diferentes inóculos, en ella se observa que se logró ajustar el inóculo al intervalo indicado por otros autores para cada rizobacteria (página 50).

Tabla 21. Número de bacterias presentes en el inóculo inicial y adheridas a semillas.

RIZOBACTERIA	CEPA	A (560)	UFC/mL	UFC/Semilla
<i>Pseudomonas</i>	PZm2	0.019	3x10 <sup>6</sup>	4x10 <sup>4</sup>
	PMs1	0.019	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>3</sup>
	PMs2	0.019	1x10 <sup>7</sup>	3x10 <sup>5</sup>
	PMs3	0.018	3x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>
	PMs4	0.017	1x10 <sup>8</sup>	8x10 <sup>5</sup>
	PAs1	0.018	2x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>5</sup>
	PAs2	0.017	6x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>4</sup>
	PLe3	0.017	6x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>5</sup>
<i>Azospirillum</i>	VS9	0.009	5x10 <sup>4</sup>	4x10 <sup>4</sup>
	AZm1	0.007	1x10 <sup>5</sup>	ND
	AZm3	0.007	3x10 <sup>5</sup>	ND
	AZm5	0.009	2x10 <sup>6</sup>	ND
	AMs3	0.008	1x10 <sup>6</sup>	ND
	AAs1	0.007	7x10 <sup>5</sup>	ND
Fijadoras de nitrógeno de vida libre	R2P2B	0.027	7x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>2</sup>
	S5BE	0.027	8x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>3</sup>
	FZm2	0.027	<1x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>2</sup>
	FMs1	0.029	2x10 <sup>5</sup>	9x10 <sup>4</sup>
	FAs1	0.028	1x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>3</sup>
	FLe1	0.028	5x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>4</sup>
	FLe4	0.028	1x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>3</sup>
	FLe5	0.028	9x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>3</sup>
	FLe6	0.028	<1x10 <sup>4</sup>	<1x10 <sup>3</sup>
	FLe7	0.027	1x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>2</sup>
Solubilizadoras de fósforo	SZm1	0.029	NLD	8x10 <sup>1</sup>
	SZm2	0.026	2x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>2</sup>
	SMs1	0.028	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>4</sup>
	SMs2	0.026	NLD	2x10 <sup>4</sup>

ND = no determinado

La población de células/mL de inóculo y por semilla, en cepas de *Pseudomonas* fluctuó de 6x10<sup>5</sup> a 1x10<sup>8</sup> y de 1x10<sup>3</sup> a 1x10<sup>5</sup>, en *Azospirillum* de 5x10<sup>4</sup> a 1x10<sup>6</sup> (no determinado en semilla), en bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre de <1x10<sup>4</sup> a 1x10<sup>7</sup> y de 1x10<sup>2</sup> a 9x10<sup>4</sup>, y en solubilizadoras de 1x10<sup>5</sup> a 2x10<sup>6</sup> y de 8x10<sup>1</sup> a 2x10<sup>4</sup>, respectivamente. No obstante que en el presente estudio la densidad poblacional de los inóculos fue menor a la empleada en los bioensayos anteriores, en todos los casos la infección de las raíces se confirmó en plantas a 35 días (datos no expuestos) y nuevamente se logró observar el mejoramiento en el desarrollo de las plantas (Tabla 22 y 23).

### *3.4.3.2 Bioensayo 4 (B4)*

En la Tabla 22 se muestran los resultados obtenidos en el bioensayo 4 (B4). En éste se observa que a excepción de la cepa PZm2, las demás cepas promovieron el desarrollo de las diversas variables de crecimiento evaluados, con lo que se corroboraron los resultados obtenidos en B1, B2 y B3.

Las cepas que destacaron corresponden a FZm2, FLe4, FLe5 y SMs1 con las que se obtuvieron los valores más altos en las 8 variables evaluadas; en segundo término se ubicaron los tratamientos de las cepas AZm3, S5BE, FMs1, FAs1 y SZm2 las que también promovieron el desarrollo de todas las variables pero sólo de 5 a 7 de estas se presentaron los valores más altos.

Es necesario hacer notar que las cepas FLe1 y FLe4 que en este bioensayo se ubicaron entre los mejores tratamientos, no habían sido seleccionadas en los bioensayos previos. En tanto que PMs4 y R2P2B mantuvieron un comportamiento similar y PLe3 tuvo un efecto detrimental que se manifestó desde la germinación (datos no expuestos) y un desarrollo raquítico, en sólo algunas de las repeticiones, por lo que este tratamiento fue descartado a los 20 días; situación que se repitió en el bioensayo conducido en maceta (B5).

### *3.4.3.3 Bioensayo 5 (5)*

Los resultados obtenidos fueron confirmados con la evaluación de otras variables de crecimiento que se muestran en la Tabla 23, en donde se observa que únicamente S5BE y FLe5 seleccionadas en el B4 nuevamente se comportan entre las mejores cepas, en tanto que AZm5, AMs3, AZm1, AAs1 y FLe1 cuyos valores resultaron bajos en B4; en este caso corresponden a las cepas en las que se registraron los valores más altos, de 6 a 8 de las variables evaluadas.

Tabla 22. Efecto de la inoculación de cepas PGPR sobre plantas de jitomate a 35 días de desarrollo.

TRATAMIENTO	ALTURA DE LA PARTE AÉREA	NÚMERO DE HOJAS	DIÁMETRO DEL TALLO	PESO FRESCO DE LA PARTE AÉREA	PESO SECO DE LA PARTE AÉREA	LONGITUD DE LA RAÍZ	PESO FRESCO DE LA RAÍZ	NUM DE RAÍCES ADVENTICIAS
TP*	2.500 i-k	1.250 c-e	1.125 d	0.0475 f	0.0037 c-e	9.75 f	0.0675 d-f	6.25 f
PZm2	2.250 j-k	0.750 e	1.000 d	0.0375 f	0.0021 e	8.75 f	0.0425 e-f	6.75 e-f
PMs1	3.333 f-k	1.667 b-e	1.667 a-c	0.0733 e-f	0.0198 a-c	14.33 d-f	0.0567 e-f	12.00 b-f
PMs2	4.750 b-g	1.500 c-e	1.000 d	0.1725 b-f	0.0100 a-e	9.25 f	0.0275 f	6.75 e-f
PMs3	5.750 a-d	3.250 a	1.500 a-d	0.1700 b-f	0.0130 a-e	16.25 b-f	0.2175 a-f	16.25 a-f
PMs4	3.667 e-k	1.667 b-e	1.333 a-d	0.0700 e-f	0.0016 e	19.33 a-f	0.1167 c-f	8.00 c-f
PA s1	4.700 b-h	2.000 a-e	1.500 a-b	0.1080 c-f	0.0100 a-e	14.20 d-f	0.0940 d-f	9.60 c-f
Pas2	2.700 h-k	1.800 a-e	1.200 b-d	0.0460 f	0.0042 b-e	11.00 c-f	0.0520 e-f	8.60 c-f
TA*	3.250 g-k	2.250 a-e	1.250 b-d	0.0950 d-f	0.0060 b-e	14.00 d-f	0.1200 c-f	7.75 d-f
VS9	5.125 b-g	2.000 a-e	1.000 d	0.1400 b-f	0.0091 a-e	18.00 a-f	0.1575 b-f	8.75 c-f
AZm1	5.375 b-f	2.000 a-e	1.500 a-d	0.1750 b-f	0.0094 a-e	19.25 a-f	0.1625 b-f	13.75 a-f
AZm3	6.300 a-c	2.200 a-e	1.500 a-d	0.3100 a-b	0.0203 a-b	28.00 a-b	0.2880 a-d	14.60 a-f
AZm5	4.300 c-i	2.000 a-e	1.500 a-d	0.1360 c-f	0.0065 b-e	14.60 c-f	0.1000 c-f	11.20 b-f
AMs3	5.600 a-e	1.800 a-f	1.400 a-d	0.1460 b-f	0.0096 a-e	17.40 b-f	0.0840 d-f	8.60 c-f
AA s1	5.300 b-g	2.000 a-e	1.500 a-d	0.1760 b-f	0.0133 a-e	17.60 b-f	0.1920 a-f	14.60 a-f
TF*	3.600 e-k	1.600 c-e	1.300 b-d	0.0560 f	0.0043 b-e	9.60 f	0.0540 e-f	7.80 d-f
S5BE	6.000 a-c	2.200 a-e	1.700 a-c	0.2660 a-d	0.0166 a-e	27.60 a-b	0.3720 a-b	18.60 a-d
R2P2B	5.300 b-g	2.000 a-e	1.600 a-c	0.2040 a-f	0.0142 a-e	22.80 a-e	0.2300 a-f	16.80 a-f
FZm2	7.500 a	2.800 a-c	1.700 a-c	0.3740 a	0.0232 a	22.60 a-e	0.4000 a	17.00 a-f
FMs1	6.800 a-b	2.400 a-d	1.800 a-b	0.2720 a-d	0.0176 a-e	24.80 a-d	0.2640 a-e	16.60 a-f
FAs1	5.900 a-c	2.200 a-e	1.900 a	0.2760 a-d	0.0171 a-e	26.40 a-c	0.2140 a-f	17.80 a-e
FL e1	6.000 a-c	1.800 a-e	1.400 a-d	0.3080 a-b	0.0188 a-d	26.40 a-c	0.3240 a-c	17.20 a-f
FL e4	6.500 a-b	2.400 a-d	1.900 a	0.3000 a-b	0.0176 a-e	23.80 a-d	0.2620 a-e	19.20 a-c
FL e5	6.500 a-b	3.200 a-b	1.800 a-b	0.3740 a	0.0240 a	29.80 a	0.3500 a-b	17.00 a-f
FL e6	5.875 a-c	2.250 a-e	1.750 a-b	0.2175 a-f	0.0143 a-e	18.50 a-f	0.1900 a-f	16.25 a-f
FL e7	5.800 a-c	2.000 a-e	1.500 a-d	0.1520 b-f	0.0101 a-e	18.40 a-f	0.1180 c-f	15.00 a-f
TS*	2.125 k	1.000 d-e	1.375 a-d	0.0400 f	0.0034 d-e	11.33 e-f	0.0533 e-f	9.33 c-f
SZm1	4.200 c-j	1.400 c-e	1.500 a-d	0.1020 c-f	0.0087 a-e	17.80 b-f	0.1240 c-f	11.20 b-f
SZm2	6.100 a-c	3.200 a-b	1.700 a-c	0.2540 a-e	0.0157 a-e	24.00 a-d	0.2360 a-f	23.20 a
SMs1	6.300 a-c	2.800 a-c	1.800 a-b	0.2860 a-c	0.0198 a-c	25.40 a-d	0.2640 a-e	20.80 a-b
SMs2	3.700 d-k	1.200 d-e	1.500 a-d	0.0940 d-f	0.0060 b-e	11.60 e-f	0.0620 d-f	10.00 b-f

Los tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ).

\*Testigos que emplearon el medio de cultivo para TP=*Pseudomonas*, TA=*Azospirillum*, TF=Fijadoras de nitrógeno de vida libre y TS=Solubilizadoras de fósforo

Tabla 23. Efecto de la inoculación de cepas PGPR sobre plantas de jitomate a los 70 días de desarrollo.

TRATAMIENTO	ALTURA DE LA PARTE AEREA	NUMERO DE HOJAS	DIAMETRO DEL TALLO	PESO FRESCO DE LA PARTE AEREA	PESO SECO DE LA PARTE AEREA	LONGITUD DE LA RAIZ	PESO FRESCO DE LA RAIZ	PESO SECO DE LA RAIZ
TP*	7.125 h	3.500 f	1.875 h	3.955 f	0.0225 e	5.750 e	0.623 g	0.1133 d
PZm2	17.750 g-h	6.750 e-f	3.875 f-h	13.215 e-f	0.7950 d-e	20.125 c-e	13.770 e-g	4.4600 b-d
PMs1	34.667 b-h	10.667 a-e	5.667 b-f	31.997 d-f	2.1933 c-e	26.000 a-e	20.627 d-g	4.0967 b-d
PMs2	56.750 a-c	13.250 a-e	6.125 a-f	71.465 a-f	4.4900 b-e	43.125 a-c	47.275 b-g	6.6825 a-d
PMs3	27.625 c-h	8.750 c-f	5.250 c-f	23.688 e-f	1.4175 d-e	30.500 a-e	17.550 d-g	2.7350 b-d
PMs4	52.625 a-f	14.250 a-c	6.500 a-e	70.460 a-f	5.0750 b-e	40.500 a-c	51.060 b-g	15.2825 a-d
PAAs1	25.800 d-h	7.400 c-f	4.500 d-g	24.572 e-f	1.5240 d-e	20.800 b-e	20.838 d-g	4.0600 b-d
PAAs2	40.167 b-g	12.000 a-e	6.167 a-f	47.653 b-f	3.4600 c-e	27.667 a-e	38.347 c-g	7.4867 a-d
TA*	22.750 f-h	6.500 e-f	3.000 g-h	13.258 e-f	0.9050 d-e	19.000 c-e	14.057 e-g	2.3067 c-d
VS9	44.250 b-g	12.250 a-e	7.000 a-c	66.545 a-f	4.9000 b-e	39.750 a-c	68.768 a-g	16.1725 a-d
AZm1	64.500 a-b	16.000 a-b	7.750 a-c	112.150 a-c	8.8075 a-c	45.750 a-c	92.075 a-d	28.4275 a-d
AZm3	45.750 b-g	13.500 a-e	8.000 a-b	73.273 a-f	5.1775 b-e	42.000 a-c	72.608 a-g	18.3600 a-d
AZm5	59.800 a-b	16.200 a-b	8.100 a-b	121.678 a-b	10.5460 a-b	53.200 a	143.026 a	31.8380 a-b
AMs3	75.750 a	17.250 a	8.250 a	138.800 a	11.8400 a	49.750 a	123.050 a-b	34.2700 a
AAAs1	44.400 b-g	12.200 a-e	7.300 a-c	62.134 b-f	4.4620 b-e	39.400 a-c	67.924 a-g	17.8660 a-d
TF*	25.667 d-h	7.000 d-f	4.333 e-g	13.683 e-f	0.9367 d-e	19.667 c-e	8.620 f-g	1.2967 c-d
S5BE	55.400 a-d	14.400 a-c	6.900 a-d	82.404 a-e	7.2820 a-d	44.200 a-c	92.430 a-d	27.7740 a-d
R2P2B	40.333 b-g	11.667 a-e	6.833 a-d	44.877 c-f	3.1167 c-e	41.333 a-c	54.370 b-g	11.3067 a-d
FZm2	43.400 b-g	11.800 a-e	6.700 a-e	50.620 b-f	4.7760 b-e	44.200 a-c	74.280 a-g	18.9780 a-d
FMs1	55.000 a-d	12.400 a-e	6.600 a-e	64.264 b-f	4.8440 b-e	46.000 a-c	77.164 a-g	20.8740 a-d
FAs1	51.200 a-f	13.600 a-e	7.500 a-c	89.926 a-e	6.5100 a-e	49.200 a	87.208 a-e	22.9560 a-d
FLe1	62.000 a-b	14.400 a-c	7.100 a-c	101.608 a-d	7.6760 a-d	48.600 a	104.546 a-c	35.0140 a
FLe4	48.000 a-f	13.000 a-e	6.700 a-e	68.416 a-f	5.8980 a-e	46.000 a-c	98.888 a-c	30.4380 a-c
FLe5	52.875 a-e	14.500 a-c	7.000 a-c	73.970 a-f	6.6625 a-e	47.750 a-b	100.525 a-c	26.9750 a-d
FLe6	51.600 a-f	12.400 a-e	7.300 a-c	79.332 a-f	7.0360 a-e	43.200 a-c	94.392 a-d	25.9360 a-d
FLe7	45.500 b-g	12.250 a-e	6.250 a-e	57.040 b-f	4.6325 b-e	45.250 a-c	79.660 a-f	22.4800 a-d
TS*	27.000 c-h	8.333 c-f	4.333 e-g	13.240 e-f	1.0867 d-e	13.000 d-e	12.367 e-g	1.8700 c-d
SZm1	28.200 c-h	9.800 b-f	6.000 a-f	27.800 d-f	2.0200 c-e	35.000 a-d	34.646 c-g	6.0800 a-d
SZm2	24.750 e-h	10.000 b-f	6.250 a-e	36.698 c-f	2.4875 c-e	29.875 a-e	37.460 c-g	7.7575 a-d
SMs1	36.750 b-g	11.750 a-e	7.000 a-c	61.600 b-f	3.1000 c-e	37.750 a-d	42.720 c-g	7.2475 a-d
SMs2	51.200 a-f	14.000 a-d	7.600 a-c	79.658 a-f	7.3200 a-d	48.800 a	71.712 a-g	22.3140 a-d

Los tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ).

\*Testigos que emplearon el medio de cultivo para TP=*Pseudomonas*, TA=*Azospirillum*, TF=Fijadoras de nitrógeno de vida libre y TS=Solubilizadoras de fósforo



Por lo que en este bioensayo (B5) se seleccionaron 4 de *Azospirillum* y 3 cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre. Los incrementos respecto al testigo obtenidos con estas cepas se muestran en la Tabla 24.

**Tabla 24.** Incrementos (%) en las variables evaluadas a los 70 días de desarrollo con cepas PGPR.

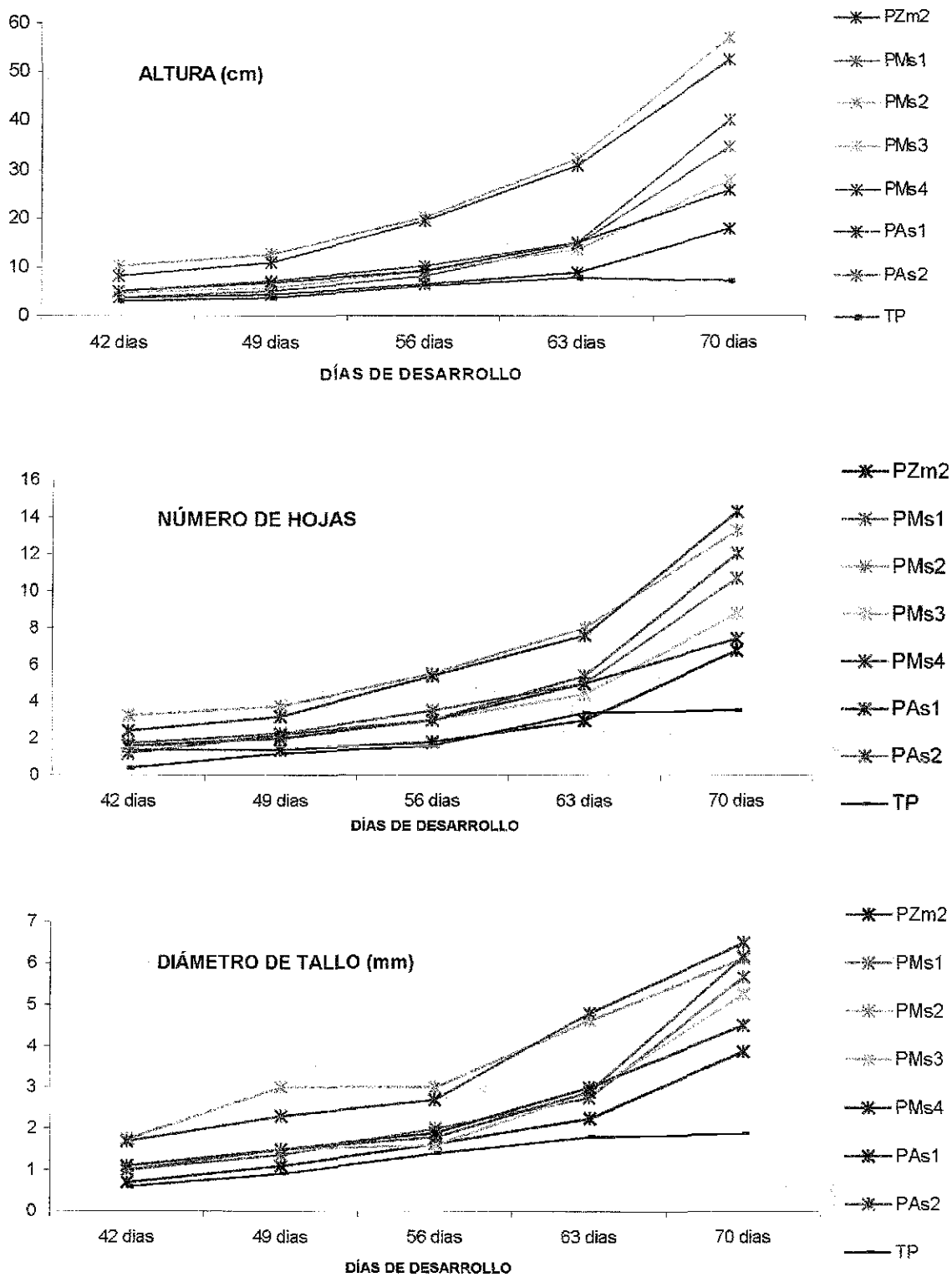
CEPA	ALTURA	NUMERO DE HOJAS	DIÁMETRO DE TALLO	PESO FRESCO DE LA PARTE AÉREA	PESO SECO DE LA PARTE AÉREA	LONGITUD DE LA RAÍZ	PESO FRESCO DE LA RAÍZ	PESO SECO DE LA RAÍZ
VS9	94.51	88.46	133.33	401.94	441.44	109.21	389.22	601.12
AZm1	183.52	146.15	158.33	745.94	873.20	140.79	555.03	1132.41
AZm5	162.86	149.23	170.00	817.81	1065.30	180.00	917.50	1280.26
AMs3	232.97	165.38	175.00	946.95	1208.29	161.84	775.39	1385.69
S5BE	115.84	105.71	59.35	502.22	677.44	124.75	972.27	2041.95
F1c1	141.56	105.71	63.97	642.57	719.50	147.12	1112.83	2600.31
F1c5	106.01	107.14	61.66	440.58	611.30	142.80	1066.18	1980.33

Respecto a las otras cepas los incrementos fueron menos espectaculares, no obstante, los valores registrados siempre resultaron superiores a los registrados en los testigos correspondientes, lo que permitió confirmar los resultados de los bioensayos B1, B2 y B3.

En las Gráficas 4 a 7 se muestran los resultados del seguimiento de 3 variables de crecimiento. En general se observa que, para la mayoría de las cepas, el efecto que se registró a los 35 días se mantuvo a los 42 días y las diferencias entre el testigo y los tratamientos inoculados se hicieron más evidentes a medida que transcurrió el tiempo. En cambio con las cepas AZm3, R2P2B y SZm2 el efecto detectado se desvaneció a través del tiempo.

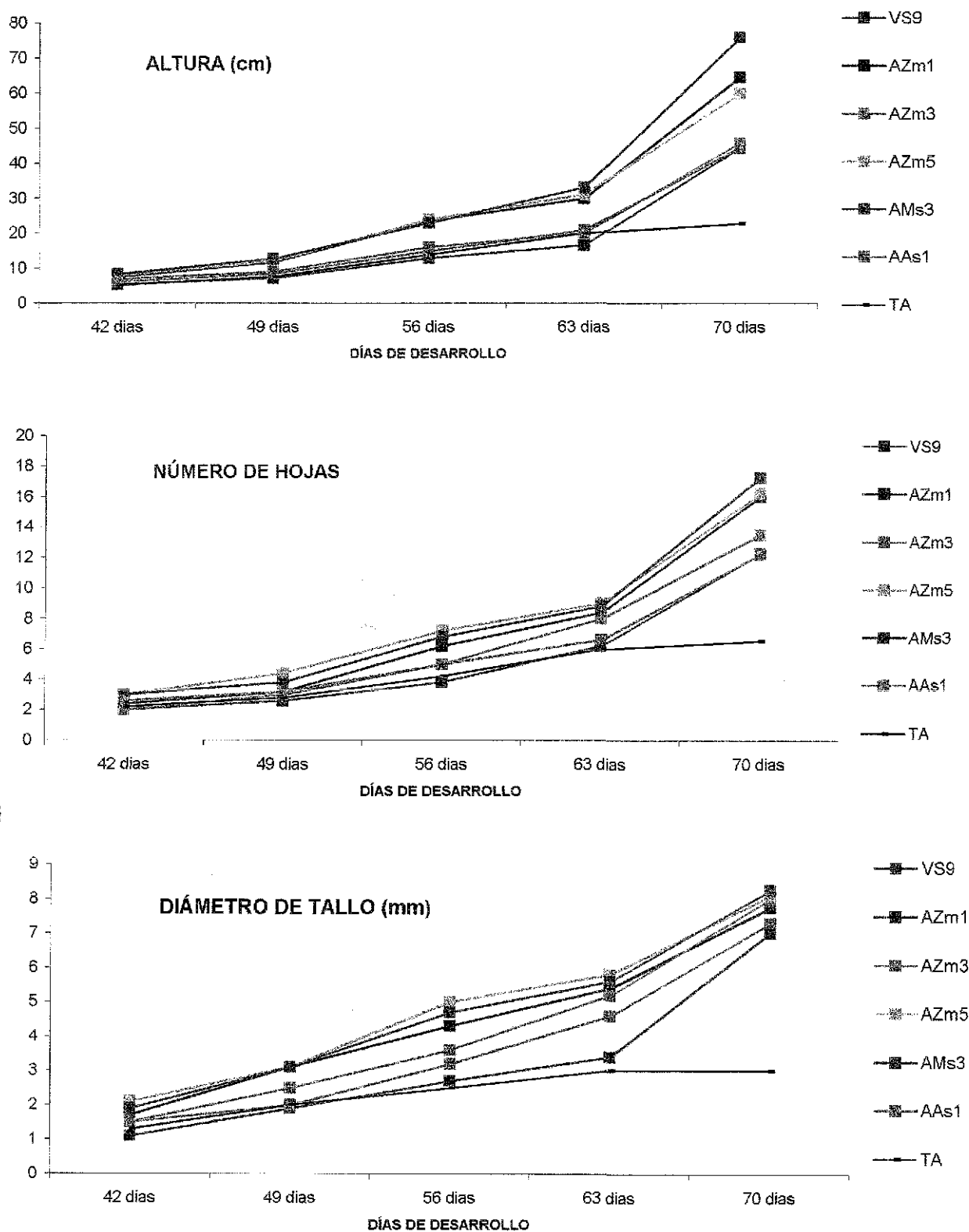
Estos resultados coinciden con lo reportado por Bashan *et al.*, (1996) quienes indican que el efecto observado en plántulas (35 días) permanecen o se desvanecen a través del tiempo.

Es conveniente hacer notar que la mayoría de los reportes respecto a este tipo de estudios corresponden a evaluaciones en plántulas de 30, 35 y 45 días (Conn *et al.*, 1997; de Freitas y Germida, 1991; de Freitas *et al.*, 1993; El-Khawas y Adachi, 1999). Lo anterior indica la importancia de efectuar las evaluaciones en etapas más avanzadas de crecimiento.



TP= Testigo con medio de cultivo King B.

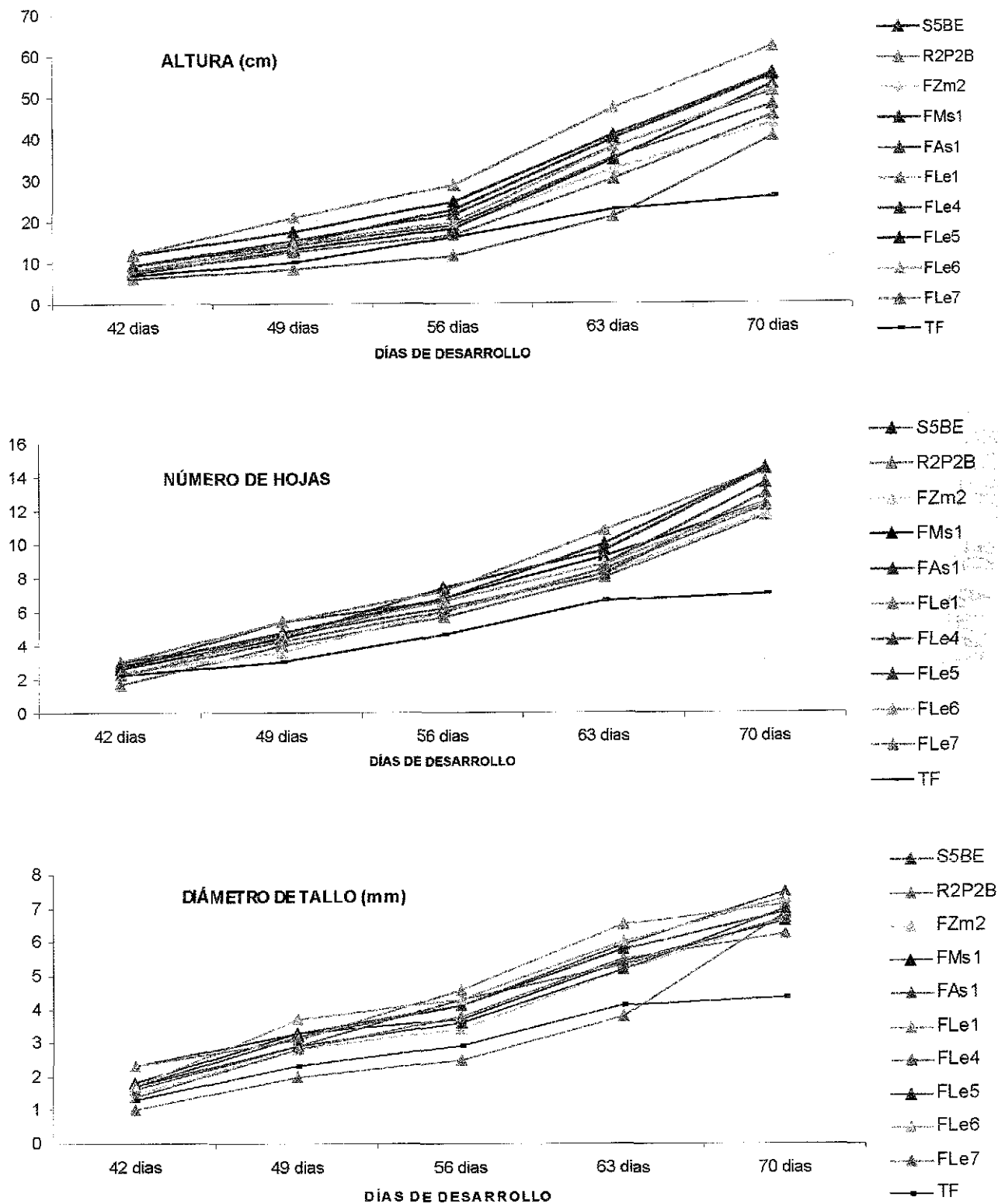
Gráfica 4. Desarrollo de plantas inoculadas con cepas del género *Pseudomonas* a través del tiempo (días).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

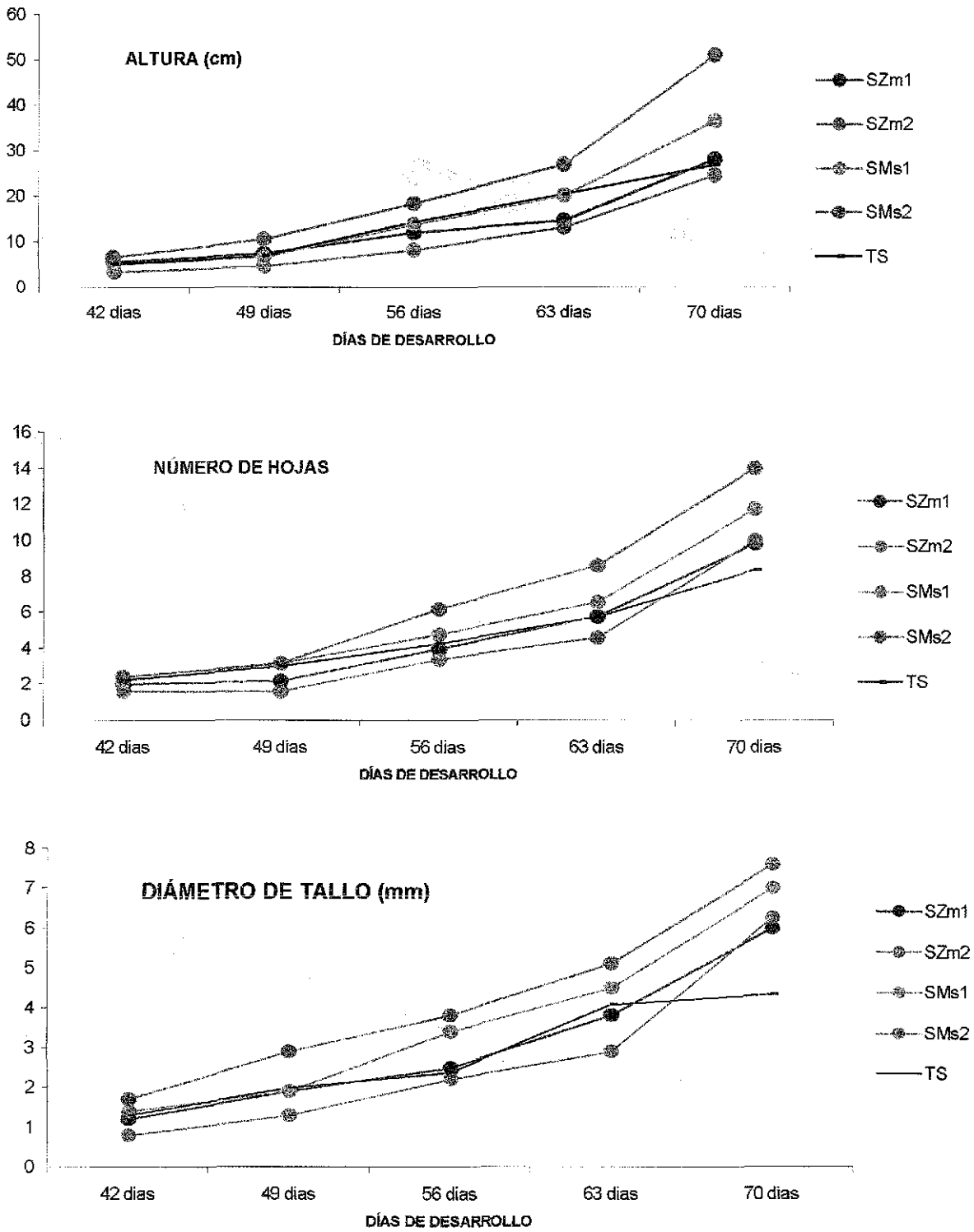
TA=Testigo con medio de cultivo Malato sales (Anexo 2)

Gráfica 5. Desarrollo de plantas inoculadas con cepas del género *Azospirillum* través del tiempo (días).



TF=Testigo con medio de cultivo Lipman

Gráfica 6. Desarrollo de plantas inoculadas con cepas Fijadoras de nitrógeno de vida libre a través del tiempo (días).



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

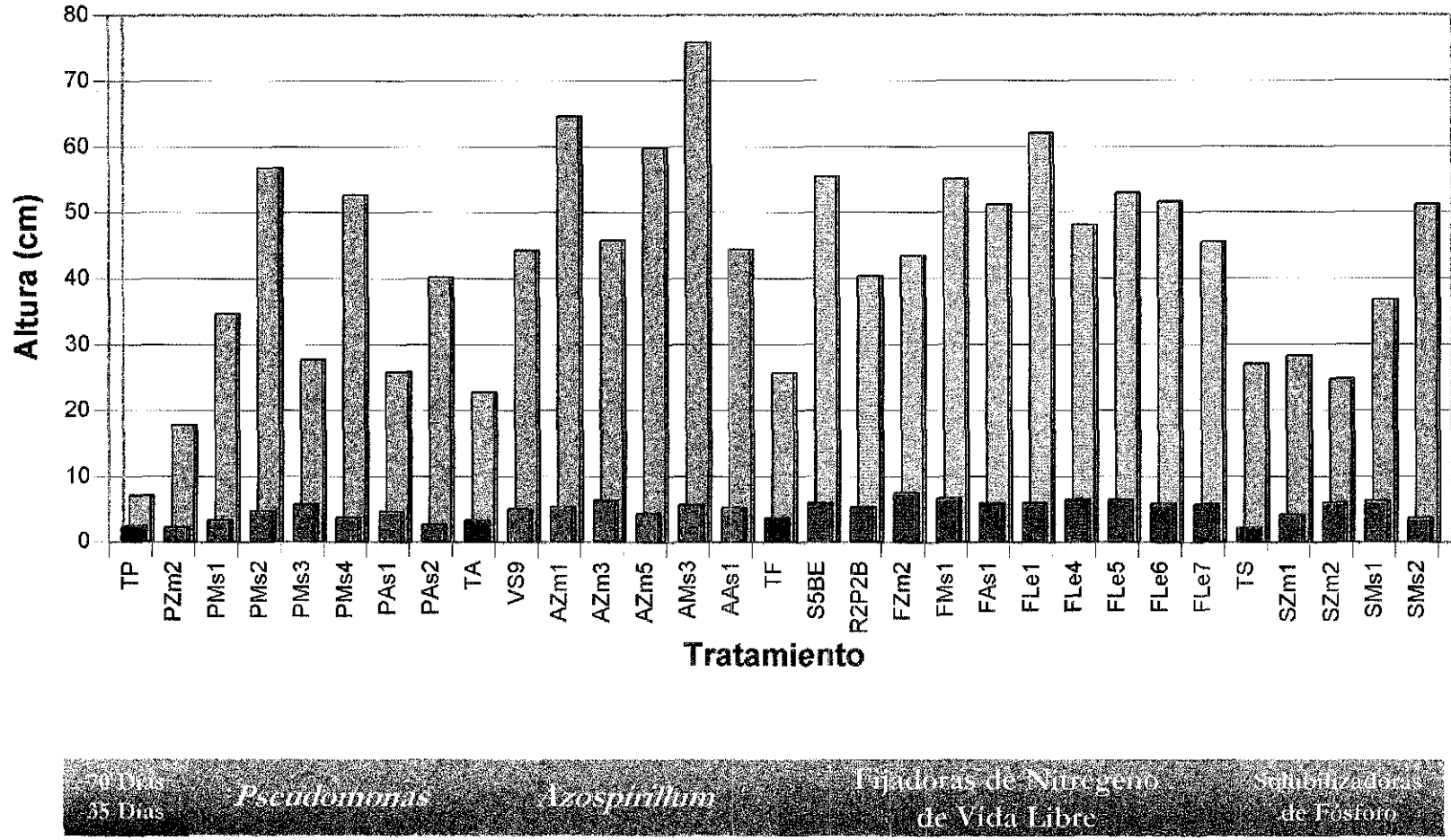
TS=Testigo con medio de cultivo Ramos Callao

Gráfica 7. Desarrollo de plantas inoculadas con cepas Solubilizadoras de fósforo a través del tiempo (días).

En las Gráficas 8 a 15 se muestran los resultados de todas las variables evaluadas, estos permiten una comparación más objetiva de los resultados obtenidos a los 35 y 70 días.

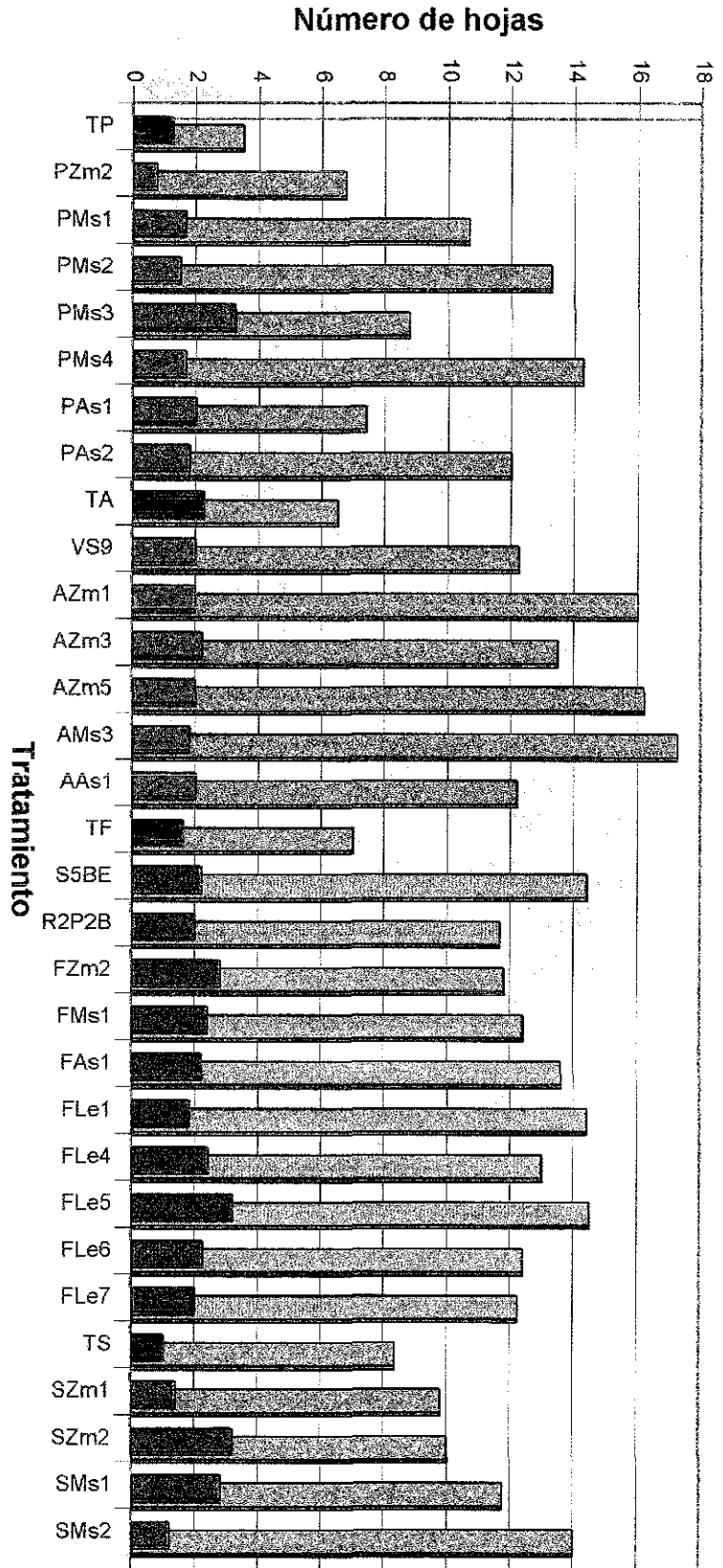
En estas gráficas se observa claramente que respecto a *Pseudomonas*, la cepa PMS3 que mostró el mejor resultado a los 35 días fue una de las que indujo una altura intermedia a los 70 días y fue superada por la PMS2 y PMS4; así mismo, respecto a *Azospirillum*, el efecto de la cepa AZM3 mostrado a los 35 días fue superado por otras cepas. En cuanto a las fijadoras de nitrógeno de vida libre, a los 35 días se observa un desarrollo muy similar, en tanto que a los 70 días sobresalen las cepas S5BE y FLe1; así mismo, en las solubilizadoras de fósforo se tiene que la cepa que en la primera etapa mostró los valores más bajos corresponde a la que se seleccionó a los 70 días.

En las otras variables se observaron respuestas similares.



Gráfica 8. Efecto de la inoculación de PGPR sobre la altura de la parte aérea en plantas de jilomate a 35 y 70 días de desarrollo

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

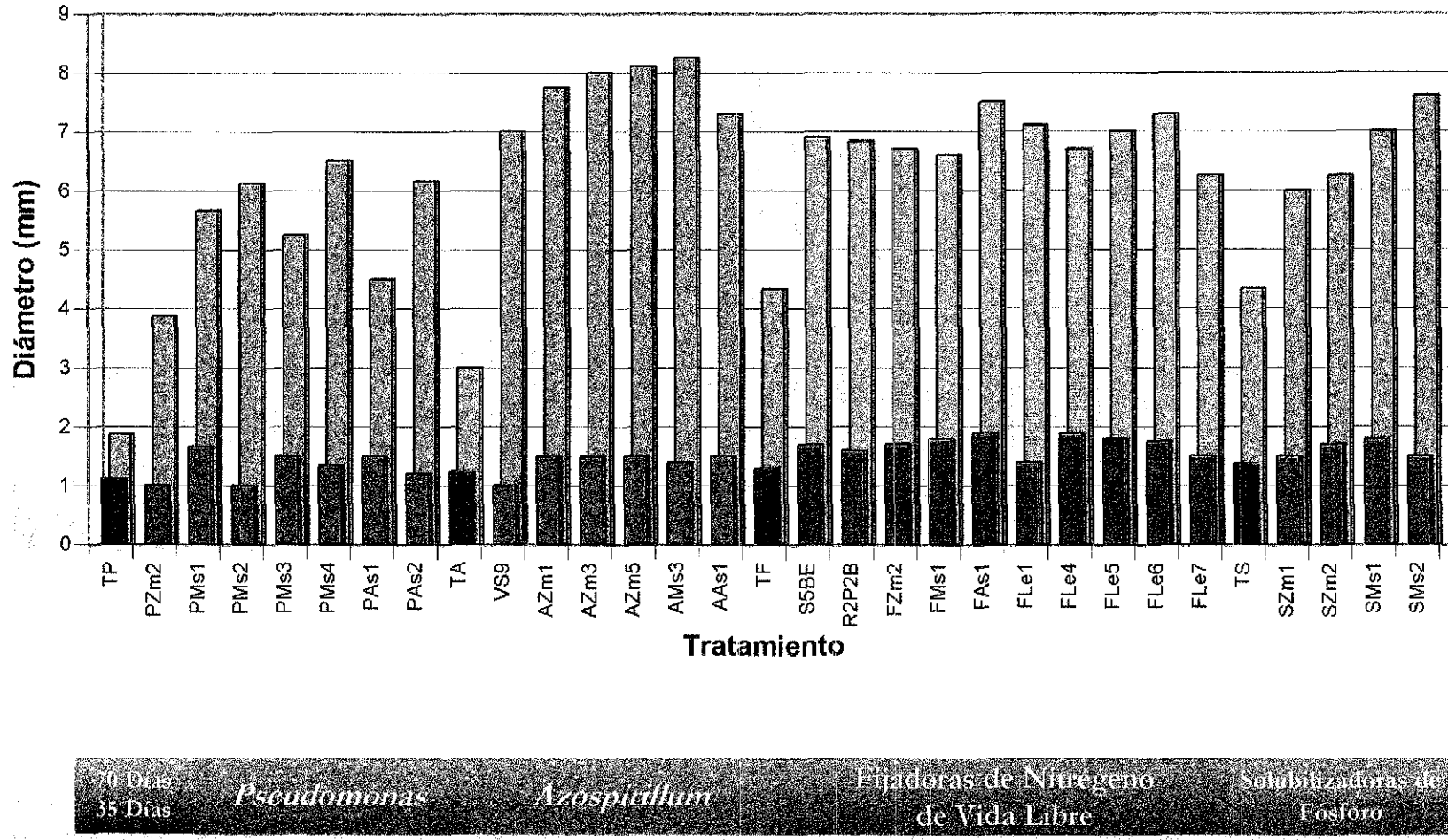


Gráfica 9. Efecto de la inoculación de PGPR sobre el número de hojas en plantas de jitomate a 35 y 70 días de desarrollo.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

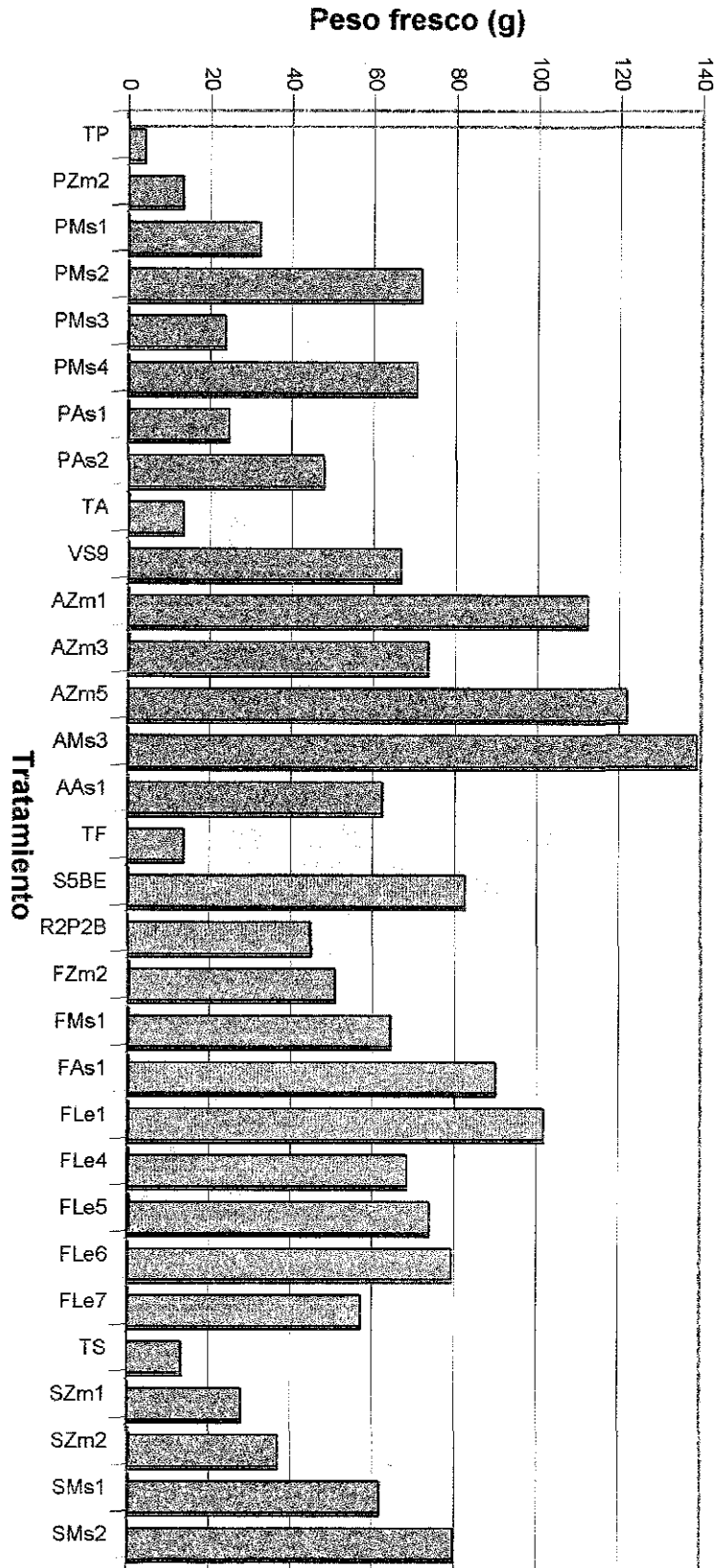




Gráfica 10. Efecto de la inoculación de PGPR sobre el diámetro del tallo en plantas de jitomate a 35 y 70 días de desarrollo.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

2008  
MAY 20 11:44 AM  
BIBLIOTECA

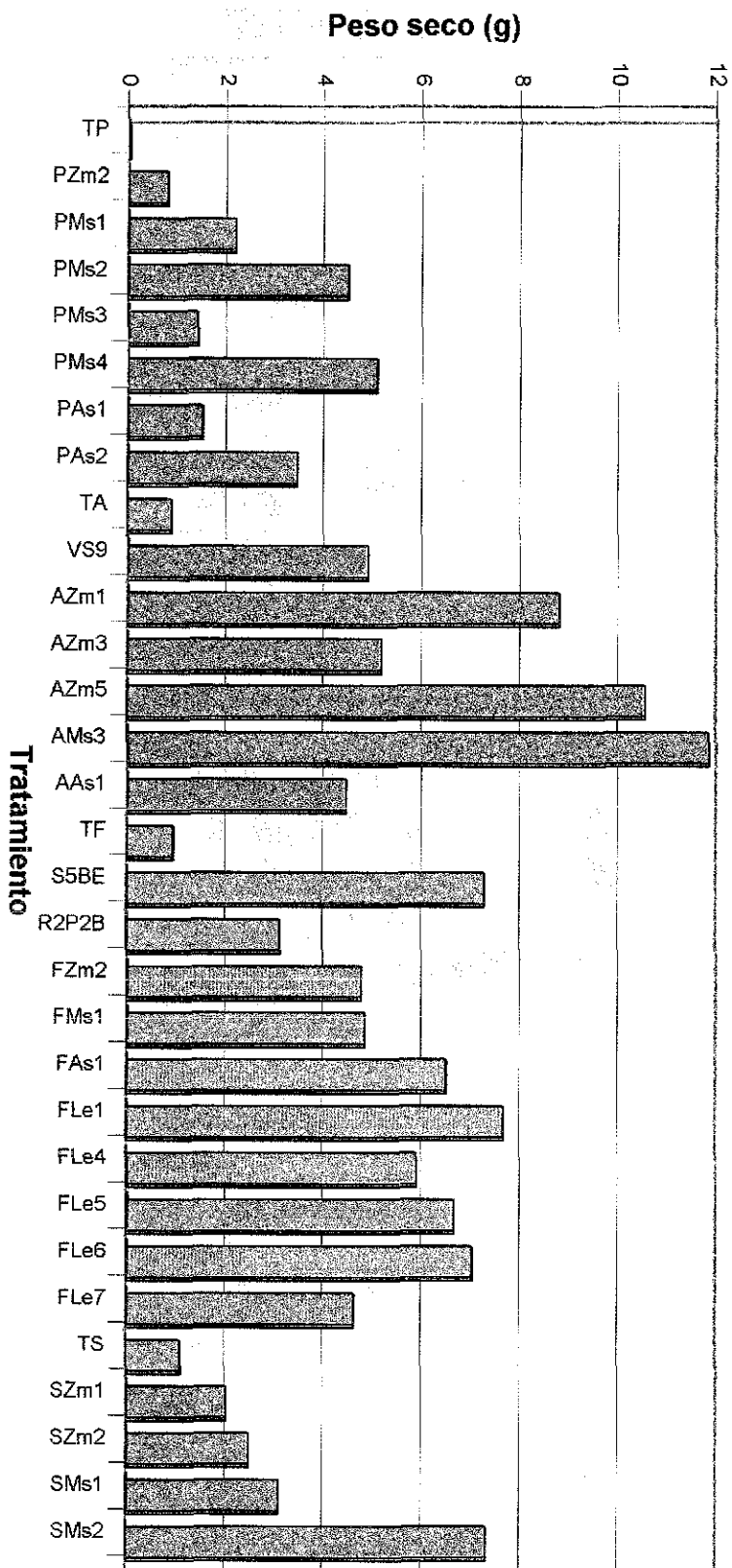


21 Dias  
 35 Dias  
*Pseudomonas*  
*Vesprillum*  
 14 padronas de Nitrógeno  
 de Vida Libre  
 Sulfobacterias  
 de Fosforo

Gráfica 11. Efecto de la inoculación de PGPR sobre el peso fresco de la parte aérea en plantas de jitomate a 35 y 70 días de desarrollo.

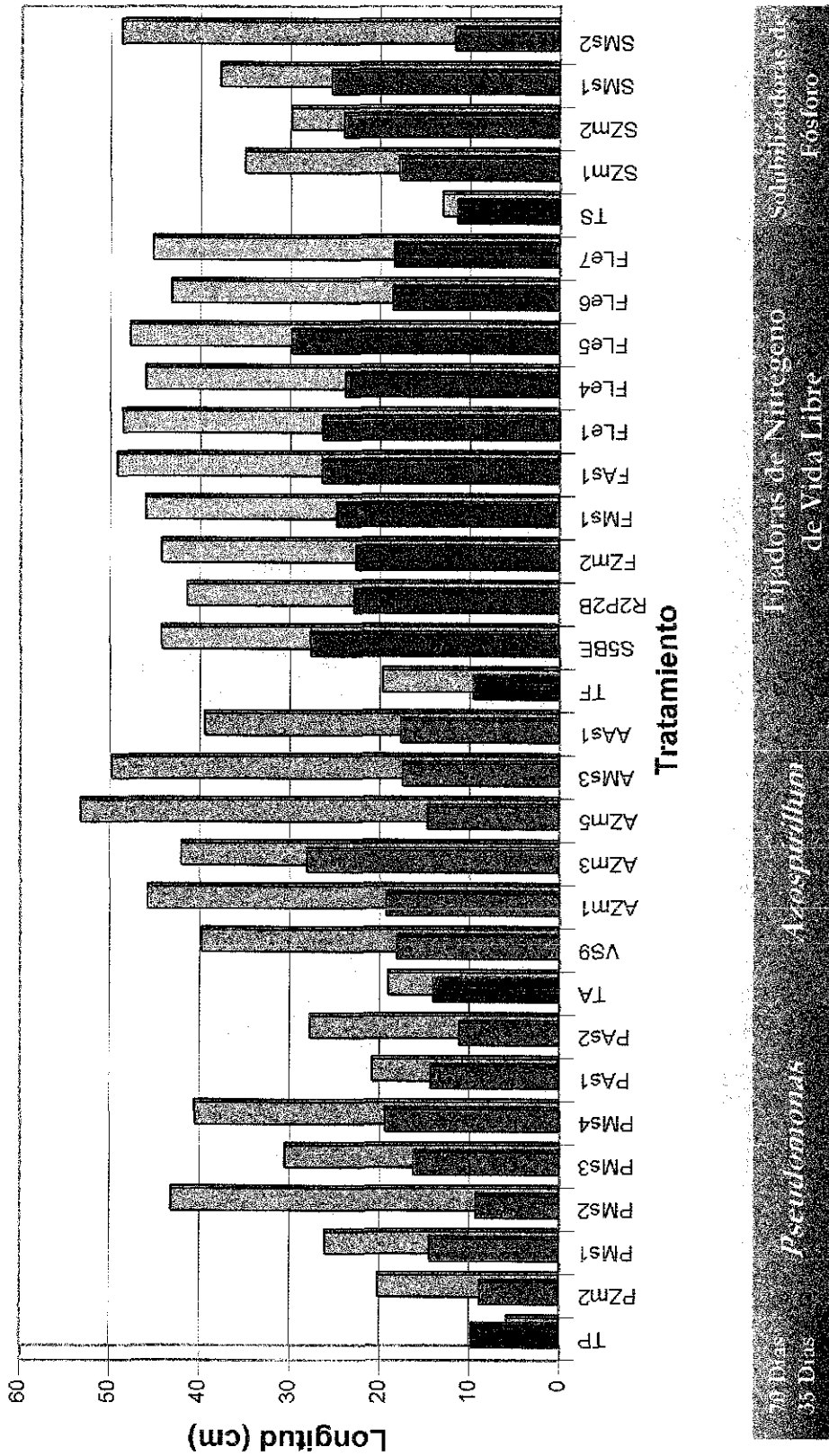
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
 DE CDMX  
 INSTITUTO TECNOLÓGICO  
 DE CDMX

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



Gráfica 12. Efecto de la inoculación de PGPR sobre el peso seco de la parte aérea en plantas de jitamate a 35 y 70 días de desarrollo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



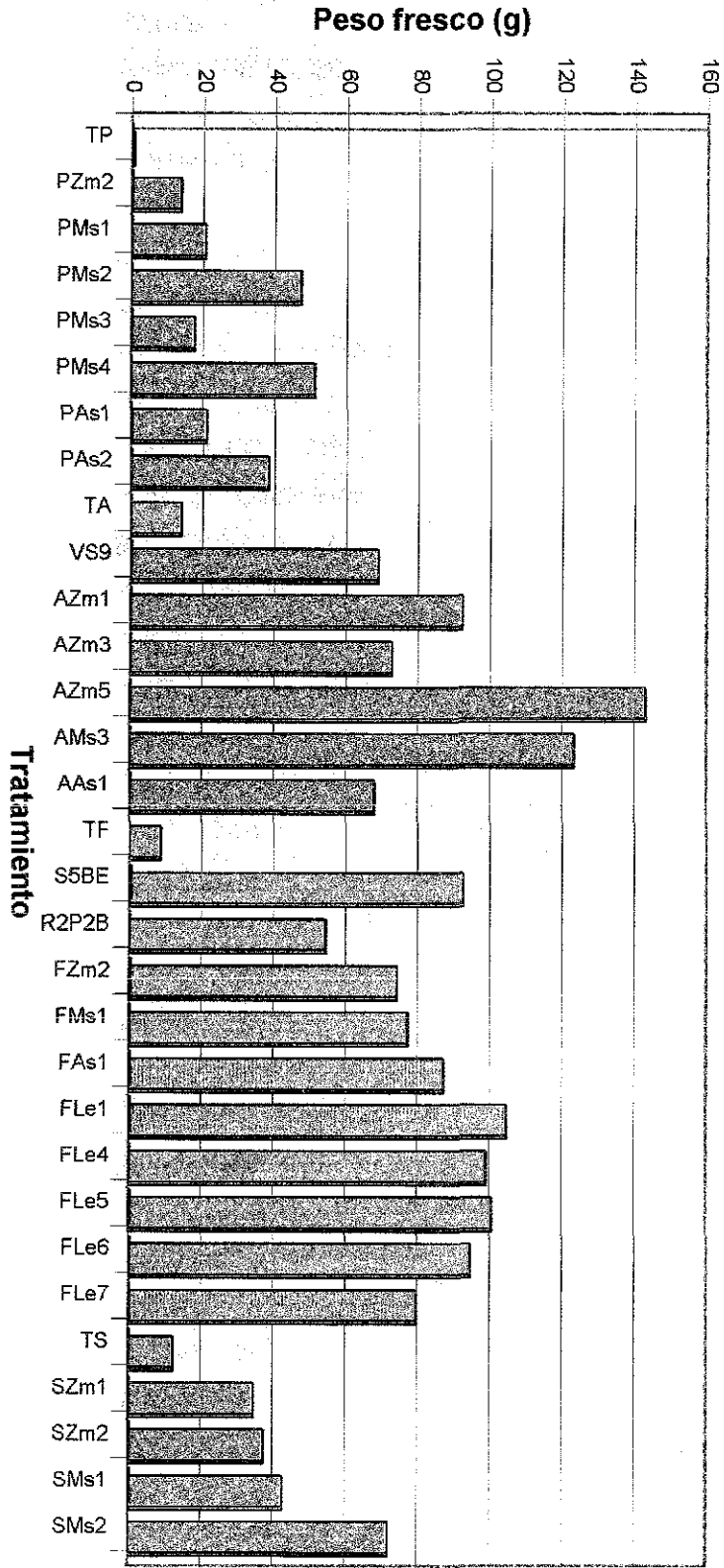
Gráfica 13. Efecto de la inoculación de PGPR sobre la longitud de la raíz en plantas de jitomate a 35 y 70 días de desarrollo.

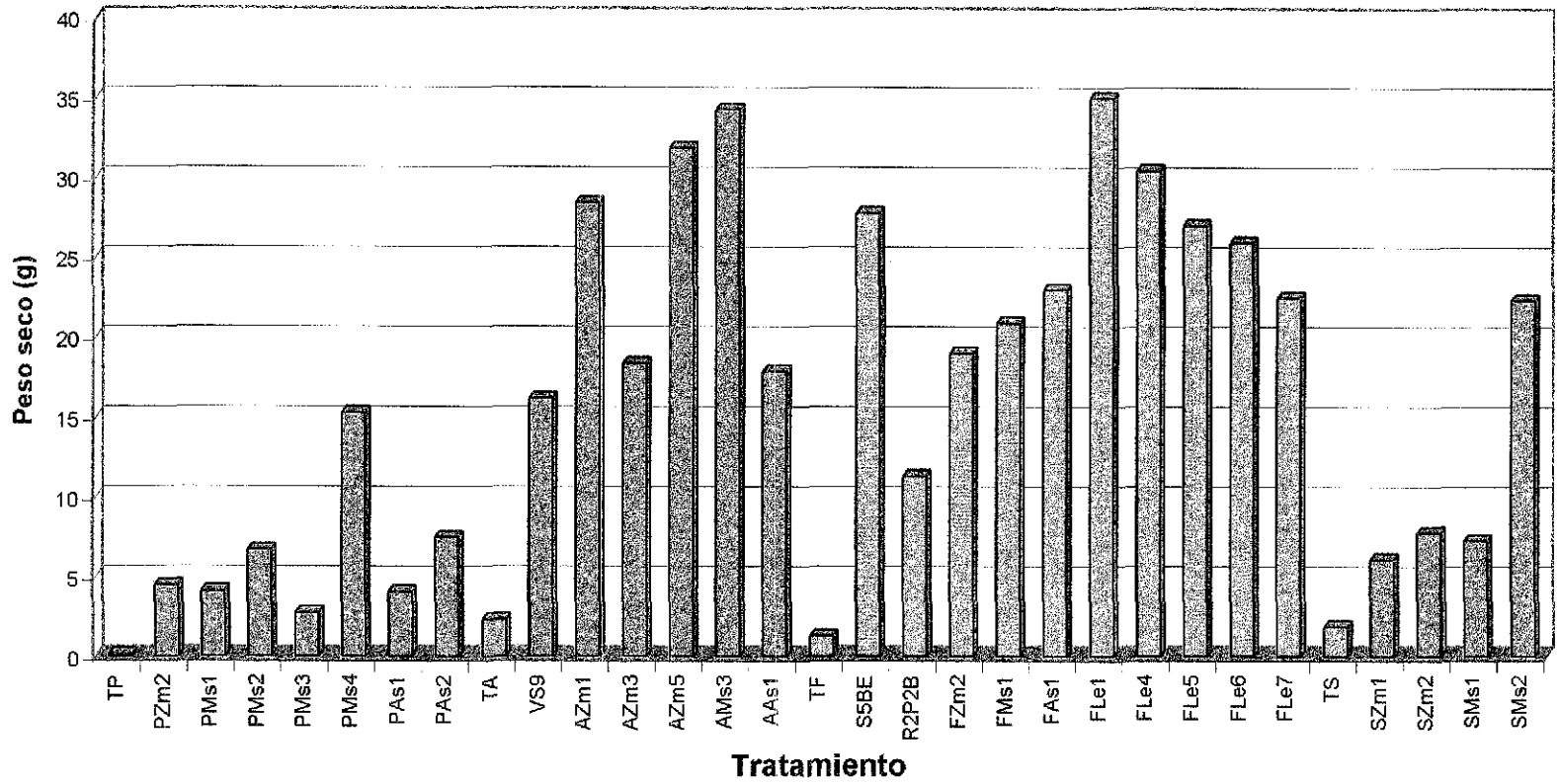
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Gráfica 14. Efecto de la inoculación de PGPR sobre el peso fresco de la raíz en plantas de jitomate a 35 y 70 días de desarrollo.

44 Días  
35 Días  
*Pseudomonas*  
*Azospirillum*  
Estrategias de Nitrógeno  
de Vida Libre  
Simbiontismo  
de Fósforo





Tratamiento	<i>Pseudomonas</i>	<i>Azospirillum</i>	Fijadoras de Nitrógeno de Vida Libre	Substratos de Cebolla
-------------	--------------------	---------------------	--------------------------------------	-----------------------

**Gráfica 15.** Efecto de la inoculación de PGPR sobre el peso seco de la raíz en plantas de jitomate a 70 días de desarrollo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**3.4.4 Bioensayo 6 y cuantificación de fitohormonas por HPLC**

**3.4.4.1 Bioensayo 6 (B6)**

Se probaron tres cepas del género *Azospirillum* (AZm5 y AMs3) y una fijadora de nitrógeno de vida libre (FLe1), las cuales promovieron el crecimiento del jitomate a 70 días de desarrollo en todas las variables evaluadas.

Análisis físicos y químicos del suelo. El suelo presentó alta pedregosidad con rocas calizas, las cuales tuvieron fuerte reacción al HCl (10%). En la Tabla 25, se presentan los resultados de los análisis físicos y químicos del suelo, en donde la textura presentó una proporción de arena, limo y arcilla de 79.28%, 14.24% y 6.48% respectivamente, lo que nos indica un suelo bien aireado, como se corrobora con los datos de porosidad (51%). Según Gaucher (1971) valores de D.R. entre 2.35 y 2.45 corresponden a suelos de tipo calcáreo. El pH resultó ligeramente alcalino, pero óptimo para el cultivo de jitomate en el tipo de textura registrado; por otra parte, coincide con la característica calcárea del suelo (Jackson, 1976). La cantidad de nitrógeno corresponde a la proporción de materia orgánica registrada, la cual fue alta (Fassbender y Bornemisza, 1987). No así la de fósforo, según Ortiz-Villanueva (1977) la disponibilidad de fósforo (P) para la planta, particularmente en suelos calcáreos es baja, ya que a pH's de 7.5 a 8.5 mucho del P inorgánico está como fosfato octacálcico, no aprovechable para la planta.

**Tabla 25.** Análisis físicos y químicos del suelo de Alfajayucan, Hidalgo.

ANÁLISIS	RESULTADOS
Reacción al HCl (10%)	+++
Color	Seco 7.5 YR 5/2 Húmedo 10YR 2/2
Textura	Arena Migajonosa
Densidad aparente (D.A.)	1.15 g/ cc
Densidad real (D.R.)	2.35 g/ cc
Porosidad (P)	51 %
pH (suelo:agua, 1:2.5)	7.80
pH (suelo:CaCl <sub>2</sub> 0.05M, 1:2)	6.85
Materia orgánica (M.O.)	2.15
Nitrógeno total (NT)	0.1010%
Fósforo total (P <sub>T</sub> )	<0.5 ppm
Na <sup>+</sup>	0.1795 g/g suelo
K <sup>+</sup>	0.1837 g/g suelo
Ca <sup>++</sup>	26.67 meq/g suelo
Mg <sup>++</sup>	4.26 meq/ g suelo

Control de calidad de los inóculos. En la Tabla 26 se observa que con el ajuste a la absorbancia de los diferentes inóculos, se lograron poblaciones viables por mL de inóculo, similares a las obtenidas en los B4 y B5; concentraciones que fueron suficientes para lograr la infección en plántulas de *Lycopersicon esculentum*, lo que se demostró a los 35 días de desarrollo.

**Tabla 26.** Número de bacterias presentes en el inóculo inicial y adheridas a semillas en cepas seleccionadas.

CEPA	A(560)	UFC/mL INÓCULO	UFC/SEMILLA
AZm5	0.011	$7 \times 10^6$	$2 \times 10^5$
AMs3	0.010	$1 \times 10^7$	$2 \times 10^5$
FLe1	0.031	$1 \times 10^6$	$3 \times 10^4$

Fertilización. La dosis empleada se estableció de acuerdo con el método de Morgan y corresponde a: 177.6 Kg urea/ha, 261.6 Kg superfosfato triple/ha y 96 Kg cloruro de potasio/ha, la cual se recomienda para suelos con bajos niveles de N y P, y medio de K, niveles que corresponden para el suelo en estudio.

Efecto de la inoculación de cepas PGPR a diferentes días de desarrollo en plantas de jitomate. La germinación fue ligeramente inhibida por dos de las cepas y por la fertilización completa. Respecto a las otras variables evaluadas no existen DES en ninguno de ellos, lo que invita a pensar que los nutrientes proporcionados a cada tratamiento son los suficientes para esta etapa de desarrollo (vegetativa) del jitomate; no obstante lo anterior, el tratamiento FM presenta en la mayoría de las variables (a excepción de la altura) valores ligeramente inferiores (Tabla 27).

**Tabla 27.** Efecto de la inoculación de cepas PGPR en el desarrollo de la parte aérea de plantas de jitomate a 70 días de desarrollo.

TRATAMIENTO	% GERMINACIÓN (6 DÍAS)	ALTURA (cm)	NÚMERO DE HOJAS	DIÁMETRO DE TALLO (mm)	% RACIMOS FLORALES *
AZm5+ FM	86.66	29.45	10.10	5.90	50
AMs3+ FM	80	29.65	10.50	6.30	70
FLe1+FM	100	26.40	10.31	6.00	70
TFM	100	27.89	10.00	5.78	30
TFC	80	27.60	10.80	6.20	90

\* Las 10 plantas de tratamiento representaron el 100%.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



En cuanto a la aparición de racimos florales (Tabla 28), sólo se presentaron DES a los 98 días, en donde el mejor tratamiento corresponde a FLe1. El comportamiento de las plantas cambió a través del tiempo en todas las variables evaluadas.

**Tabla 28.** Efecto de la inoculación de cepas PGPR en la aparición de flores en plantas de jitomate a diferentes días de desarrollo.

TRATAMIENTO	NÚMERO DE FLORES		
	98 DÍAS	120 DÍAS	134 DÍAS
AZm5+ FM	1.44 b	4.30	11.60
AMs3+ FM	2.50 b	6.00	10.90
FLe1+FM	5.44 a	6.11	9.55
TFM	3.66 ab	5.11	11.88
TFC	3.40 ab	6.90	11.30

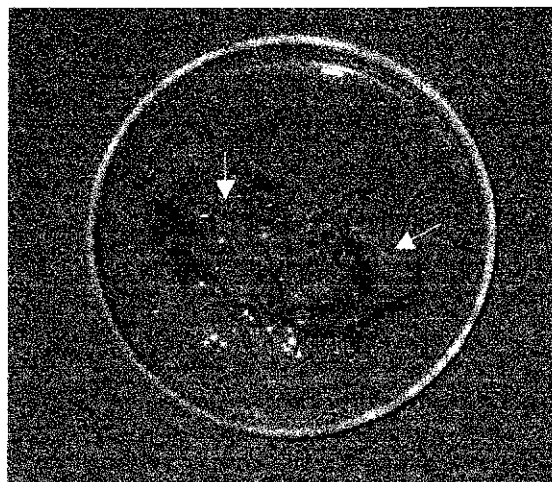
En tanto que, respecto a la aparición de frutos, el mejor tratamiento corresponde a la fertilización completa y en un segundo grupo, a los tres tratamientos inoculados, los que aún cuando no alcanzaron la cantidad de frutos del TFC, son superiores a los de la fertilización media, a la que superaron de un 42 a 77% (Tabla 29).

**Tabla 29.** Efecto de la inoculación de cepas PGPR en la formación de frutos en plantas de jitomate a diferentes días de desarrollo.

TRATAMIENTO	NÚMERO DE FRUTOS	
	120 DÍAS	134 DÍAS
Azm5+FM	2.50 ab	4.10 ab
AMs3+FM	2.00 ab	4.90 ab
Fle1+FM	3.70 a	5.10 ab
TFM	0.22 b	2.88 b
TFC	3.70 a	6.40 a

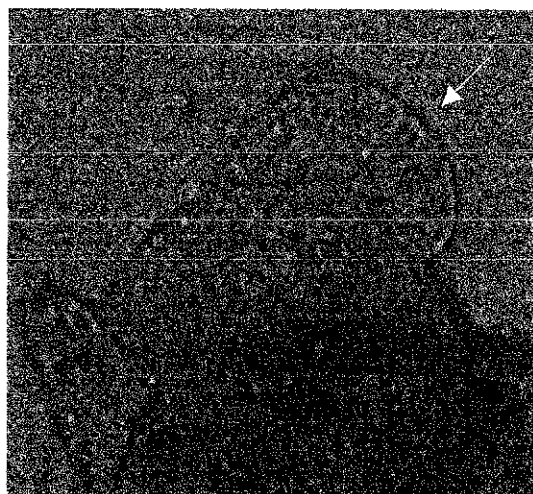
Los tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ). Anexo 5.

Es conveniente aclarar que, a los 98 días de desarrollo durante el riego, se tiró una maceta, dejando al descubierto las raíces, accidente que permitió descubrir agallas a lo largo de éstas (Fig. 9), por lo que se procedió a realizar un muestreo cuidadoso de las raíces, al menos en tres repeticiones por tratamiento confirmándose así, la presencia de agallas en todos y, además, mediante observaciones al microscopio (Fig. 10) se observó que eran causadas por nemátodos.

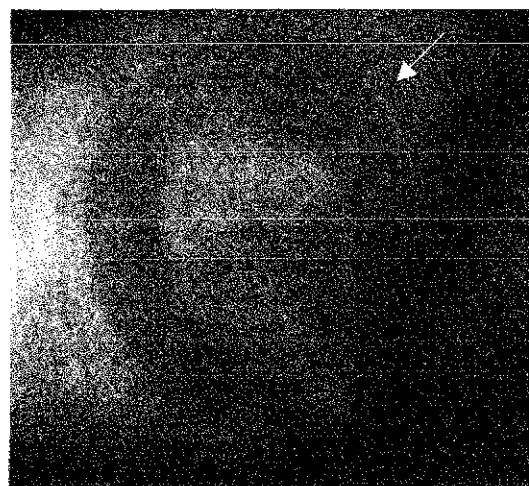


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 9.** Raíces de jitomate (98 días de desarrollo) con agallas (señaladas por flecha)  
Observación a simple vista.



a)



b)

**Figura 10.** Nemátodos (señalados con flecha) en raíces de jitomate (98 días de desarrollo)  
vistas con microscopio óptico (40x). a) Fuera del tejido de la raíz b) Dentro del tejido de la raíz

Aún cuando se estuvo consiente de que estos organismos disminuyen la funcionalidad de las plantas y favorecen la invasión de otros organismos, provocando marchitez y muerte, se decidió llevar el experimento hasta producción.

Dado lo anterior, el rendimiento obtenido por los tratamientos inoculados y no inoculados (Tabla 30), resultó por debajo a lo reportado para la variedad Lucas en otros estudios con suelo (Urzúa, 2001).

**Tabla 30.** Efecto de la inoculación de cepas PGPR en la producción de frutos (kg) en plantas de jitomate después de cinco cortes consecutivos.

TRATAMIENTO	PRODUCCIÓN (kg/planta)
AZm5+FM	0.227 ab
AMs3+FM	0.237 ab
FLe1+FM	0.346 a
TFM	0.173 b
TFC	0.246 ab

Los tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ )

Anexo 5

La Tabla 30 muestra que a un nivel de significancia de 0.05 se encontraron DES; el mejor rendimiento se obtuvo con el tratamiento FLe1+FM, respecto a TFM; en tanto que, con las otras dos cepas, el rendimiento fue similar al obtenido con la fertilización completa, lo que indica la posibilidad de disminuir las dosis de fertilizantes químicos.

Considerando los resultados de producción, en los que se observa el efecto benéfico de las bacterias inoculadas, a pesar de la infección por nemátodos, es conveniente confirmar estos resultados con otros experimentos.

#### 3.4.4.2. Cuantificación de fitohormonas (ácido indol-3-acético y giberelinas) por HPLC.

Estándares de ácido indol-3-acético y ácido giberélico. El tiempo de retención para el ácido indol-3 acético (AIA) fue de 15.28. Los tiempos de retención del ácido giberélico (AG) entre 24.54 y 28.07 (Anexo 3), ya que el reactivo empleado fue una mezcla de compuestos giberélicos.

Cuantificación de fitohormonas en cepas PGPR. En esta determinación se incluyeron 12 cepas: 10 seleccionadas en los tres primeros bioensayos, los cuales se eligieron al azar y dos que se emplearon como controles negativos, que corresponden a las que no indujeron la promoción del desarrollo vegetal.

En la Tabla 31 se presentan los resultados de la producción de fitohormonas, en ésta se observa que sólo dos produjeron AIA y AG. Los valores obtenidos con la cepa VS9 son muy similares a los indicados por Hernández (1997), quién reportó 43.4 µg de AIA/mL de cultivo y 91.5 µg de AIA/mL medio de cultivo; y sólo tres cepas produjeron giberelinas *in vitro*. En tanto que en las demás no se detectó a ninguna de las fitohormonas.

**Tabla 31.** Cuantificación de fitohormonas (ácido indol-3-acético y giberelinas) por HPLC

GRUPO BACTERIANO	CEPA	A.I.A. (µg/mL medio de cultivo)	A.G. (µg/mL medio de cultivo)
<i>Pseudomonas</i>	PZm2	0	0
	PAs1	0	0
<i>Azospirillum</i>	VS9	41.77	76.11
	AZm5	0	62.74
	AMs3	4.08	57.17
Fijadoras de nitrógeno de vida libre	R2P2B	0	0
	S5BF	0	0
	FLe1	0	0
	FLc4	0	0
Solubilizadores de fósforo	SZm1	0	0
	SMs1	0	0
	SMs2	0	0

Es conveniente aclarar que las cepas AZm5 y AMs3 tuvieron un comportamiento constante a través de todos los bioensayos en donde, además, se detectó la presencia de al menos una de las fitohormonas en estudio, resultados que coinciden con lo reportado por Bashan y Holguin, 1997; Crozier, *et al.*, 1988 y Tien *et al.*, 1979.

En tanto que la cepa AMs3, aún cuando produjo cantidades reducidas de AIA dio lugar a un nivel elevado de AG; y su comportamiento fue constante a través de todos los bioensayos. Así mismo los resultados de los bioensayos y producción de giberelinas obtenidos con la cepa AZm5 coinciden con lo reportado en la literatura (Bashan y Holguin, 1997; Cacciari *et al.*, 1989; Castillo y Martínez, 1997; Crozier, *et al.*, 1988; Tien *et al.*, 1979).

Por otro lado, Ross y O'Neill (2001) señalan que la producción de giberelinas en plantas a menudo es favorecida por la presencia de auxinas.

Respecto a las otras 7 cepas seleccionadas por su capacidad para promover el desarrollo, se tiene que en ninguna se registró la producción de fitohormonas, por lo que su efecto pudo estar dado por otro mecanismo o por otros compuestos de naturaleza indólica con actividad biológica como indol-3-etanol, indol-3-metanol, ácido-3-indol láctico y ácido-3-indol butírico (Bric *et al.*, 1991; Crozier *et al.*, 1998; Olyunina y Shabaev, 1996; Tien *et al.*, 1979).

A este respecto Hartmann *et al.*, (1983) afirman que el indol-lactato, indolacetaldehído e indolacetamida, reaccionan positivamente al reactivo de Salkowski, ya que mediante la prueba de Gordon y Weber se detectaron concentraciones elevadas de compuestos indólicos en los cultivos de las cepas en estudio, o bien, a interferencias de los componentes de los diferentes medios de cultivo o a un tiempo de incubación inadecuado. Con relación al primer aspecto se tiene, que para cada grupo se emplearon medios de cultivo diferentes, y que las peptonas contenidas en el medio King B interfirieron con el registro de picos, mientras que, respecto al segundo punto se deben considerar la edad y condiciones del cultivo, la ausencia o presencia de algún nutrimento esencial que influyen grandemente en el metabolismo de los microorganismos o, a los procesos de extracción y técnicas de cuantificación para este tipo de sustancias.

Por otro lado, también es posible que estos compuestos no se estén produciendo *in vitro* pero sí *in situ* como señala Benizri *et al.*, (1998) y Costacurta *et al.*, (1998), quienes reportan que exudados de raíz de maíz son capaces de estimular la producción de auxinas por bacterias del género *Pseudomonas*.

### 3.5 IDENTIFICACIÓN DE RIZOBACTERIAS SELECCIONADAS

#### 3.5.1 Caracterización primaria de PGPR del género *Pseudomonas*

Las características microscópicas que presentaron las 7 cepas empleadas en los B4 y B5, desarrolladas en Medio King B, correspondieron a aquellas descritas para el género *Pseudomonas*: Bacilos Gram negativo, móviles y de extremos redondeados (Holt, *et al.*, 1994). En las Tablas 32 y 33 se observa que dichas cepas al ser cultivadas en Gelosa Nutritiva y Agar Cetrimida mostraron características muy similares.

El desarrollo de pigmentos fluorescentes amarilloverdosos (fluoresceína) son característicos de *P. fluorescens* (Brock y Madigan, 1993); típico de las cepas en estudio.

**Tabla 32.** Características coloniales de cepas de *Pseudomonas*, en cultivos de 48 horas desarrolladas en *Gelosa Nutritiva*.

CEPA	COLOR	FORMA	ASPECTO	BORDE	ELEVACIÓN	DIFUSIÓN DE PIGMENTOS
PZm2	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No
PMs1	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No
PMs2	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No
PMs3	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No
PMs4	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No
PAAs1	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No
PAAs2	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No

**Tabla 33.** Características coloniales de cepas de *Pseudomonas*, en cultivos de 48 horas desarrolladas en *Agar Cetrimida\**.

CEPA	COLOR	FORMA	ASPECTO	BORDE	ELEVACIÓN	DIFUSIÓN DE PIGMENTOS**
PZm2	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	amarillo anaranjado
PMs1	Blanca	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	amarillo verdoso
PMs2	Amarilla	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	amarillo verdoso
PMs3	Verdosa	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	amarillo verdoso
PMs4	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	amarillo verdoso
PAAs1	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	amarillo anaranjado
PAAs2	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	amarillo verdoso

\*Anexo 2 \*\*Pigmentos fluorescentes.

**Tabla 34.** Reacción de la oxidasa en cepas de *Pseudomonas*.

PZm2	PMs1	PMs2	PMs3	PMs4	PAAs1	PAAs2
+	+	+	+	+	+	+

### 3.5.2 Caracterización primaria de PGPR del género *Azospirillum*

En todas las cepas se observó un microorganismo bacilar Gram negativo; también se obtuvo un desarrollo típico de *Azospirillum* en el medio Nfb semisólido que corresponde a la alcalinización del medio con la formación de una película blanca de 2mm debajo de la superficie.

La movilidad se verificó con una tinción en fresco, a partir del medio antes mencionado, en el cual se observó un microorganismo vibroide y con movimientos rotatorios sobre su mismo eje, característico en bacterias del género *Azospirillum* (Döbereiner y Day, 1976; Tarrand *et al.*, 1978), así como gránulos de poli-β-hidroxibutirato.

**Tabla 35.** Características coloniales de cepas de *Azospirillum*, en cultivos de 72 horas desarrolladas en Gelosa Nutritiva.

CEPA	COLOR	FORMA	ASPECTO	BORDE	ELEVACIÓN
VS9	Crema	Circular	Seco	Ondulado	Círculos concéntricos
AZm1	Crema	Circular	Seco	Lobulado	Círculos concéntricos
AZm3	Beige	Circular	Seco	Ondulado	Círculos concéntricos
AZm5	Crema	Circular	Seco	Ondulado	Círculos concéntricos
AMs3	Crema	Circular	Seco	Lobulado	Círculos concéntricos
AAAs1	Amarillenta	Circular	Seco	Lobulado	Círculos concéntricos

**Tabla 36.** Características coloniales de cepas de *Azospirillum* en cultivos de 5 días desarrolladas en Agar Rojo Congo\*.

CEPA	COLOR	FORMA	ASPECTO	BORDE	ELEVACIÓN
VS9	Rojo	Circular	Seco	Ondulado	Círculos concéntricos
AZm1	Rojo	Circular	Seco	Lobulado	Círculos concéntricos
AZm3	Rojo	Circular	Seco	Ondulado	Círculos concéntricos
AZm5	Rojo	Circular	Seco	Lobulado	Círculos concéntricos
AMs3	Rojo	Circular	Seco	Lobulado	Círculos concéntricos
AAAs1	Rojo	Circular	Seco	Lobulado	Círculos concéntricos

\*Anexo 2

**Tabla 37.** Características coloniales de cepas de *Azospirillum* en cultivos de 5 días desarrolladas en Agar Papa Dextrosa\*.

CEPA	COLOR	FORMA	ASPECTO	BORDE	ELEVACIÓN
VS9	Rosa	Circular	Seco	Ondulado	Círculos concéntricos
AZm1	Rosa	Circular	Seco	Ondulado	Círculos concéntricos
AZm3	Rosa	Circular	Seco	Ondulado	Círculos concéntricos
AZm5	Rosa	Circular	Seco	Ondulado	Círculos concéntricos
AMs3	Rosa	Circular	Seco	Ondulado	Círculos concéntricos
AAAs1	Rosa	Circular	Seco	Lobulado	Círculos concéntricos

\*Anexo 2

**Tabla 38.** Reacción de la oxidasa en cepas de *Azospirillum*.

VS9	AZm1	AZm3	AZm5	AMs3	AAAs1
+	+	+	+	+	+

Las cepas AZm3, AZm5 y AAAs1 requirieron biotina (0.1%) como factor de crecimiento para su desarrollo; por lo que presuntivamente se trate de la especie *lipoferum*, mientras que las cepas AZm1 y AMs3 no la requirieron; lo anterior de acuerdo con Tarrand, *et al.* (1978).

3.5.3 Caracterización primaria de PGPR fijadoras de nitrógeno de vida libre

Todas las cepas se manifestaron como fijadoras de nitrógeno, al crecer abundantemente en medios de cultivo carentes de una fuente de nitrógeno (Waskman 77 y Lipman) bajo condiciones aeróbicas. Los principales géneros conocidos como microorganismos del suelo fijadores de nitrógeno de vida libre son Gram negativos: *Azospirillum*, *Azotobacter* (los más conocidos), *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Derxia* (Brock y Madigan, 1993) y algunas enterobacterias como *Klebsiella* y *Escherichia*.

Sin embargo, ninguna de las cepas en cuestión presentaron la movilidad típica de *Azospirillum*, tampoco presentaron la morfología típica de *Azotobacter* (bacilos grandes) ni la formación de quistes. Por otro lado, el género *Azomonas* primariamente acuáticas, no corresponden a bacterias del suelo.

Tabla 39. Características microscópicas de cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre.

CEPA	GRAM	MOVILIDAD	MORFOLOGÍA	EXTREMOS CELULARES	OTROS
R2P2B	-	-	Coco bacilos	Ligeramente en punta	No
S5BE	-	-	Bacilos	Redondeados	Gránulos de reserva a los extremos
FZm2	-	+	Bacilos	Redondeados	No
FMs1	-	-	Bacilar pleomórfica	Redondeados	No
FLe1	-	-	Bacilos	Redondeados	Gránulos de reserva
FLe4	-	-	Bacilos	Redondeados	Gránulos de reserva
FLe5	-	+	Bacilos	Redondeado	Gránulos de reserva
FLe6	-	-	Bacilos	Redondeado	Gránulos de reserva

El género *Derxia* corresponde exclusivamente a bacterias de suelos tropicales (ácidos) y las cepas en estudio fueron aisladas de suelos calcáreos (Valle del Mezquital, Hgo.) o neutros (Celaya, Gto.).

Las bacterias del género *Beijerinckia* son bacilos con grandes cuerpos de lípidos en cada extremo; forman colonias de apariencia brillante a causa de la abundante mucosidad capsular. La prueba de la oxidada es positiva. La cepa S5BE (de colección) coincide con dichas características (Tabla 39 y 41), además este género no crece en placas con Gelosa Nutritiva (Tabla 40).



**Tabla 40.** Características coloniales de cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre, en cultivos de 72 horas desarrolladas en Gelosa Nutritiva.

CEPA	COLOR	FORMA	ASPECTO	BORDE	ELEVACIÓN
R2P2B	Crema	Circular	Opaca	Entero	Convexa
S5BE	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo
FZm2	Crema	Circular	Brillosa	Irregular	Convexa
FMs1	Crema	Circular	Butirosa	Entero	Convexa
FLe1	Crema	Circular	Opaca	Entero	Convexas
FLe4	Crema	Circular	Opaca	Entero	Convexa
FLe5	Crema	Circular	Brillosa	Entero	Convexa
FLe6	Crema-ámbar	Circular	Butirosa	Entero	Convexa

**Tabla 41.** Características coloniales de cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre, en cultivos de 72 horas desarrolladas en Medio Lipman + NH<sub>4</sub>Cl.

CEPA	COLOR	FORMA	ASPECTO	BORDE	ELEVACIÓN	DIFUSIÓN DE PIGMENTOS
R2P2B	Blanco	Circular	Brillosa	Entero	Convexa	No
S5BE	Crema	Circular	Muy Gomosa	Entero	Umbonada	No
FZm2	Blanca	Circular	Brillosa	Entero	Convexa	No
FMs1	Blanca	Circular	Opaca	Entero	Convexa	No
FLe1	Blanca	Circular	Brillosa	Entero	Convexa	No
FLe4	Blanca	Circular	Brillosa	Entero	Convexa	No
FLe5	Blanca	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No
FLe6	Blanca	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No

La cepa FZm2 reaccionó a la prueba de la oxidasa negativamente y positiva a la catalasa, lo que sugirió una bacteria entérica; por lo que se resembró en medio Endo (Anexo 2). Esta cepa desarrolló un color verde brillante a las 24 horas de incubación; por lo que se decidió emplear la galería Api 20E, dando como resultado para la cepa FZm2 *Klebsiella terrigena* (reportada como rizobacteria fijadora de nitrógeno por Emtsev *et al.*, 1994, citado en Pishchik *et al.*, 1998), con un 93 % de confianza (Anexo 4).

La cepa FLe5 también presentó buen desarrollo en medio Endo, sin el característico color verde brillante de las enterobacterias. La reacción a la oxidasa fue negativa y positiva a la catalasa (Tablas 42 y 43). Para la cepa FLe5 se empleó la galería Api 20E; sin embargo, el perfil bioquímico de esta bacteria es inaceptable, por lo que no se logró su identificación.

**Tabla 42.** Reacción de la oxidasa en cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre.

R2P2B	S5BE	FZm2	FMs1	FLe1	FLe4	FLe5	FLe6
-	+	-	+	-	-	-	-

**Tabla 43.** Reacción de la catalasa en cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre.

R2P2B	S5BE	FZm2	FMs1	FLe1	FLe4	FLe5	FLe6
+	+	+	+	+	-	+	+

La identificación del resto de las cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre forma parte de una investigación de tesis de licenciatura, la cual tiene como objetivo la identificación de estas cepas hasta género.

### 3.5.4 Caracterización primaria de PGPR solubilizadoras de fósforo

Todas las cepas en estudio presentaron una morfología microscópica (Tabla 44) y colonial muy semejante (Tablas 45 y 46), a excepción de la cepa SZm2. Ya que las bacterias solubilizadoras de fósforo corresponden a una gran diversidad de géneros de microorganismos del suelo, se decidió emplear como primer criterio de identificación, la prueba de la oxidasa (Tabla 47). Esta prueba nos permitió dividir dos grupos, las entéricas (SZm1 y SZm2) y las no entéricas (SMs1 y SMs2).

**Tabla 44.** Características microscópicas de cepas solubilizadoras de fósforo.

CEPA	GRAM	MORFOLOGÍA	EXTREMOS CELULARES	OTROS
SZm1	-	Bacilos	Redondeados	No
SZm2	Variable	Bacilos	Redondeados	Gránulos opacos
SMs1	-	Bacilos	Redondeados	No
SMs2	-	Bacilos	Redondeados	No

**Tabla 45.** Características coloniales de cepas solubilizadoras de fósforo, en cultivos de 48 horas desarrolladas en Gelosa Nutritiva.

CEPA	COLOR	FORMA	ASPECTO	BORDE	ELEVACIÓN	DIFUSIÓN DE PIGMENTOS
SZm1	Blanca	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No
SZm2	Salmón	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No
SMs1	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No
SMs2	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No

**Tabla 46.** Características coloniales de cepas solubilizadoras de fósforo en cultivos de 48 horas desarrolladas en Medio Ramos Callao.

CEPA	COLOR	FORMA	ASPECTO	BORDE	ELEVACIÓN	DIFUSIÓN DE PIGMENTOS
SZm1	Blanca	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No
SZm2	Salmón	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No
SMs1	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convex	No
SMs2	Crema	Circular	Cremosa	Entero	Convexa	No

**Tabla 47.** Reacción de la oxidasa en cepas solubilizadoras de fósforo.

SZm1	SZm2	SMs1	SMs2
-	-	+	+

La cepa SZm1, se desarrolló bien en medios selectivos para el grupo de enterobacterias (Endo y McConkey, Anexo 2), por lo que se decidió usar para su identificación, las galerías Api 50 CHE y Api 20 E las cuales son recomendadas para este fin. Por otra parte, la cepa SZm2 presentó Gram variable y la presencia de gránulos, por lo que se dispuso a evaluarla mediante la galería Api 50 CHB (*Bacillus* y géneros cercanos), y su complementaria Api 20 F. Las cepas SMs1 y SMs2 presentaron buen crecimiento en agar cetrimida (sin producción de pigmentos fluorescentes), selectivo para el género *Pseudomonas*, por lo que se resolvió identificarlas mediante la galería Api 20 NE la cual es específica para bacilos Gram negativos, oxidasa positivos no enterobacterias.

**3.5.5 Pruebas bioquímicas**

El desarrollo en Agar Cetrimida y la reacción positiva a la oxidasa indican que estas cepas corresponden al género *Pseudomonas*, por lo que se utilizó la galería 20NE del Sistema Api, para la identificación de la especie, cuyos resultados indican que todas las cepas corresponden a *P. fluorescens*, y que el grado de certeza que resultó en el Sistema Api es de 99.1 al 99.99% (Anexo 4). En la Tabla 48 se resumen las pruebas que resultaron diferentes a las reportadas en la cepa tipo.

Debido a que en el sistema Api no existen galerías para la identificación de *Azospirillum* y la mayoría de las bacterias fijadoras de nitrógeno, en estos casos se aplicaron los criterios descritos por Tarrand *et al.*, (1978) para la identificación de *Azospirillum*, en tanto que para las fijadoras de nitrógeno de vida libre (a excepción de la cepa FZm2) sólo se realizó la caracterización primaria.

**Tabla 48.** Resultados obtenidos con el software Aplilab plus Ver. 3.3.3, para la identificación de *Pseudomonas fluorescens*.

CEPA	% IDENTIFICACIÓN	PRUEBAS EN CONTRA A LA CEPA TIPO*
PZm2	99.1	Arginina deshidrolasa
PMs1	99.6	Arginina deshidrolasa
PMs2	99.9	NINGUNA
PMs3	99.9	NINGUNA
PMs4	99.9	NINGUNA
PAs1	99.6	Arginina deshidrolasa
PAs2	99.9	NINGUNA

\*Considerada por BioMereux (Anexo 4).

De las 11 cepas solubilizadoras de fósforo aisladas inicialmente, únicamente se identificaron 4 que fueron las que mostraron capacidad para promover el desarrollo vegetal. En los resultados mostrados en las Tablas 44 y 45 se observa que 3 de ellas presentan características muy similares, en tanto que la SZm2 se diferencia en su reacción al Gram, que presenta gránulos y el color rosa de la colonia. Considerando que este grupo incluye a una gran diversidad de géneros, se decidió emplear como primer criterio de separación la prueba de la oxidasa, la que permitió dividir a las cepas en estudio en 2 grupos: las entéricas (SZm1 y SZm2) y las no entéricas (SMs1 y SMs2).

Como prueba complementaria para las primeras se hizo una resiembra en los medios de Endo y McConkey, donde se observó el desarrollo de colonias color rosa, y finalmente se aplicó las galerías Api 50CHE y Api 20E, lo que permitió identificar a la cepa SZm1 como *Pantoea agglomerans* también conocida con los sinónimos *Enterobacter agglomerans* y *Klebsiella herbaria* (Holt *et al.*, 1994), con un 99% de confianza, que resultó de un perfil bioquímico de 77 pruebas; ninguna de las pruebas en contra son definitivas para la identificación del género o la especie. No fue posible la identificación de la cepa SZm2 por lo que, considerando su forma bacilar y el gram variable, se decidió evaluarla mediante la galería Api CHB (*Bacillus* y géneros cercanos) y su complementaria Api 20E, con lo que se identificó como *Brevibacterium brevis*, resultado que fue sorprendente debido a que la bacteria en estudio no forma esporas, característica reportada en la literatura para este género (Shida *et al.*, 1996). La comparación de resultados obtenidos con las características descritas en el Manual de Bergey's (Holt *et al.*, 1994) indica que esta bacteria tiene mayor similitud con *Brevibacillus*, ya que coincide en características bioquímicas, con el Gram variable, agrupación en forma de "V" y que no es esporulada. Por otra parte, la formación de colonias color rosa por la cepa en estudio, coinciden con la característica de la especie *linens* (Holt *et al.*, 1994). Considerando lo anterior, se recomienda verificar la identificación del género y especie, ya que en el presente estudio únicamente se describe como perteneciente a la familia: Brevibacteriaceae.

Las otras 2 cepas se resembraron en Agar Cetrimida, en donde se observó un buen desarrollo sin producción de pigmentos. Considerando el desarrollo en este medio selectivo, la morfología, la reacción al Gram y, fundamentalmente, la reacción positiva a la oxidasa, se decidió emplear la galería Api 20E, que permitió identificarla como *Pseudomonas fluorescens* con un 92.3% de confianza, y dos pruebas diferentes a la cepa tipo (Anexo 4).

## CONCLUSIONES

- No se logró establecer una relación entre la microbiota de la rizosfera, la textura, el pH y el porcentaje de la materia orgánica con el tiempo de riego de aguas residuales.
- Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre se encuentran en mayor proporción (de 1:4 hasta 1:>300) respecto a los grupos *Pseudomonas*, *Azospirillum* y solubilizadoras de fósforo, en suelos regados con aguas negras en el Valle del Mezquital.
- Se aislaron 33 rizobacterias de cultivos regados con aguas residuales: 12 de maíz, 13 de alfalfa, 7 de avena y 1 de frijol.
- Se aislaron 17 rizobacterias de jitomate.
- 29 cepas, aisladas de los diferentes cultivos del Valle del Mezquital, fueron capaces de colonizar las raíces del jitomate y promover su desarrollo, lo que indica que no son específicas.
- Se seleccionaron 31 cepas como rizobacterias promotoras del desarrollo de jitomate.
- A 70 días de desarrollo en sistema hidropónico bajo condiciones de invernadero, el desarrollo vegetal de *Lycopersicon esculentum* es promovido de 100 a 900% por rizobacterias del género *Pseudomonas*, *Azospirillum*, fijadoras de nitrógeno de vida libre y solubilizadoras de fósforo.
- La comparación de los resultados en las diferentes variables de desarrollo obtenidos a los 35 y 70 días indican que, el efecto de la inoculación con cepas PGPR, en cultivos de *Lycopersicon esculentum*, es más claro a los 70 días de desarrollo de la planta (etapa vegetativa).
- De las 49 cepas probadas 5 se consideraron como potencialmente útiles para la biofertilización de *Lycopersicon esculentum* en sistema hidropónico, bajo condiciones de invernadero: *Azospirillum* (AMs3, AZm5); fijadora de nitrógeno de vida libre (FLc1, S5BE) y *Pseudomona*, solubilizadora de fósforo (SMs2).

- *Pseudomonas fluorescens* destaca entre las bacterias estudiadas por su versatilidad, ya que produce pigmentos, auxinas, solubiliza el fósforo y promueve el desarrollo vegetal de *Lycopersicon esculentum*.
- Mediante la técnica de del Ensayo Rápido *in situ* sobre una membrana de Nitrocelulosa se seleccionaron 14 rizobacterias como productoras de auxinas.
- No se logró establecer relación de la cantidad de compuestos indólicos detectados colorimétricamente con el efecto en la promoción de desarrollo del jitomate, lo que indica que las determinaciones químicas en cultivos *in vitro* no son suficientes para un proceso de selección de cepas, en el que se requiere evaluar el efecto de la inoculación en la planta huésped.
- La producción de *Lycopersicon esculentum* en suelo fertilizado con la dosis óptima, fue similar a la obtenida al inocular plantas con las cepas AZm5, AMs3 o FLe1 con la mitad de la concentración óptima de fertilizante, bajo condiciones de invernadero.

## CONSIDERACIONES FINALES

- Las 5 cepas seleccionadas son potencialmente útiles en la biofertilización, pero antes de ser recomendadas es indispensable determinar su efecto en estadios más avanzados de desarrollo, especialmente en la producción, así como, estudiar la capacidad competitiva con otras rizobacterias y su sobrevivencia en el suelo.
- Para cualificar o cuantificar la presencia de fitohormonas producidas por cepas PGPR se requiere diseñar el medio de cultivo óptimo para la producción de tales compuestos.
- Se requieren de estudios más finos para la identificación y cuantificación de auxinas diferentes al ácido indol-3-acético.



## LITERATURA CITADA

- Abad, M. 1995. Sustratos para el cultivo sin suelo. En Nuez, F. (Coord.). El cultivo del Tomate. Ediciones Mundi-Prensa. España. 132-166 pp.
- Aguilera, N. 1989. Tratado de Edafología de México. Tomo I. Facultad de Ciencias. UNAM. 222pp
- Alexander M. 1977. Introduction of Soil Microbiology. 2a ed. John Wiley & Son. New York. 472pp
- Arizona's College of Agriculture. [En Línea]. 2000. Disponible en la World Wide Web: <<http://ag.arizona.edu/hydroponictomatoes/overview.htm>>
- Baath E., M. Díaz-Raviña, A. Frostegard y C. Campbell. 1998. Effect of Metal-Rich Sludge Amendments on the Soil Microbial Community. Appl. Environ. Microbiol. 64: 238-245.
- Barbieri P., y Galli. E. 1993. "Effect on wheat root development of inoculation with *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole - 3 - acetic acid production" Res. Microbiol. 144: 69-75.
- Barea. M., Navarro. H., y Montoya. E. 1978. "Production of plant growth regulators by rizosphere phosphate - solubilizing bacteria" J. Appl. Bacteriol. 40: 129-134.
- Barkay, T., S.C Tripp y B.H Olson. 1985. Effect of metal-rich sewage sludge application on the communities of grasslands. Appl. Environ. Microbiol. 49: 333-337.
- 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., G. Holguín y R. Ferrera-Cerrato. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos I *Azospirillum*. TERRA 14: 159-194.
- Bashan, Y y G. Holguín. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Can J. Microbiol. 43: 103-121.
- Bashan, Y y H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36: 591-608.
- Benizri, E; A. Courtade; C. Picard y A. Guckert. 1998. Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. Soil. Biol. Biochem. 30: 1481-1484.
- Biró, B., K. Köves-Péchy, I. Vörös, T. Takács, P. Eggenberg y R. J. Strasser. 2000. Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. Applied Soil Ecology 15: 159-168.



- Bothe, H., H. Korsgen, T. Lehmacher y B. Hundeshagen. 1992. Differential effects of *Azospirillum*, auxin and combined nitrogen on the growth of the roots of wheat. *Symbiosis*. 13: 167-179.
- Bottini, R., M. Fulchieri, D. Pearce y R. P. Pharis. 1989. Identification of gibberellins A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub> and iso-A<sub>3</sub> in cultures in *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol*. 90: 45-47.
- Bric, M., M. Bostock, E. Silverstone. 1991. Rapid *In situ* Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Appl. Environ. Microbiol*. 57: 535-538.
- Brock, D. y T. Madigan. 1993. 6ª edición. *Microbiología*. Prentice Hall Hispanoamericana S. A. México. 956pp
- Brookes, C. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol. Fert. Soils*. 19: 269-279.
- Brown, E. 1972. "Plant growth substances producer by micro – organisms of soil and rhizosphere" *J. Appl. Bacteriol*. 35: 443-451.
- Cacciari I., D. Lippi, T. Pietrosanti y W. Pietrosanti. 1989. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. *Plant and Soil*. 115: 151-153.
- Cajuste, D. 1986. El fósforo aprovechable de los suelos. Serie Cuadernos de Edafología 6. Centro de Edafología del Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 19pp
- Campbell R. 1985. *Plant Microbiol*. Ed. Edward Arnold. Great Britain. 148pp
- Cánovas, F. 1995. Manejo del Cultivo sin suelo. En Nuez, F. (Coord.). *El cultivo del Tomate*. Ediciones Mundi-Prensa. España. 228-254 pp.
- Castilla, N. 1995. Manejo del Cultivo intensivo con suelo. En Nuez, F. (Coord.). *El cultivo del Tomate*. Ediciones Mundi-Prensa. España. 190-225 pp.
- Castillo, G. y S. Martínez. 1997. Reversed-phase C18 high-performance liquid chromatography of gibberellins GA3 and GA1. *J. Chromat*. 782: 137-139.
- Chakrabaty, M. 1999. Bookreviews: *Pseudomonas*. *Trends in Microbiol*. Vol.7 No.4
- Chamarro, J. 1995. Anatomía y Fisiología de la planta. En Nuez, F. (Coord.). *El cultivo del Tomate*. Ediciones Mundi-Prensa. España. 44-91 pp.
- Chanway, P. y B. Holl. 1992. Influence of soil biota on Douglas-fir (*Pseudotsuga manziesii*) seedling growth: the role of rhizosphere bacteria. *Can. J. Bot*. 70: 1025-1031.
- CNA1995. Información proporcionada por la Jefatura de los Distritos de Riego del Valle del Mezquital. Comisión Nacional del Agua, Mixquiahuala, Hidalgo, México.
- Centro de Estadística Agropecuaria. [En Línea]. 2001 SAGAR. Disponible en la World Wide Web: <<http://www.sagar.gob.mx>>
-

- Conn, I., J. Nowak y G. Lazarovits. 1997. A gnotobiotic bioassay for studying interactions between potatoes and plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 43: 801-808.
- Crozier, A., P. Arruda, J.M. Jasmim, A.M. Monteiro y G. Sandberg. 1988. Analysis of indole-3-Acetic Acid and Related Indoles in Culture Medium from *Azospirillum lipoferum* y and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2833-2837.
- de Freitas R. y J. Germida. 1990a. A root tissue culture system to study winter wheat-rhizobacteria interactions. *Microbiol. Biotechnol.* 33: 589-595
- de Freitas R. y J. Germida. 1990b. Plant growth rhizobacteria for winter wheat. *Can. J. Microbiol.* 36: 265-272.
- de Freitas R. y J. Germida. 1991. *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* 37: 780-784.
- de Freitas R., R. Gupta y J. Germida. 1993. Influence of *Pseudomonas syringae* R25 and *P. putida* R105 on the growth and N<sub>2</sub> fixation (acetylene reduction activity) of pea (*Pisum sativum* L.) and field bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bio. Fertil. Soils.* 16: 215-220.
- de Freitas R., R. Banerjee y J. Germida. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils.* 24: 358-364
- Delgado, E. y L. Rojas. 1987. Efecto de contaminantes presentes en aguas negras sobre los microorganismos del suelo. Tesis de Licenciatura. ENCB. Instituto Politécnico Nacional.
- Day M. y J. Döbereiner. 1976. Physiological aspects of N<sub>2</sub> fixation by *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil Biol. Biochem.* 8: 45-50
- Döbereiner J., F. Marriel y M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464-1473
- Döbereiner J. y L. Baldani. 1979. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.* 22: 343-352
- Döbereiner, J. 1980. Forage grasses and grain crops. pp 535-555. In *Methods for Evaluation of Biological Nitrogen Fixation*. Edited by J. F. J. Bergersen. Chichester: Wiley.
- Domínguez I. y N. Aguilera. 1984. Metodología de análisis físico-químicos de suelos. Laboratorio de Investigación de Edafología. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Echegaray, A. y R. M. Ramírez-Gama. 1980. Prácticas de Microbiología Agrícola. Facultad de Química. UNAM. 25pp

- 📖 Eckert, B., O. Baller, G. Kirchhof, A. Halbritter, M. Stoffels y A. Hartmann. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C-4 Grass Miscanthus. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 17-26.
- 📖 Eggo, A. y S. Angle. 1990. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. Soil Biol. Biochem. 22: 865-869.
- 📖 El-Khawas, H. y K. Adachi. 1999. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. Biol. Fertil. Soil. 28: 377-381.
- 📖 Elliot F, M. Gilmour, M. Lynch y D. Tittlemore. 1984. Bacterial colonization of plant roots. In R.L. Tood and J.E. Giddens (eds). Microbial-Plant Interactions. Soil Science Society of América. Madison, Wis.
- 📖 Esquinas-Alcázar, J. y F. Nuez. 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. En Nuez, F. (Coord.). El cultivo del Tomate. Ediciones Mundi-Prensa. España. 14-42 pp.
- 📖 Esquivel-Cote R. 1997. Efecto de la fertilización biológica con *Azospirillum* y la fertilización química simultánea sobre el desarrollo de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) bajo condiciones de invernadero. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza. UNAM.
- 📖 FAO/UNESCO. 1988. Soil map of the world . World soil resources report 60, Food and Agriculture. ONU. Rome, Italy.
- 📖 Fallik, E., S. Sarig y Y. Okon. 1994. Morphology and Physiology of plant root associated with *Azospirillum*. p. 77-86. In Okon Y. (ed) *Azospirillum/Plant Association*. Boca Raton CRC Press.
- 📖 Fassbender, W. y E. Bornemisza. 1987. Química de Suelos. Con énfasis en suelos de América Latina. Ed. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica. 420pp
- 📖 Ferrera-Cerrato, R. 1995. Efecto de la rizosfera pp. 36-53. In: Ferrera-Cerrato, R. y J. Pérez-Moreno (eds). Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Estado de México.
- 📖 Flores, L., G. Hernández, M. Mejía, R. Alcalá y S. Sánchez. 1990. Algunos metales pesados en suelos regados con aguas residuales. pp 40. In: Memorias del Primer Simposio Nacional "Degradación del suelo". Instituto de Geología. UNAM.
- 📖 Fulchieri, M., C. Lucangeli y R. Bottini. 1993. Inoculation with *Azospirillum* affects growth and gibberellin status of corn seedling roots. Plant Cell Physiol. 34: 1305-1309.
- 📖 Freeman, A. 1985. 22ª Edición. Microbiología de Burrows. Interamericana McGraw Hill. México. 1181pp
- 📖 García, E. 1973. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Klöppen. Instituto de Geografía, UNAM, México.

- ☞ Gaucher, G. 1971. El suelo y sus características agronómicas. Ed. Omega. S.A. Barcelona.
- ☞ Gavande, A. 1979. Física de Suelos, Principios y Aplicaciones. Ed. Limusa, México. 351pp
- ☞ Glick, R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 1: 109-117.
- ☞ Gómez de la Serna, G. 1986. Efecto de la inoculación de endomicorrizas y fosfobacterias en plantas de cebolla. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- ☞ González, M., S. Raciman, M. Aguirre. [En Línea] 1999. "Hormonas vegetales". Universidad Nacional del Noroeste, Facultad de Agrociencias, Argentina. Disponible en la World Wide Web: <<http://fai.unne.edu.ar/biologia/planta/auxinas.htm>>
- ☞ González, 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. UNAM.
- ☞ Gordon, A. y P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiol.* 26: 192-195.
- ☞ Gunarto, L. [En Línea] 1995. "Azospirillum inoculation to lowland rice". Central research institute for food crops (CRIFC). Indonesia. Disponible en la World Wide Web: <<http://ss.jircas.affrc.go.jp/kanko/newsletter/nl1995/no1/310-4.html>>
- ☞ Gutierrez, V. 1980. "Importancia de las fosfobacterias en la agricultura" Tesis de licenciatura. FQ. UNAM. México.
- ☞ 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., S. Mahaur y W. Klingmuller. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indolacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29: 916-923.
- ☞ Hernández, O. 1997. *Azospirillum* como productor de fitohormonas (auxinas y giberelinas) *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- ☞ Hill, T., A. Mitkowski, L. Aldrich-Wolfe, R. Emele, D. D. Jurkonie, A. Ficke, S. Maldonado-Ramírez, T. Lynch y B. Nelson. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology.* 15: 25-36.
- ☞ Holt, J., R. Krieg; A. Snetah; T. Stanley y T. Williams. 1994. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 9° ed, William & Wilkins. 754pp.
- ☞ Ietswaart, H., J. Griffioen y O. Ernst. 1992. Seasonality of VAM infection in three populations of *Agrostis capillaris* (gramineae) on soil with or without heavy metal enrichment. *Plant Soil.* 139: 67-73.

- Ikeda, K., K. Toyota y M. Kimura. 1998. Effects of bacterial colonization of tomato roots on subsequent colonization by *Pseudomonas fluorescens* MelRC2Rif. Can. J. Microbiol. 44: 630-636.
- Infoagro. [En Línea] 2001. El cultivo del tomate. Disponible en la World Wide Web: <<http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.asp>>
- Jackson, L. 1976. 3ª ed. Análisis Químico de Suelo. Ed. Omega S.A. Barcelona. 662
- Jain K. y C. Patriquin. 1984. Root hair the formation bacterial attachment and plant growth in wheat-*Azospirillum* associative. Appl. Environ. Microbiol. 48: 1208-1213.
- Khammas, M., E. Ageron, D. Grimont y P. Kaiser. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice rotos and rhizosphere soil. Res. Microbiol. 140: 679-693.
- Kim, Y., D. Jordan y A. McDonald. 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. Biol Fertil Soils. 26: 79-87.
- King, O., B. S., M.S., M. K. Ward, Sc. D. y E. Raney, A. B. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. And Clin. Med. 44: 301-307.
- Klibansky, M. y F. González. 1996. Algunas experiencias en la Aplicación de la Biotecnología en la Producción de Biofertilizantes en Cuba. En: Galindo E. (ed) Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos. México.
- Kloepper W., K. Lifshitz, N. Schroth. 1988. "Pseudomonas inoculants to benefit plant production" ISI Atlas Sci. Anim Plant Sci. 60-64 pp.
- Kumar V. y N. Narula. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. Biol. Fertil. Soils. 28: 301-305.
- Kumar J., S. Surange, S. Nautiyal. 1999. Ocurrance of Salt, pH, and Temperature-tolerant, Phosphate-solubilizing Bacteria in Alkaline Soils. Current Microbiology. 39: 89-93
- Lacasa, A. y J. Contreras. Las Plagas. En: Nuez, F. (Coord.). El cultivo del Tomate. Ediciones Mundi-Prensa. España. 386-467 pp.
- Leinhos V. y H. Birnshel. 1989. Plant growth substances produced by microorganisms of the rhizosphere and soil. J. Basic Microbiol. 29: 7, 473-476
- Lyn W., Y. Okon y F. Hardy. 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1775-1779.
- Lynch, M. 1990. The rhizosphere. Wiley-Interscience, Chichester, England.
- Magalhães, F., I. Baldani, M. Souto, R. Kuykendall y J. Döbereiner. 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. Ann Acad Bras Cienc 55: 417-430.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2a. ed. Ed. Academic-Press. 889pp

- 📖 Mascarúa-Esparza, A., R. Villa-González y J. Caballero-Mellado. 1988. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from cactaceous plants. *Plant and Soil* 106: 91-95.
- 📖 Mejía, M., S. Sánchez, G. Hernández, L. Flores, G. Villarreal y R. Guajardo. 1990. Metales pesados en maíz (*Zea mays* L) y alfalfa (*Medicago sativa* L) y su correlación con los extractables en suelos del DDR 063.Hgo. p 42. En: Memorias del Primer Simposio Nacional "Degradación del suelo". Instituto de Geología. UNAM.
- 📖 Miranda, M. 1989. Caracterización fisiológica de *Rhizobium meliloti* procedente de suelos agrícolas regados con aguas negras. Tesis de Licenciatura. ENCB. Instituto Politécnico Nacional.
- 📖 MERCK. 1982. Manual de Medios de Cultivo Merck. Frankfurter Strasse 250. D-6100 Darmstadt 1. R.F. de Alemania. 189
- 📖 Mohandas, S. 1988. Nitrogen fixation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill 'Pusa Ruby'). *Plant and Soil* 107: 219-225.
- 📖 Montgomery, C. 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana, S.A. de C. V. México. 589
- 📖 Moore, J. 1994. "Industria en transición". Publicación # 1. Productores de Hortalizas. México. 8-10
- 📖 Muñoz, J. y G. López. 1997. Descripción fisico-biotica y diagnostico ambiental del Valle del Mezquital. En García-Calderón N.E., A. Ibáñez-Iluerta y C. Vallejo-Albarrán (ed). Seminario sobre uso de Aguas Residuales para Riego. Problemática del Valle del Mezquital, Red  $\alpha$ -Mezquital. México. 1-16
- 📖 Nairn, D. y P. Chanway. 1999. Recovery of a rhizosphere-colonizing GEM from inside wheat roots. *Can J. Microbiol.* 45: 612-615.
- 📖 Nautiyal, S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. *FEMS Microbiology Letters.* 170: 265-270.
- 📖 Nickell, G. 1994. Plant Growth regulators in Agriculture and Horticulture. Chapter 1. American Chemical Society. 1-14
- 📖 Noel, C., C. Sheng, K. Yost, P. Pharis y F. Hynes. 1995. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. *Can. J. Microbiol.* 42: 279-283.
- 📖 Okon, Y. 1994. "Azospirillum / plant associations" CRC Press, Boca Raton, Fl. pp, 175.
- 📖 Okon, Y y Y. Kapulnik. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated rotos. *Plant and Soil.* 90: 3-16.
- 📖 Okon, Y. y Vanderlcyden. J. 1997. "Root - asociated *Azospirillum* species can stimulate plants" *ASM News.* 63: 366-370.

- 📖 Olyunina, N. y V. Shabaev. 1996. Production of indole-3-acetic acid during growth of the rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas*. *Microbiol.* 65: 813-817.
- 📖 O'Neill, A., P. Chanway, E. Axelwood, A. Radley y B. Holl. 1992. An assessment of spruce growth response specificity after inoculation with coexistent rhizosphere bacteria. *Can. J. Bot.* 70: 2347-2353.
- 📖 Ortiz-Villanueva, B. 1977. Fertilidad de Suelos. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 210pp
- 📖 Paul, A. y E. Clark. 1996. 2ª. ed. Occurrence and Distribution of Soil Organism. En "Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. USA. 340
- 📖 Pillay K. y J. Nowak, 1996. Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Can. J. Microbiol.* 43: 354-361
- 📖 Pishchik N., V. Mocrousov, M. Lazarev, I. Vorobyev, V. Narvskaya, I. Chernyaeva, P. Kozhemyakov y N. Koval. 1988. Biological properties of some nitrogen-fixing associative enterobacteria. *Plant and Soil* 202: 49-59
- 📖 Porta, J., M. López-Acevedo y C. Roquero de Laburu. 1994. Edafología. Para la agricultura y el medio ambiente. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- 📖 Prescott, M., P. Harley y A. Klein. 1999. 4ª ed. Microbiología. McGraw Hill. Interamericana. México. 1005 pp.
- 📖 Rademacher, W. 1994. Gibberellin formation in microorganisms. *Plant Growth Regulation.* 15: 303-314.
- 📖 Ramírez-Gama, R. M. 1997. Actividad Microbiana en Suelos Regados con Aguas Residuales. En García-Calderón N.E., A. Ibáñez-Huerta y C. Vallejo-Albarrán (ed). Seminario sobre uso de Aguas Residuales para Riego. Problemática del Valle del Mezquital, Red  $\alpha$ -Mezquital. México. 45-50
- 📖 Ramos, A. y V. Callao. 1967. El empleo de la solubilización de fosfatos en placa como técnica diferencial bacteriana. *Rev. Microbiol. Esp.* 20: 1-12.
- 📖 Reber, H. 1992. Simultaneous estimates of the diversity and the degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. *Biol. Fert. Soils.* 13: 181-186.
- 📖 Reinhold, B., T. Hurek, I. Frenndrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans y J. de Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 43-51
- 📖 Rick, M. 1978. El Tomate. Investigación y Ciencia. Edición en español de Scientific American. Octubre. 25: 45-55

- Roane, M., y T Kellogg. 1996. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* 42: 593-603.
- Rodríguez-Cáceres, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 990-991.
- Rodríguez, H. y R. Fraga. R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* 17:319-339.
- Romero, H. 1994. Estudio de Caso (Valle del Mezquital). En preparación. *Taller Regional para las Américas sobre Aspectos de Salud, Agricultura y Ambiente, Vinculados al Uso de Aguas Residuales*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), Jiutepec, México.
- Ross, J. y D. O'Neill. 2001. New interactions between classical plant hormones. *Trends in Plant Science.* 6: 2-4
- Rovira D., I. Newman, J. Bowen y R. Campbell. 1974. Quantitative assessment of the rhizosphere microflora by direct microscopy. *Soil Biol. Biochem.* 6: 211-216.
- Ruiz, A. y E. Ortega. 1979. Química de Suelos. Prácticas de Laboratorio. Patronato de la Universidad Autónoma de Chapingo, México. 76pp
- Salisbury B. y W. Ross, 1992. *Plant Physiology*. Belmont, CA Wadsworth. USA.
- Sánchez, A. 1964. *Microbiología Agrícola*. Escuela Nacional de Agrícola. Chapingo, México.
- Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) [En línea] 2001. Disponible en la World Wide Web: <<http://www.siae.sagarpa.gob.mx>>
- Srinivasan, D. J. Petersen y B. Holl. 1996. Influence of indolacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium elii* under gnotobiotic conditions. *Can. J. Microbiol.* 42: 1006-1014
- SARH 1994 *Anuario de la Producción Agrícola*. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México, D.F., México.
- SARH 1977. *Fertilización en función del análisis del suelo (por el método de Morgan)*. Subsecretaría de Agricultura y Operación. Hoja de Divulgación 21. México.
- Sarwan M. y J. Kremer. 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology.* 20: 282-285.
- SEDESOL. 1993. En García-Calderón N.H., A. Ibáñez-Huerta y C. Vallejo-Albarrán (ed). Ordenamiento ecológico general del territorio nacional. Instituto Nacional de Ecología. México.
- SEMARNAP 1996 *Programa Hidráulico 1995-2000*. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, México.



- Shida, O., H. Takagi, K. Kadowaki y K. Komagata. 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 939-946.
- Shishido, M. y P. Chanway. 1997. Storage effects on indigenous soil microbial communities and PGPR efficacy. *Soil. Biol. Biochem.* 30: 939-947.
- Singh S. y K. Kapoor. 1998. Effects of inoculation of phosphate-solubilizing microorganisms and an arbuscular mycorrhizal fungus on mungbean grown under natural soil conditions. *Mycorrhiza.* 7: 249-253.
- Smiber, M. y R. Krieg. 1982. *General characterization.* p 409-413. In: Gerhardt, P, P.G.R. Murray, N:R. Costilow, E:W Nester, W:A Wood, N:R Krieg y P:G Briggs (eds). *Manual of Methods for General Bacteriology.* Am. Soc. Microbiol. Washington. D. C.
- 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
- Stucki G., A. Jackson y J. Noonan. 1984. Isolation and characterization of *Serratia* strains pathogenic for larvae of the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *New Zealand. Journal of Science.* 27: 255-260.
- Surange S., G. Wollum II, N. Kumar y S. Nautiyal. 1997. Characterization of *Rhizobium* from root nodules of leguminous trees growing in alkaline soils. *Can. J. Microbiol.* 43: 891-894.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 1991. *Plant Physiology.* The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. USA. 531
- Tarrand, J., R. Krieg y J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *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.* 24: 967-980.
- Tello C. y J. Del Moral. 1995. Plagas y enfermedades. p 14-42. En Nuez, F. (Coord.). *El cultivo del Tomate.* Ediciones Mundi-Prensa. España..
- Tien, M., H. Gaskins y H. Hubell. 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.
- Tompson, I. 1978. *El suelo y su fertilidad.* Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. 649 pp
- Thompson V., N. Schroth, J. Moller y O. Rell. 1976. Efficacy of bactericides and saprophytic bacteria in reducing colonization and infection of pear flowers by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 66, 1457-1459).
- Throe R. y M. Thompson. 1993. 5a. ed. *Soil and soil fertility.* Oxford University. New York. 462 pp

- ☞ Urzúa M. C. 1997. Evaluación del efecto de *Azospirillum* sobre el rendimiento de *Lycopersicon esculentum* (bajo condiciones controladas). Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Iztacala. UNAM.
- ☞ Urzúa M. C. 2001. Selección de la concentración óptima de *Azospirillum* y su combinación con diferentes dosis de fertilización en dos sistemas de cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.
- ☞ Vogel, E., R. Alva y R. Rivas. 1997. Contaminantes del suelo y residuos sólidos. En "Enkelin, E. C.; G. Cano; R. A. Garza y E. Vogel. Ciencia Ambiental y Desarrollo Sostenible. International Thomson Editores S.A. de C.V. México. 690

## A1. ANEXO 1

### A1.1 ANÁLISIS FÍSICOS DEL SUELO.

#### A1.1.2 Textura, por el método de Bouyoucos

Pesar 60 g de suelo tamizado (2 mm). Colocar en un vaso Berzelius de 400 mL y añadir agua destilada hasta capacidad de campo y después añadir 20 mL de peróxido de hidrógeno (30%) lentamente, agitando. Calentar a Baño María. Agitar frecuentemente hasta la disminución de la reacción. Repita la adición de peróxido de hidrógeno, cuantas veces sea necesario. Continuar calentando y agitar hasta sequedad. Deshacer los grumos con rodillos de madera o sucedáneo. Colocar 50 g representativos de suelo en un vaso de agitador mecánico. Añadir 5 mL de soluciones dispersantes (oxalato de sodio, metasilicato de sodio, hidróxido de sodio) y agua a 2/3 del vaso. Agitar 15 min en agitador mecánico. Reposar de 5 a 10 min. Transferir cuantitativamente a una probeta de 1000 mL. Tapar y agitar probeta por giros de 180° hasta homogeneidad. Dejar en la mesa y disparar cronómetro simultáneamente. Introducir el densímetro de Bouyoucos en la suspensión cuidadosamente. Cuando  $t=40$  seg, leer densímetro ( $\delta_1$ ) al raz de la superficie de la suspensión y leer temperatura ( $T_1$ ). Sacar densímetro. Cuando  $t=2$  horas leer densímetro ( $\delta_2$ ) y temperatura ( $T_2$ ).

$$\%Limo + \%Arcilla = \delta_1 + (T_1 - T_0) 0.36 \times 100 / g \text{ muestra} = x$$

$$\%Arcilla = \delta_2 + (T_2 - T_0) 0.36 \times 100 / g \text{ de muestra} = a$$

$$\%Limo = x - a = b$$

$$\%Arena = 100\% - x = c$$

Determinar clase textural, localizando los puntos  $a$ ,  $b$  y  $c$  en triángulo de textura (Gavande, 1979).

#### A1.1.3 Densidad Aparente (D.A.), por el método de la Probeta

Pesar probeta graduada (10 mL). Agregar suelo seco al horno hasta el raz de la marca. Golpear 10 veces sobre un lienzo. Agregar suelo hasta el raz de los 10 mL. Pesar la probeta más el suelo (Gaucher, 1971).

$$D.A. = \text{Peso de la probeta con suelo} - \text{Peso de la probeta} / \text{volumen total} = g / cc$$

#### A1.1.4 Densidad Real (D.R.), por el método del Picnómetro

Pesar el picnómetro vacío (peso constante) ( $a$ ). Introducir 5 g de suelo. Pesar picnómetro más suelo ( $c$ ). Adicionar 10 mL de agua destilada. Agitar durante 30 min. Llenar con agua hasta el afore. Pesar el picnómetro más agua más suelo ( $d$ ). Pesar picnómetro más agua ( $b$ ). (Gaucher, 1971).

$$D.R. = c - a / \{(c - a) + (b - a)\} - (d - a)$$

**A1.1.5 Porosidad** (Gaucher, 1971).

El espacio poroso (E.P.) =  $100 (1 - \{D.A. / D.R.\})$

**A1.2 ANÁLISIS QUÍMICOS DEL SUELO****A1.2.1 pH (Relación suelo:agua de 1:2.5)**

En un vaso de precipitados de 50mL, se añade una muestra de 10g de suelo + 25ml. de agua destilada. Se agita la suspensión obtenida a intervalos regulares durante 20 a 30 minutos. Es posible alcanzar el equilibrio en 5 minutos de agitación continua y vigorosa con un agitador mecánico recíproco. Se mide a continuación el pH, habiendo agitado enérgicamente la suspensión inmediatamente antes de introducir el electrodo (Jackson, 1976).

**A1.2.2 pH (Relación suelo:CaCl<sub>2</sub> 0.01M de 1:2)**

Se añaden a 25g de suelo 50mL de disolución en un vaso de precipitados de 100mL. Se agita vigorosamente, y se mide el pH inmediatamente después (Jackson, 1976).

Suelo pH = 4.5 (suelo ácido)

Suelo pH = 6.9-7.1 (suelo calcáreo)

**A1.2.3 Materia Orgánica (Walkley y Black)**

Se coloca 0.5 g de suelo seco dentro de un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Añadir 10 mL de Solución de dicromato de potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 1 N (usar bureta) y mezclar perfectamente por agitación. Añadir 20 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentración no menor de 96%) (con probeta graduada agitar cuidadosamente durante un minuto. Se deja reposar de 20 a 30 minutos. Diluir la suspensión con 200 mL de agua destilada. Añadir 5 mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85%) y 15 gotas del indicador de difenilamina<sup>1</sup>. Titúlese con sulfato ferro-amónico 0.5 N hasta obtener la coloración verde bandera que indicará el punto final de la titulación. Correr un testigo siguiendo exactamente el mismo procedimiento, excepto que no se agregará la muestra del suelo (Ruíz y Ortega, 1979)

Meq ox/g = (B-T)N / g de muestra

%C = (Meq ox/g) 0.39

%M.O. = (%C) 1.72

B = mL de sulfato ferro-amónico 0.5 N gastado en la titulación del testigo.

T = mL de sulfato ferro-amónico gastado en la titulación de la muestra.

N = normalidad de sulfato ferro-amónico.

**A1.2.4 Nitrógeno total (método de Gunning)**

Pesar 0.7 a 3.5 g de suelo (de acuerdo al contenido de N de la muestra).

<sup>1</sup> Disolver aproximadamente 0.5 g de difenilamina (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>(NH) en 20 mL de agua destilada y 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

Transferir la muestra a un matraz Kjeldahl de 800 mL. Adicionar por medio de un embudo 11 g (aprox.) de mezcla digestora (10 g de  $K_2SO_4$ , 0.2 g de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ). Agregar 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, desde el cuello del matraz, de forma tal que todas las sales sean lavadas hacia el interior. Agitar suavemente hasta que el suelo y ácido están completamente mezclados.

Colocar el matraz en el equipo Kjeldahl de digestión y conectar el aspirador de humos. Digerir a calor bajo hasta que la materia orgánica sea oxidada, esto sucede en aproximadamente dos horas de digestión y se manifiesta por la aparición de un color gris transparente o color paja. Apagar el mechero de gas y quitar el matraz del digestor e inmediatamente taponarlo con un vaso de 100 mL. Déjese enfriar y agréguese agua destilada (aproximadamente 300 mL), mézclase el contenido del matraz.

Mientras se espera que el ácido sulfúrico se enfríe, poner 25 mL de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) al 4% y cuatro gotas del indicador verde de bromocresol y rojo de metilo<sup>2</sup> dentro de un matraz Erlenmeyer de 125-250 mL. Colocar un tubo de vidrio colector dentro del matraz y conectarlo al tubo de metal del destilador de tal maneja que el tubo de vidrio este abajo del nivel del líquido. Póngase a funcionar el condensador del aparato de destilación. Agregar al matraz de dos a tres perlas de granallas de zinc y de dos a tres trozos de parafina. Sostener el matraz Kjeldahl a un ángulo de 45° y lentamente agregar 125 mL de hidróxido de sodio al 40% para que deslice por las paredes del matraz hasta su fondo, sin mezclarse. Conectar el matraz al destilador y encender el mechero. Agitar el matraz para mezclar el NaOH. Aumentar el calor si es necesario y hervir hasta que se hayan destilado alrededor de 200 mL. Si la mezcla empieza a hacer espuma disminúyase la temperatura de calentamiento. Desplazar el tubo colector de vidrio por encima de la solución boricada y cerrar el mechero; continúese destilando por unos diez minutos más y recójase el destilado en el matraz Erlenmeyer con la mezcla boricada. Retirar el matraz Erlenmeyer del destilador y titular la solución con ácido sulfúrico 0.01 N hasta que el color azul desaparezca (Ruiz y Ortega, 1979).

$$\% \text{Nitrógeno Total} = (T - B)(N)(1.4) / S$$

T = mL de  $H_2SO_4$  valorado, gastado en la titulación de la muestra problema.

B = mL de  $H_2SO_4$  valorado, gastado en la titulación del testigo.

N = normalidad del  $H_2SO_4$  usado en la titulación.

S = peso de la muestra, en gramos.

#### ***A1.2.5 Fósforo (método de Olsen et al.)***

Pesar 2.5g de suelo secado al aire y tamizado (2mm). Añadir 50 mL de solución extractora y agitar durante 30 min con una velocidad de 180 rpm. Filtrar y guardar el extracto. Para desarrollar color: Pipetear 5 mL del extracto a la solución estándar (de P 100 ppm) en matraces aforados de 25 mL. Añadir 5 mL de la solución para desarrollar color con cuidado para evitar efervescencia excesiva. Con una bureta añadir 15 mL de agua destilada y agitar. Dejar reposar 15 min y medir la intensidad de color (%T) a 880nm (Cajuste, 1986).

<sup>2</sup> Triturar 0.1 g de verde de bromocresol con 2 mL de NaOH 0.1 N en un mortero de ágata, añadir alcohol etílico al 95% hasta obtener un volumen de 100 mL. Triturar 0.1 g de rojo de metilo con una pequeña cantidad de alcohol etílico en un mortero de ágata. Añadir 3 mL de NaOH 0.1 N y diluir la solución a un volumen de 100 mL con alcohol etílico al 95%. Mezclar 75 mL de la solución de verde de bromocresol con 25 mL de la solución de rojo de metilo y diluir la mezcla a 200 mL con alcohol etílico

## A2. ANEXO 2

### A2.1 MEDIOS DE CULTIVO

#### A2.1.2 Para bacterias del género *Pseudomonas* (King et al., 1954)

##### a) Medio King A (Medio P)

FORMULACIÓN:	1000 mL
Peptona de Gelatina	2g
MgCl <sub>2</sub>	0.14g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5g
Glicerina	10 mL
Agar	14g
pH	6.8-7.2

##### b) Medio King B (Medio F)

FORMULACIÓN:	1000 mL
Peptona de Caseína*	10g
Peptona de Carne*	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.5g
Glicerina	10 mL
Agar	14g
pH	6.8-7.2

\* Pueden sustituirse por 20g/L de polipeptona.

##### c) Medio Agar Cetrimida (MERCK, 1982)

Para preparar agar Cetrimida sólo se añaden 0.3 g/l, al medio King B (F).

La cetrimida (bromuro de cetiltrimetilamonio) recomendado en 1951, sirve para conseguir una notable inhibición de la flora acompañante diferentes al género *Pseudomonas*.

#### A2.1.3 Para bacterias del género *Azospirillum*

##### a) Medio Nfb semisólido (Larrand et al., 1978).

FORMULACIÓN:	1000 mL
Acido succínico	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (10%)	10mL
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (4%)	10mL
NaCl (2%)	10mL
CaCl <sub>2</sub> (1%)	4mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.002g
FeEDTA (1.64%)	4mL
Biotina (0.01%)	2mL
Azul de bromotimol* (0.5%)	4mL
Agar	14g
pH	7.0

##### b) Medio Tyler (Jain y Patriquin, 1984).

FORMULACIÓN:	1000 mL
Succinato de sodio	2.5g
Fructuosa*	2.5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> **	6g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> **	4g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2g
NaCl	0.1g
CaCl <sub>2</sub>	0.02g
FeCl <sub>3</sub>	0.01g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.002g
Agar	14g
pH	6.8-7.0

Ver siguiente hoja

\*La fructuosa se esteriliza por separado (250mL de agua destilada).

\*\*La fuente de fósforo se esteriliza por separado (250mL de agua destilada).

Se mezclan una vez frías las soluciones y bajo condiciones de asepsia.

**NOTA:** Cuando el medio es líquido se le adiciona 1g/l de NH<sub>4</sub>Cl

c) Medio Rojo Congo (Rodríguez-Cáceres, 1982).

FORMULACIÓN:	1000 mL
Acido málico	5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.1
Extracto de Levadura	0.5
l'cCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.015g
KOH	4.8g
Agar	14g
pH	6.8

Fundir y agregar 1.5 mL de Rojo Congo (solución acuosa 1:400)

d) Agar Papa Dextrosa (Döbereiner y Baldani, 1979).

FORMULACIÓN:	1000 mL
Papa*	200g
Acido L-Málico	2.5g
KOH	2.0
NaCl	0.1
Azucar comercial	2.5
Solución de vitaminas	1mL
Agar	14g
pH	7

\*Hervir durante 30 minutos trozos de papa (con cáscara y lavadas). Filtrar a través de algodón.

Mezclar todos los reactivos en este filtrado junto con el agar previamente disuelto, y completar el volumen.

d) Medio Malato Sales (Tarrand et al., 1978).

El siguiente medio es en líquido (sin agar). Se emplea la misma formulación para el medio Nfb semisólido, pero sin adicionar el azul de bromotimol; se sustituye el ácido succínico por ácido málico y se adiciona NH<sub>4</sub>Cl 1g/L.

A2.1.4 Para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre

a) Medio Lipman L (Echegaray y Ramírez-Gama, 1980)

FORMULACIÓN:	1000 mL
Sacarosa (no purificada)	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2g
CaCl <sub>2</sub>	0.02g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.002g
FeCl <sub>2</sub>	0.01g
CaCO <sub>3</sub> *	1.0g
Azul de bromotimol** (0.5%)	5.0mL
Agar	14g
pH	7.0

\*adicionar únicamente para conservar en tubo

\*\*solución alcohólica

b) Medio Waksman 77 (Sánchez, 1964).

FORMULACIÓN:	1000 mL
Manitol	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2g
NaCl	0.2g
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.005g
FeCl <sub>3</sub>	0.005g
Agar	14g
pH	7

### A2.1.5 Para bacterias solubilizadoras de fósforo (Ramos-Callao, 1967)

Medio Ramos Callao (Glucosa con fósforo precipitado)

FORMULACIÓN:	1000 mL
Extracto de levadura	2 g
Glucosa	20g
Agar	20g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *	10%
CaCl <sub>2</sub> *	10%
pH	7.0

\*Las soluciones se esterilizan por separado, después se mezclan en una relación 1:0.5 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:CaCl<sub>2</sub>) y se adiciona al medio (5 mL/100mL de medio) de cultivo previamente esterilizado y fundido.

### A2.1.6 Para Enterobacterias

a) Agar ENDO (MERCK, 1982)

FORMULACIÓN:	1000 mL
Peptona de carne	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5 g
Lactosa	10 g
Sulfito de sodio anhidro	3.3 g
Fucsina	0.3 g
Agar	12.5 g
pH	7.4 ± 0.2

b) Agar McConkey (MERCK, 1982)

FORMULACIÓN:	1000 mL
Peptona de caseína	17 g
Peptona de carne	3 g
NaCl	5 g
Lactosa	10 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agar	13.5 g
pH	7.1 ± 0.1

### A2.1.7 Medio Enriquecido

Gelosa Nutritiva (MERCK, 1982).

FORMULACIÓN:	1000 mL
Extracto de carne	3g
Peptona de carne	5g
Agar	14g
pH	7.0

### A2.2 SOLUCIÓN NUTRITIVA

NUTRIMENTOS	17.5 L de agua destilada
KNO <sub>3</sub>	11.16 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	12.75 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.35 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	9.58 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.31 g

Concentración media (pH 6.7-7.0 y conductividad eléctrica 1.0 mS).

Concentración completa (pH 6.7-7.0 y conductividad eléctrica 1.2 mS).

### A.2.3 REACTIVOS DE SALKOWSKI

a) Según Bric et al., 1990.

FeCl <sub>3</sub> 0.5M	2 mL
HClO <sub>4</sub>	48.8 mL
H <sub>2</sub> O destilada	51.2 mL

2% de FeCl<sub>3</sub> 0.5M + 35% de HClO<sub>4</sub>

b) Según Gordon y Weber, 1951.

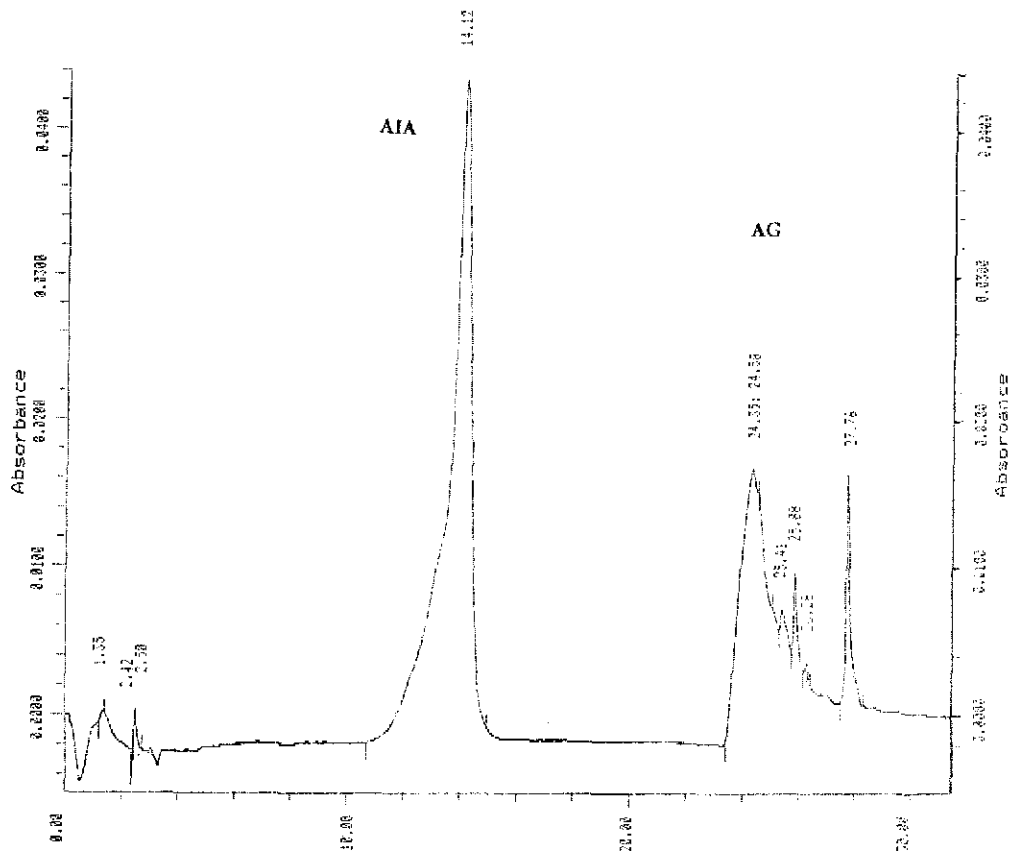
FeCl <sub>3</sub>	3 mL
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60 mL
H <sub>2</sub> O destilada	100 mL



### A3. ANEXO 3

#### A3.1. CROMATOGRAMAS DE FITOHORMONAS (AC. INDOL-3-ACÉTICO Y AC. GIBERÉLICO) EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS BACTERIANOS.

##### A3.1.1. Estandares de ácido indol-3-acético (AIA) y ácido giberélico (AG).

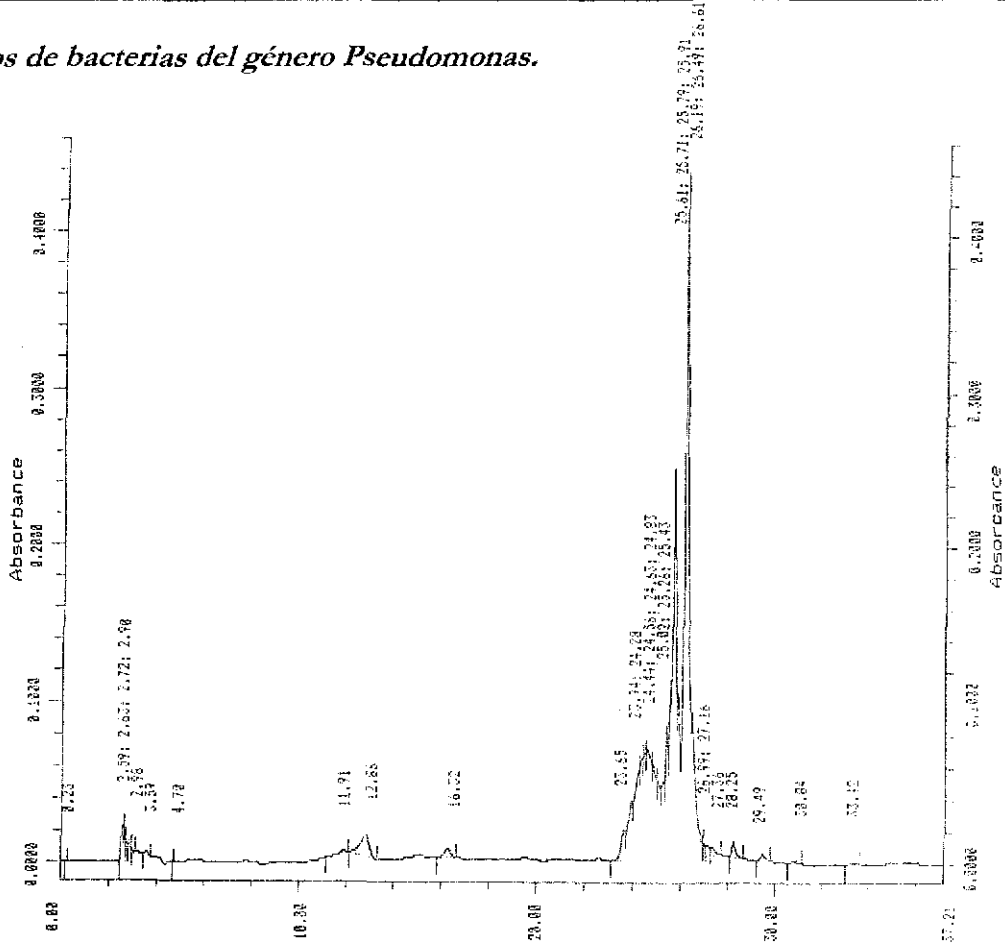


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A3.1.2. Cultivos de bacterias del género *Pseudomonas*.

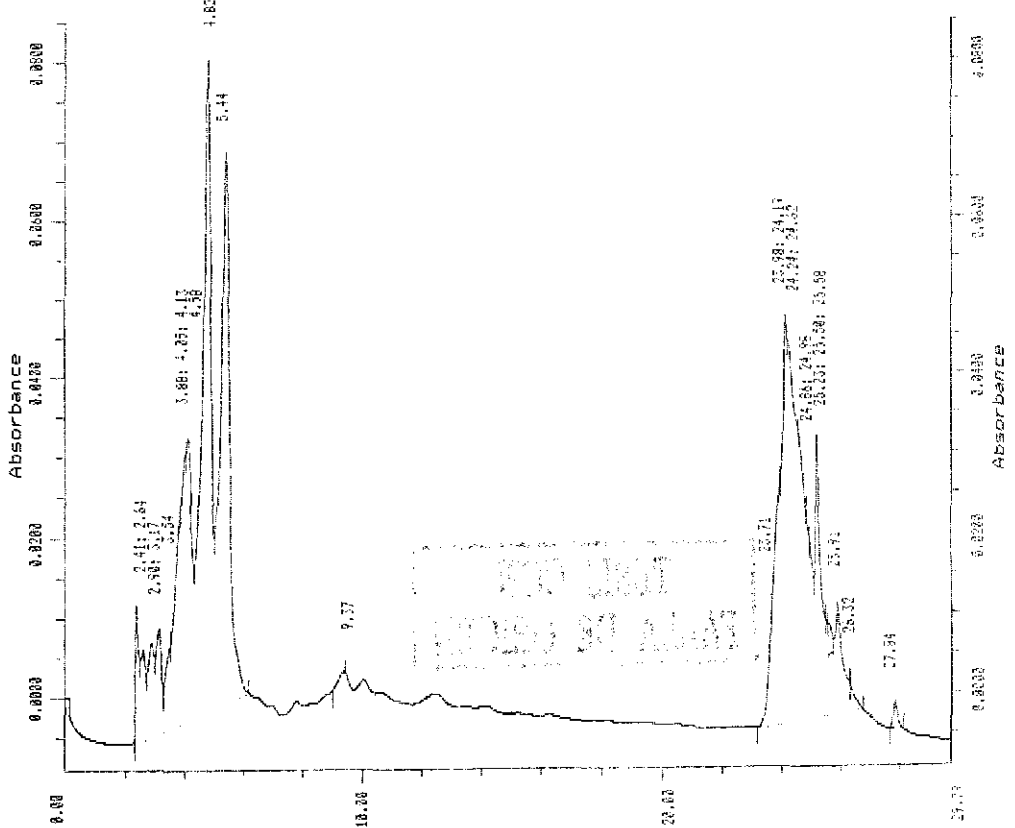
A3.1.2.1.

Medio de Cultivo King B



A3.1.2.2.

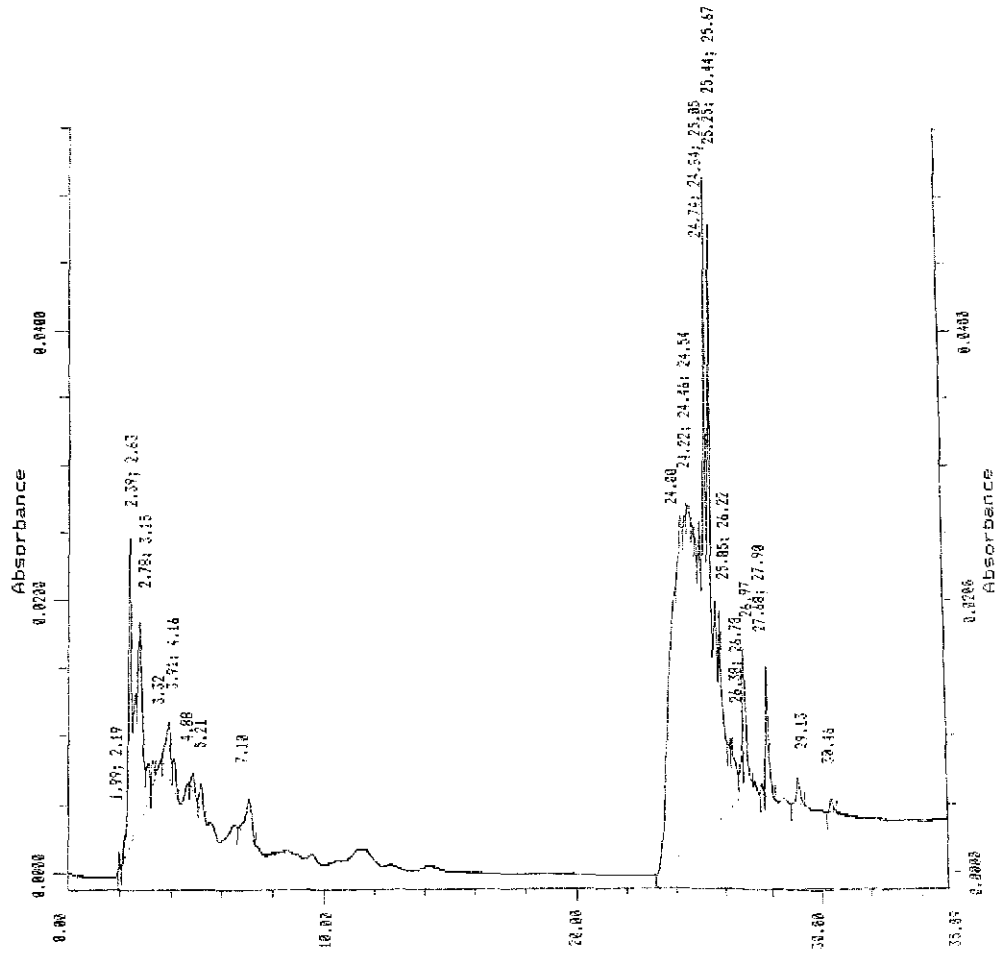
Cultivo bacteriano de la cepa P7.m2.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A3.1.2.3.

Cultivo bacteriano de la cepa PA51.

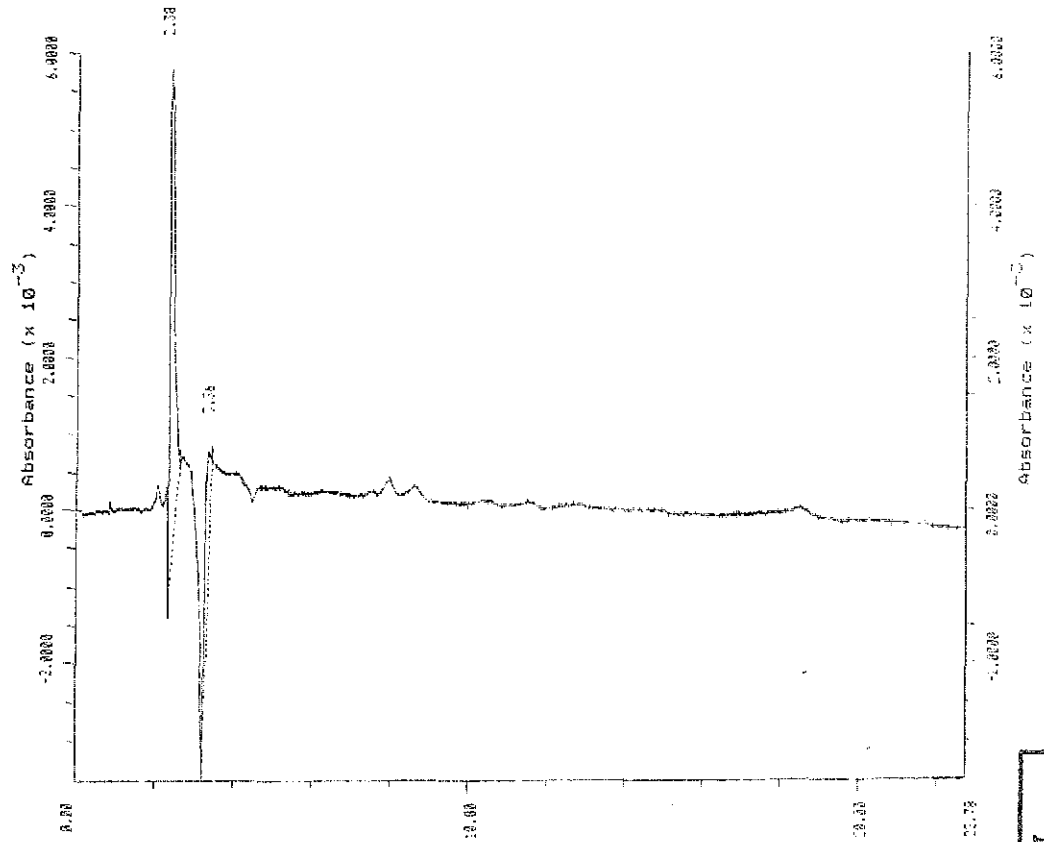


TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A3.1.3. Cultivos de bacterias del género *Azospirillum*.

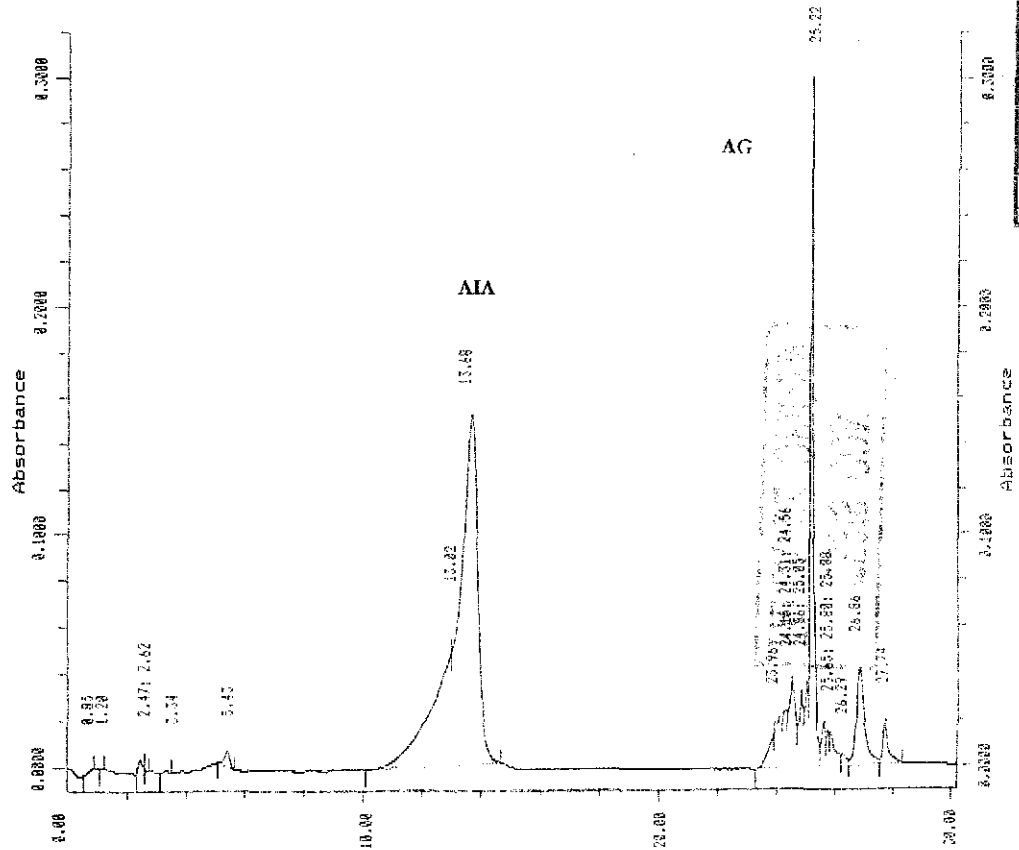
A.3.1.3.1

Medio de Cultivo Tyler



A3.1.3.2.

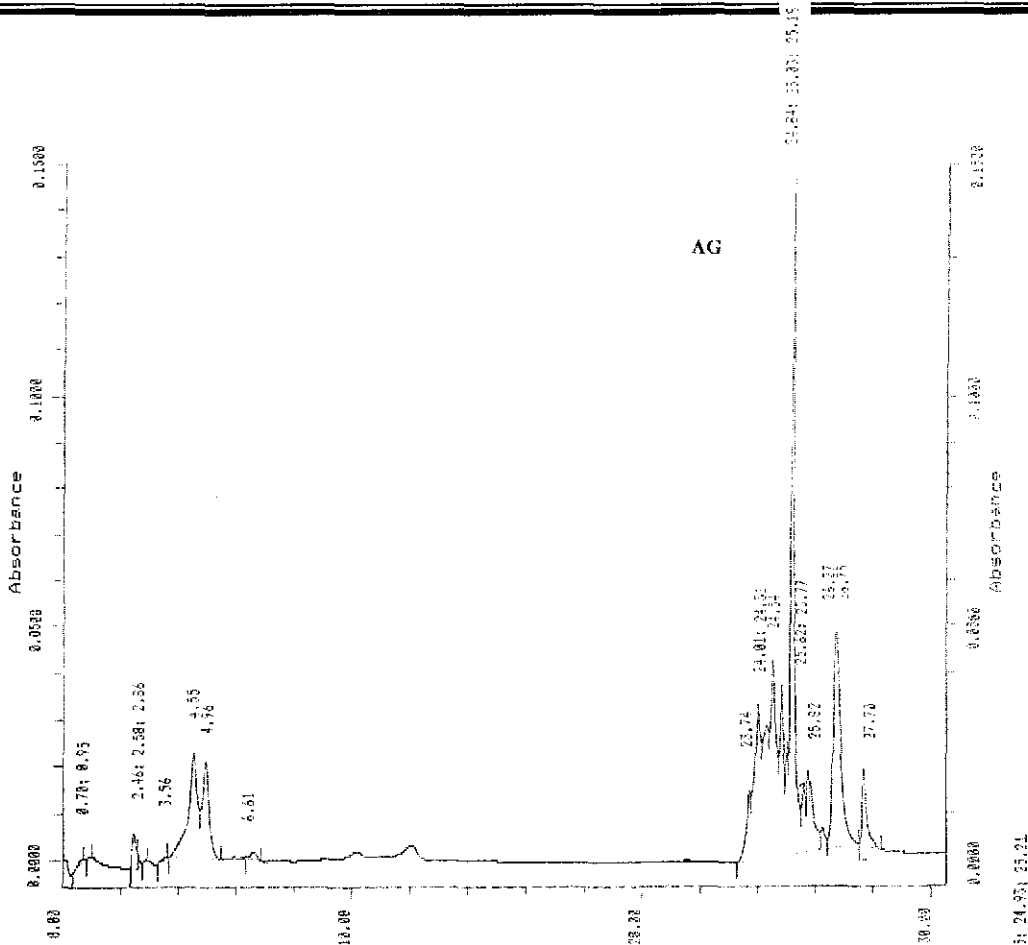
Cultivo bacteriano de la cepa VS9.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A3.1.3.3.

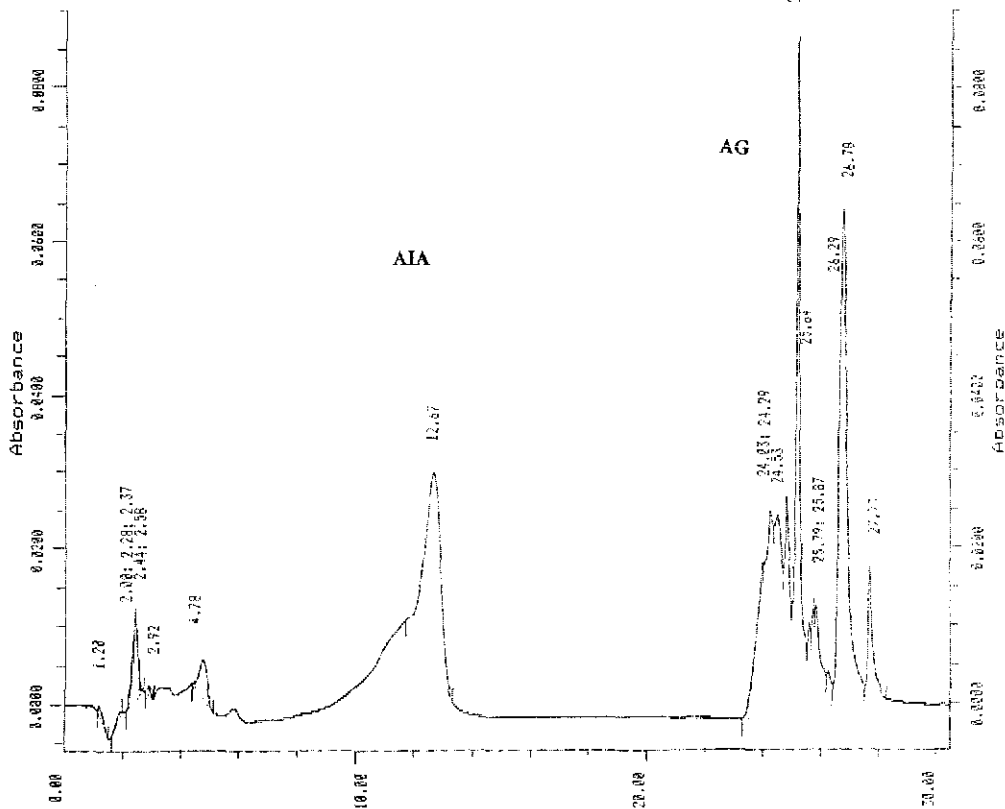
Cultivo bacteriano de la cepa AZm5.



A3.1.3.4.

Cultivo bacteriano de la cepa AMs3.

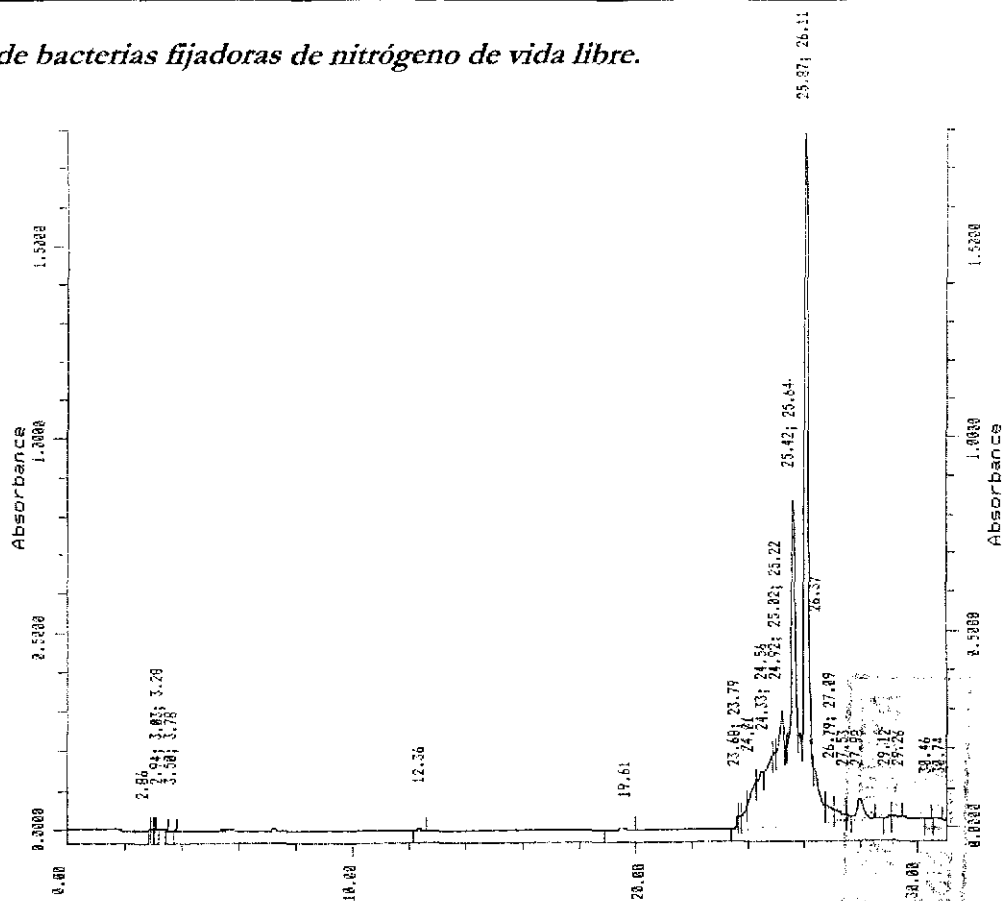
TESIS CON FALLA DE ORIGEN



A3.1.4. Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

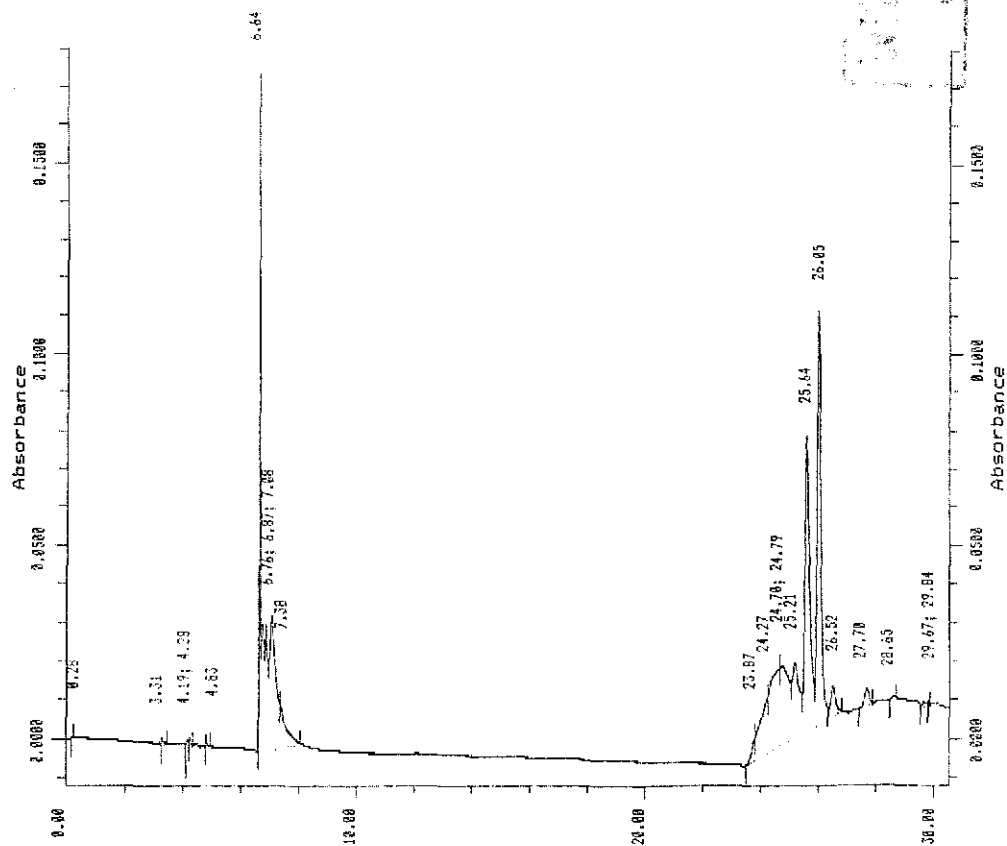
A.3.1.4.1

Medio de Cultivo Lipman



A.3.1.4.2

Cultivo Bacteriano de la cepa R2P2B

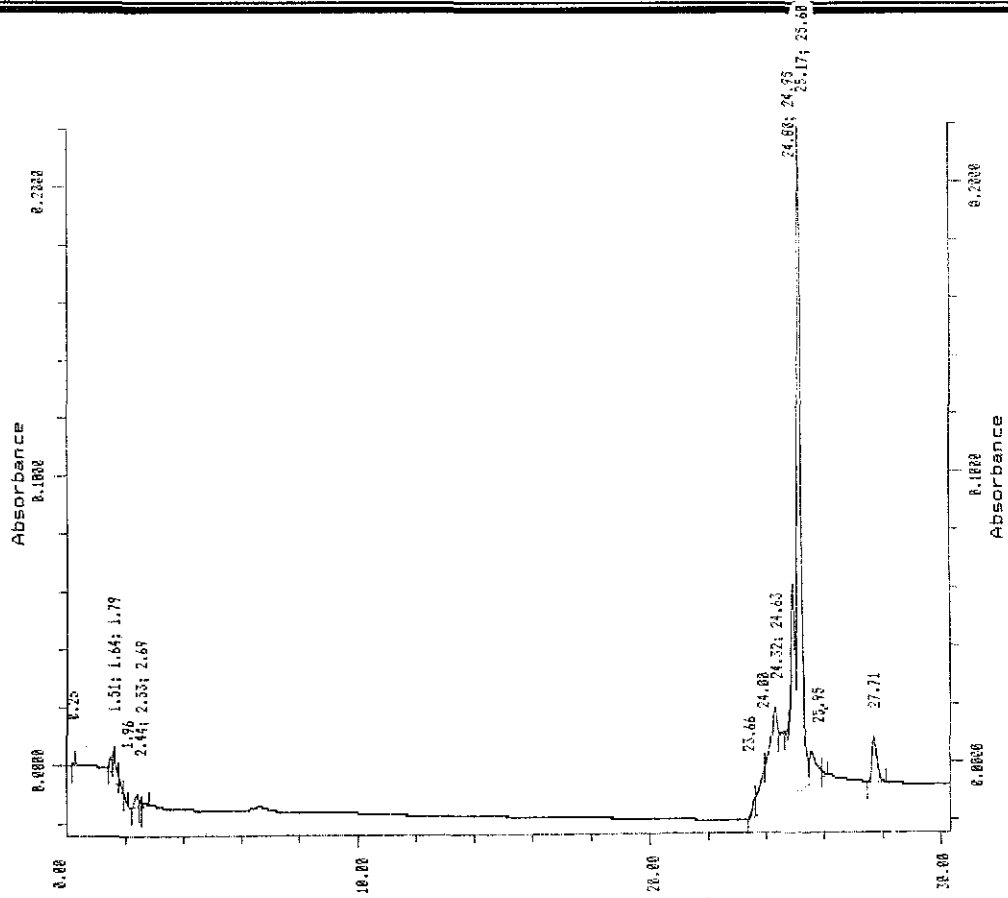


TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A.3.1.4.3

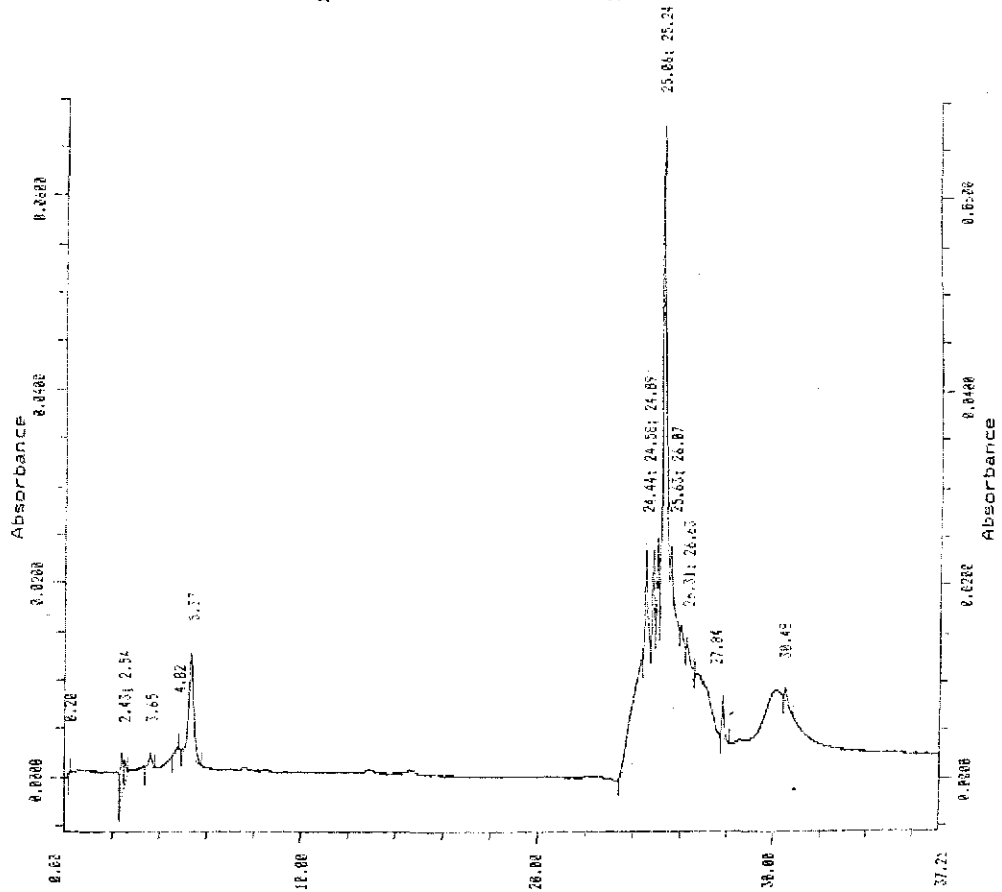
Cultivo  
Bacteriano  
de la cepa  
S5BE

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



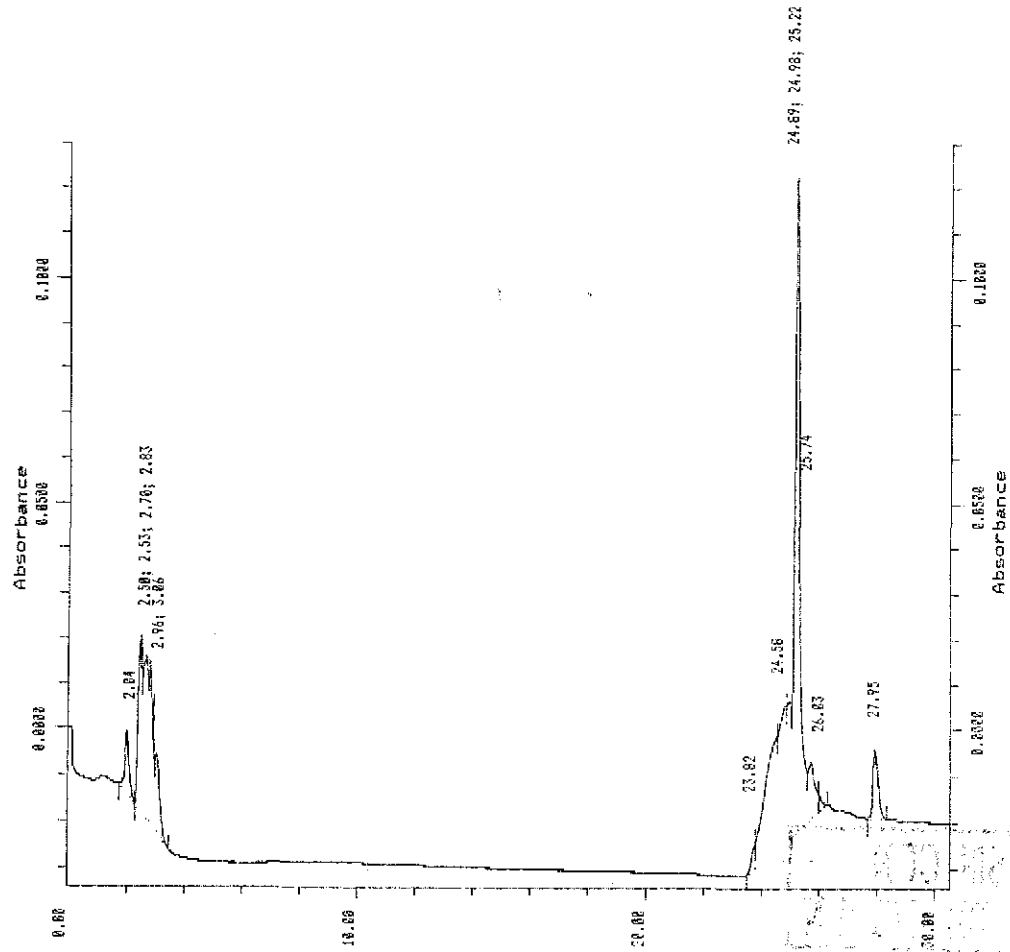
A.3.1.4.4

Cultivo  
Bacteriano  
de la cepa  
FLe1



A.3.1.4.5

Cultivo  
Bacteriano  
de la cepa  
FLA



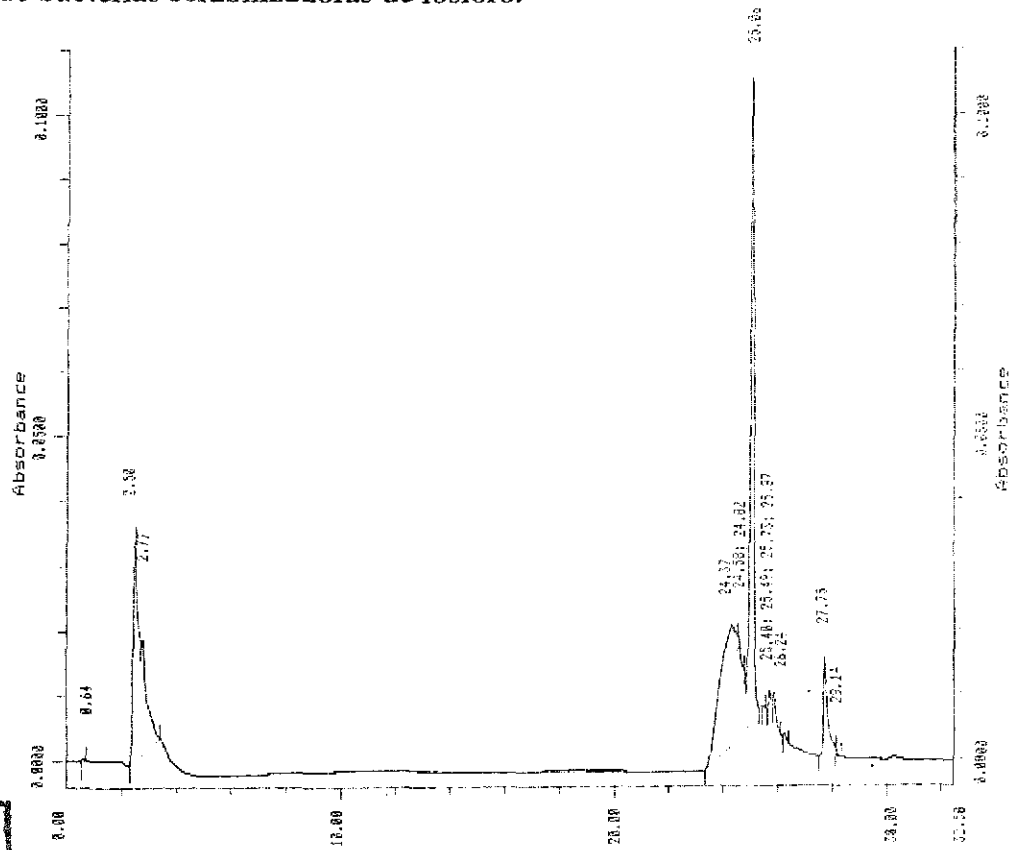
TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN



A3.1.5. Cultivos de bacterias solubilizadoras de fósforo.

A.3.1.5.1

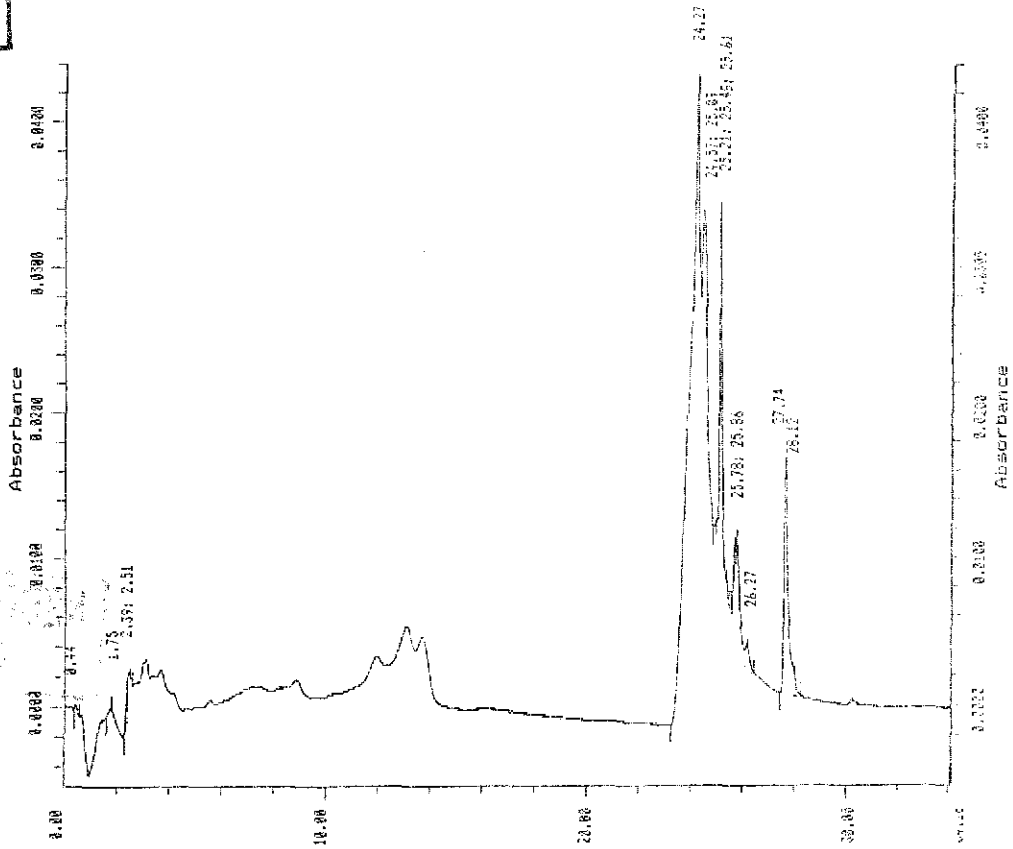
Medio de Cultivo Ramos-Callao



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

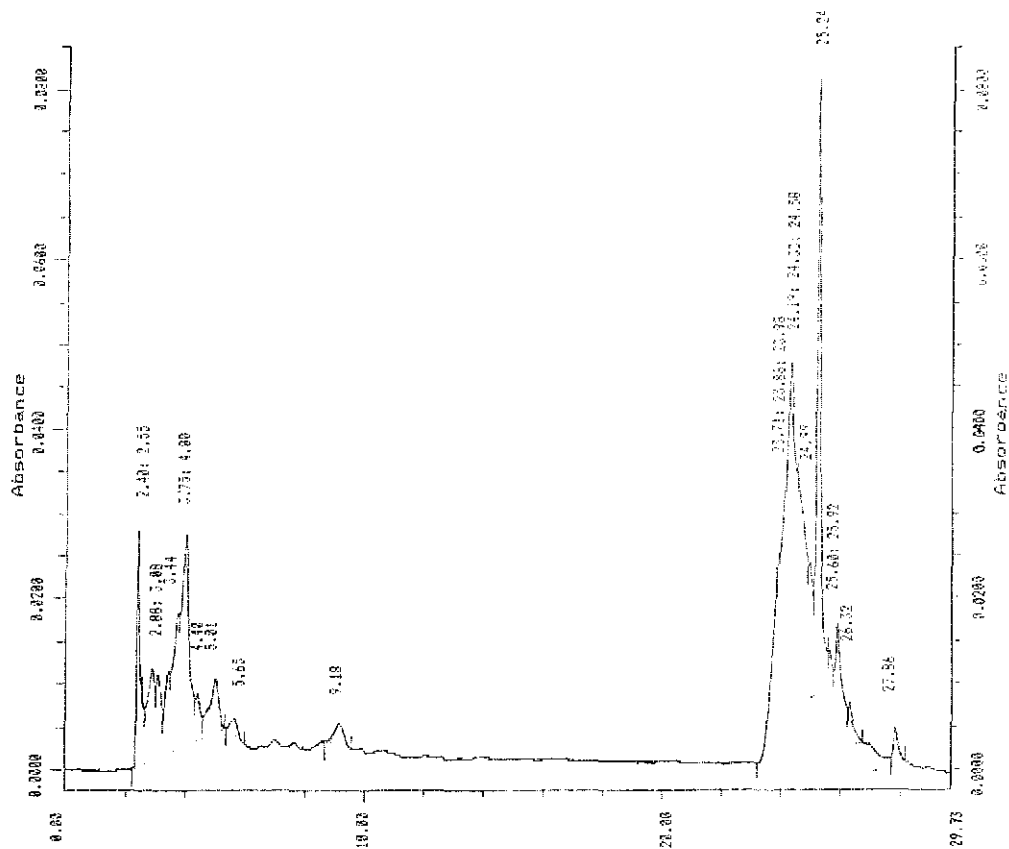
A.3.1.5.2

Cultivo Bacteriano de la cepa SZm1



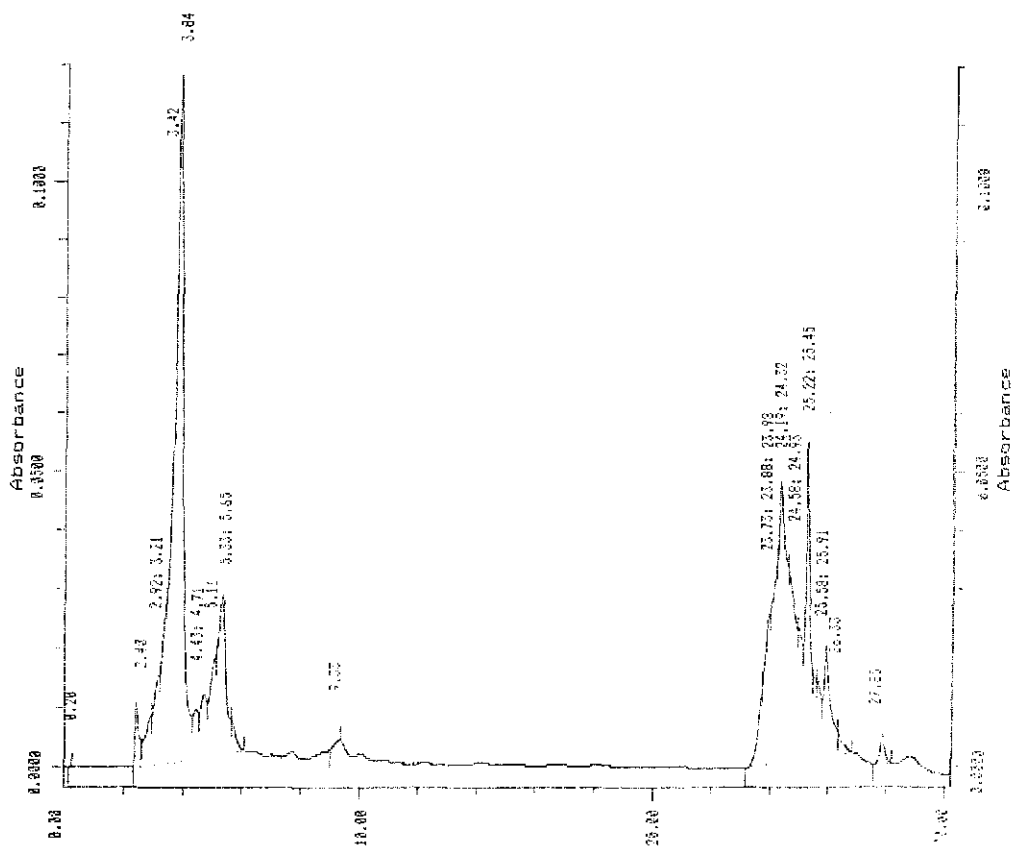
A.3.1.5.3

Cultivo Bacteriano de la cepa SMs1



A.3.1.5.4

Cultivo Bacteriano de la cepa SMs2



# A4. ANEXO 4

## A4.1. RESULTADOS DEL SISTEMA API LAB PLUS DE BioMERIEUX. Software V 3.3.3.

Reference : PZm2 Date : 14/05/2001  
 VERY GOOD IDENTIFICATION  
 Ps.fluorescens

Strip : API 20 NE V6.0 Read on: 05/04/2001  
 Profile : 1 0 4 7 5 5 5

NO3 + TRP - GLU - ADH - URE - ESC - GEL - PNPG- GLUa+ ARa+ MNEa+  
 MANa+ NAGa+ MALa- GNTa+ CAPa+ ADIa- MLTa+ CITa+ PACa- OX +

----- Significant taxa -----	% Id.	T	Tests against
Ps.fluorescens	99.1	0.83	1
Next choice Ochrobac.anthropi	0.7	0.60	3

Ps.fluorescens : 1 test(s) against

ARGININE DIHYDROLASE (ADH ) 80 %

Next choice

Ochrobac.anthropi : 3 test(s) against

UREASE (URE ) 84 % MANNITOL (ASSIMILATION) (MANa) 20 %  
 MALTOSE (ASSIMILATION) (MALa) 76 %

Reference : PMS1

Date : 14/05/2001

VERY GOOD IDENTIFICATION

Ps. fluorescens

Strip : API 20 NE

V6.0

Read on: 29/11/2000

Profile : 1 0 5 7 5 5 5

NO3 + TRP - GLU - ADH - URE - ESC - GEL + PNPG- GLUa+ ARAa+ MNEa+  
 MANa+ NAGa+ MALa- GNTa+ CAPa+ ADIa- MLTa+ CITa+ PACa- OX +

----- Significant taxa -----	% Id.	T	Tests against
Ps fluorescens	99.6	0.80	1
Next choice			
Burkhol.cepacia	0.3	0.44	2

Ps fluorescens : 1 test(s) against

ARGININE DIHYDROLASE (ADH) 80 %

Next choice

Burkhol.cepacia : 2 test(s) against

ADIPATE (ASSIMILATION) (ADIa) 93 % PHENYL-ACETATE (ASSIMILA (PACa) 99 %

Reference : PMS2

Date : 14/05/2001

EXCELLENT IDENTIFICATION

Ps. fluorescens

Strip : API 20 NE

V6.0

Read on: 05/04/2001

Profile : 1 1 5 7 5 5 5

NO3 + TRP - GLU - ADH + URE - ESC - GEL + PNPG- GLUa+ ARAa+ MNEa+  
 MANa+ NAGa+ MALa- GNTa+ CAPa+ ADIa- MLTa+ CITa+ PACa- OX +

----- Significant taxa -----	% Id.	T	Tests against
Ps. fluorescens	99.9	0.90	0
Next choice			
Ps. aeruginosa	0.1	0.19	3

Ps. fluorescens : 0 test(s) against

Next choice

Ps. aeruginosa : 3 test(s) against

L-ARABINOSE (ASSIMILATIO (ARAa) 1 % MANNOSE (ASSIMILATION) (MNEa) 1 %  
 ADIPATE (ASSIMILATION) (ADIa) 91 %

Reference : PMS3

Date : 14/05/2001

EXCELLENT IDENTIFICATION

Ps.fluorescens

Strip : API 20 NE

V6.0

Read on: 05/04/2001

Profile : 1 1 5 7 5 5 5

NO3 + TRP - GLU - ADH + URE - ESC - GEL + PNPG- GLUa+ ARAa+ MNEa+  
 MANa+ NAGa+ MALa- GNTa+ CAPa+ ADIa- MLTa+ CITa+ PACa- OX +

----- Significant taxa -----	% Id.	--- T ---	Tests against
Ps.fluorescens	99.9	0.90	0
Next choice			
Ps.aeruginosa	0.1	0.19	3

Ps.fluorescens : 0 test(s) against

Next choice

Ps.aeruginosa : 3 test(s) against

L-ARABINOSE (ASSIMILATIO (ARAa) 1 %      MANNOSE (ASSIMILATION) (MNEa) 1 %  
 ADIPATE (ASSIMILATION) (ADIa) 91 %

Reference : PMS4

Date : 14/05/2001

EXCELLENT IDENTIFICATION

Ps.fluorescens

Strip : API 20 NE

V6.0

Read on: 05/04/2001

Profile : 1 1 5 7 5 5 5

NO3 + TRP - GLU - ADH + URE - ESC - GEL + PNPG- GLUa+ ARAa+ MNEa+  
 MANa+ NAGa+ MALa- GNTa+ CAPa+ ADIa- MLTa+ CITa+ PACa- OX +

----- Significant taxa -----	% Id.	--- T ---	Tests against
Ps.fluorescens	99.9	0.90	0
Next choice			
Ps.aeruginosa	0.1	0.19	3

Ps.fluorescens : 0 test(s) against

Next choice

Ps.aeruginosa : 3 test(s) against

L-ARABINOSE (ASSIMILATIO (ARAa) 1 %      MANNOSE (ASSIMILATION) (MNEa) 1 %  
 ADIPATE (ASSIMILATION) (ADIa) 91 %

Reference : PA81 Date : 14/05/2001

VERY GOOD IDENTIFICATION

Ps. fluorescens

Strip : API 20 NH V6.0 Read on: 05/04/2001

Profile : 1 0 5 7 5 5 5

NO3 + TRP - GLU - ADH - URE - ESC - GEL + PNP- GLUa+ ARAa+ MNEa+  
 MANa+ NAGa+ MALa- GNTa+ CAPa+ ADIa- MLTa+ CITa+ PACa- OX +

Significant taxa	% Id.	T	Tests against
Ps fluorescens	99.6	0.80	1
Next choice Burkhol. cepacia	0.3	0.44	2

Ps fluorescens : 1 test(s) against

ARGININE DIHYDROLASE (ADH) 80 %

Next choice  
Burkhol. cepacia : 2 test(s) against

ADIPATE (ASSIMILATION) (ADIa) 93 % PHENYL-ACETATE (ASSIMILA (PACa) 99 %

Reference : S2m1 Date : 14/05/2001

GOOD IDENTIFICATION

Pantoea spp 1

Strip : API 50 CHE V3.0 Read on: 22/02/2001

Profile : -?--++++- +++++-?+ -+----- +-----? -+---??  
 +---+-+---+-

0 - GLY ? ERY - DARA- LARA+ RIB + DXYL+ LXYL- ADO - MDX - GAL +  
 GLU + FRU + MNE + SBE - RHA - DUL - INO ? MAN + SOR - MDM - MDG -  
 NAG + AMY - ARB + ESC + SAL + CEL - MAL - LAC - MEL + SAC + TRE +  
 INU - MLZ - RAF - AMD - GLYG- XLT - GEN ? TUR - LYX - TAG - DFUC-  
 LFUC- DARL+ LARL- GNT ? 2KG ? SKG - ONPG+ ADH - LDC - ODC - CIT +  
 H2S - URE - TDA - IND - VP + GEL -

Significant taxa	% Id.	T	Tests against
Pantoea spp	1	99.0	0.43 3
Next choice Erwinia spp	0.6	0.20	4

POSSIBILITY OF Erwinia spp

Pantoea spp 1 : 3 test(s) against

L-RHAMNOSE (RHA) 80 % D-MALTOSE (MAL) 80 %  
 MELIBIOSE (MEL) 11 %

Next choice  
Erwinia spp : 4 test(s) against

L-RHAMNOSE (RHA) 87 % CELLOBIOSE (CEL) 92 %  
 RAFFINOSE (RAF) 86 % D-ARABITOL (DARL) 1 %

Reference : SZm2

Date : 14/05/2001

VERY GOOD IDENTIFICATION

*Brevibacillus brevis*

Strip : API 50 CHB

V3 0

Read on: 23/02/2001

Profile : -----+-----++-----

+---+---+---+---+

0 - GLY - ERY - DARA- LARA- RIB - DXYL- LXYL- ADO - MDX - GAL +  
 GLU - FRU - MNE - SBE - RHA - DUL - INO - MAN - SOR - MDM - MDG -  
 NAG - AMY - ARE - ESC - SAL - CEL - MAL - LAC - MEL - SAC + TRE +  
 INU - MLZ - RAF - AMD - GLYG- XLT - GEN - TUR - LYX - TAG - DFUC-  
 LPUC- DARL- LARL- GNT - 2KG - 5KG - ONPG+ ADH - LDC - ODC - CIT +  
 H2S - URE + TDA - IND - VP - GEL - NIT +

Significant taxa	% Id.	T	Tests against
<i>Brevibacillus brevis</i>	99.9	0.58	6
Next choice <i>Bacillus sphaericus</i>	0.1	0.18	7

*Brevibacillus brevis* : 6 test(s) against

GALACTOSE (GAL)	10 %	SACCHAROSE (SAC)	11 %
TREHALOSE (TRE)	15 %	β-GALACTOSIDASE (ONPG)	25 %
CITRATE (CIT)	18 %	UREASE (URE)	11 %

Next choice  
*Bacillus sphaericus* : 7 test(s) against

GALACTOSE (GAL)	8 %	SACCHAROSE (SAC)	1 %
TREHALOSE (TRE)	0 %	β-GALACTOSIDASE (ONPG)	5 %
CITRATE (CIT)	8 %	UREASE (URE)	18 %
REDUCTION DU NITRATE (NIT)	13 %		

Reference : PAS2

Date : 14/05/2001

EXCELLENT IDENTIFICATION

*Ps. fluorescens*

Strip : API 20 NR

V6.0

Read on: 05/04/2001

Profile : 1 1 5 7 5 5 5

NO3 + TRP - GLU - ADH + URE - ESC - GEL + PNPG- GLUa+ ARAa+ MNEa+  
 MANa+ NAGa+ MALa- GNTa+ CAPa+ ADIa- MLTa+ CITa+ PACa- OX +

Significant taxa	% Id.	T	Tests against
<i>Ps. fluorescens</i>	99.9	0.90	0
Next choice <i>Ps. aeruginosa</i>	0.1	0.19	3

*Ps. fluorescens* : 0 test(s) against

Next choice  
*Ps. aeruginosa* : 3 test(s) against

L-ARABINOSE (ASSIMILATION) (ARAa)	1 %	MANNOSE (ASSIMILATION) (MNEa)	1 %
ADIPATE (ASSIMILATION) (ADIa)	91 %		

Reference : SMS1

Date : 14/05/2001

GOOD IDENTIFICATION

Ps.fluorescens

Strip : API 20 NE

V6.0

Read on: 23/02/2001

Profile : 1 0 4 7 4 5 5

NO3 + TRP - GLU - ADH - URE - ESC - GEL - PNPg- GLUa+ ARAa+ MNEa+  
 MANa+ NAGa- MALa- GNTa+ CAPa+ ADIa- MLTa+ CITa+ PACa- OX +

Significant taxa	% Id.	T	Tests against
Ps fluorescens	92.3	0.71	2
Next choice Pseudomonas stutzeri	4.2	0.44	3

Ps fluorescens : 2 test(s) against

ARGININE DIHYDROLASE (ADH)	80 %	N-ACETYL-GLUCOSAMINE (AS (NAGa))	85 %
----------------------------	------	----------------------------------	------

Next choice

Pseudomonas stutzeri : 3 test(s) against

L-ARABINOSE (ASSIMILATIO (ARAa))	1 %	MANNOSE (ASSIMILATION) (MNEa)	10 %
MALTOSE (ASSIMILATION) (MALa)	75 %		

Reference : SMS2

Date : 14/05/2001

GOOD IDENTIFICATION

Ps.fluorescens

Strip : API 20 NE

V6.0

Read on: 09/02/2001

Profile : 1 0 4 7 4 5 5

NO3 + TRP - GLU - ADH - URE - ESC - GEL - PNPg- GLUa+ ARAa+ MNEa+  
 MANa+ NAGa- MALa- GNTa+ CAPa+ ADIa- MLTa+ CITa+ PACa- OX +

Significant taxa	% Id.	T	Tests against
Ps.fluorescens	92.3	0.71	2
Next choice Pseudomonas stutzeri	4.2	0.44	3

Ps fluorescens : 2 test(s) against

ARGININE DIHYDROLASE (ADH)	80 %	N-ACETYL-GLUCOSAMINE (AS (NAGa))	85 %
----------------------------	------	----------------------------------	------

Next choice

Pseudomonas stutzeri : 3 test(s) against

L-ARABINOSE (ASSIMILATIO (ARAa))	1 %	MANNOSE (ASSIMILATION) (MNEa)	10 %
MALTOSE (ASSIMILATION) (MALa)	75 %		



## ANEXO 5

## BIOENSAYO 1

Tabla B1.1 ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F <sup>a</sup>
Altura de la parte aérea	Between Groups	52.147	16	3.259	1.384
	Within Groups	183.701	78	2.355	
	Total	235.848	94		
Número de hojas	Between Groups	16.625	16	1.039	1.853
	Within Groups	43.733	78	.561	
	Total	60.358	94		
Longitud de la raíz	Between Groups	1206.166	16	75.385	2.169
	Within Groups	2710.469	78	34.750	
	Total	3916.635	94		
Peso fresco de la raíz	Between Groups	.178	16	1.11E-02	.920
	Within Groups	.942	78	1.21E-02	
	Total	1.120	94		
Peso fresco de la parte aérea	Between Groups	.729	16	4.56E-02	1.688
	Within Groups	2.106	78	2.70E-02	
	Total	2.836	94		
Peso seco de la parte aérea	Between Groups	3.32E-03	16	2.07E-04	1.645
	Within Groups	9.83E-03	78	1.26E-04	
	Total	1.32E-02	94		

a. F 0.05,16,78 = 1.84

Tabla B1.2 Altura de la parte aérea

Tukey B<sup>a,b</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05	
	b	a
FLe1	3.8400	
PLe2	5.0833	5.0833
FZm1	5.5500	5.5500
PZm1	5.6833	5.6833
PMs1	5.8000	5.8000
Testigo	5.8333	5.8333
PMs4	5.9167	5.9167
PAs1	6.0833	6.0833
FAs1	6.1400	6.1400
PLe1	6.2000	6.2000
PAs2	6.2667	6.2667
PMs2	6.2800	6.2800
PZm2	6.4000	6.4000
PMs3	6.6400	6.6400
SZm1	6.8333	6.8333
FZm2	6.9167	6.9167
FMs1		7.3000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.543.  
 b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B1.3 Número de hojas

Tukey B<sup>a,b</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05	
	a	
Testigo		1.0000
FLe1		1.2000
FZm1		1.3333
PMs4		1.3333
PLe2		1.3333
FAs1		1.4000
PLe1		1.8000
PAs1		1.8333
PMs1		1.8333
FZm2		2.0000
PZm1		2.0000
PAs2		2.1667
SZm1		2.1667
FMs1		2.2000
PZm2		2.2000
PMs2		2.2000
PMs3		2.4000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.543.  
 b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B1.4 Longitud de la raíz

Tukey B<sup>a,b</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05	
	b	a
Testigo	14.1667	
FLe1	17.3200	17.3200
PMs4	18.3667	18.3667
PMs2	20.0200	20.0200
PAs1	20.3833	20.3833
PAs2	20.8667	20.8667
PLe2	21.0500	21.0500
FZm1	21.2000	21.2000
PZm2	21.4000	21.4000
PLe1	21.5600	21.5600
SZm1	22.3000	22.3000
FAs1	22.4000	22.4000
FZm2	24.2333	24.2333
FMs1	26.5000	26.5000
PZm1		26.9167
PMs3		26.9200
PMs1		27.7167

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.543
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B1.5 Peso fresco de la raíz

Tukey B<sup>a,b</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05
	a
Testigo	1033
FLe1	1260
PLe2	1483
PMs1	1672
PMs4	1683
FAs1	1840
PMs2	1960
FZm2	2117
FZm1	2117
PZm2	2120
PAs1	2167
PLe1	2200
PMs3	2220
PAs2	2250
PZm1	2267
SZm1	2650
FMs1	2680

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.543

Tabla B1.6 Peso fresco de la parte aérea

Tukey B<sup>a,b</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05
	a
FLe1	5.98E-02
Testigo	.1683
PMs4	.1917
PMs1	.2183
FAs1	.2360
PZm1	.2467
PLe1	.2560
FZm1	.2667
PLe2	.3000
PMs2	.3120
PAs1	.3167
FMs1	.3560
PMs3	.3700
FZm2	.3767
PAs2	.3767
PZm2	.3860
SZm1	.3883

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.543
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B1.7 Peso seco de la parte aérea

Tukey B<sup>a,b</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05
	a
FLe1	1.02E-02
PLe2	1.27E-02
Testigo	1.43E-02
FAs1	1.60E-02
PMs1	1.67E-02
PMs4	1.83E-02
PLe1	1.90E-02
PZm1	1.92E-02
FZm1	2.03E-02
PMs2	2.40E-02
PAs1	2.42E-02
PAs2	2.50E-02
FMs1	2.60E-02
PMs3	2.60E-02
FZm2	2.67E-02
PZm2	3.00E-02
SZm1	3.17E-02

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.543.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

BIOENSAYO 2

Tabla B2.1 ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F <sup>a</sup>
Altura de la parte aérea	Between Groups	135.002	17	7.941	3.287
	Within Groups	217.408	90	2.416	
	Total	352.410	107		
NO.HOJAS	Between Groups	9.296	17	.547	1.262
	Within Groups	39.000	90	.433	
	Total	48.296	107		
Longitud de la raíz	Between Groups	1227.861	17	72.227	2.424
	Within Groups	2681.817	90	29.798	
	Total	3909.677	107		
Peso fresco de la raíz	Between Groups	.888	17	5.23E-02	1.963
	Within Groups	2.396	90	2.66E-02	
	Total	3.285	107		
Peso fresco de la parte aérea	Between Groups	.955	17	5.62E-02	2.297
	Within Groups	2.202	90	2.45E-02	
	Total	3.157	107		

a. F 0.05,17,90= 1.84

Tabla B2.2 Altura de la parte aérea

Tukey B<sup>a</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05		
	c	b	a
Testigo	3.5000		
APv1	4.9167	4.9167	
VS1	5.3333	5.3333	
Sp7	5.5833	5.5833	5.5833
AZm2	5.6667	5.6667	5.6667
Cd	5.7500	5.7500	5.7500
C4	5.8333	5.8333	5.8333
Pox	5.8333	5.8333	5.8333
AZm4	5.8333	5.8333	5.8333
VS7	6.5000	6.5000	6.5000
AMs2	6.5000	6.5000	6.5000
AZm3	6.5000	6.5000	6.5000
AMs1		7.0000	7.0000
VS9		7.1000	7.1000
AZm1		7.1667	7.1667
AZm5		7.2500	7.2500
AMs3		7.6667	7.6667
AAs1			8.5833

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000

Tabla B2.3 Número de hojas

Tukey B<sup>a</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05
	a
AZm2	1.0000
AZm5	1.3333
C4	1.5000
AMs1	1.5000
Sp7	1.6667
Pox	1.8333
AAs1	1.8333
Testigo	1.8333
Cd	2.0000
VS1	2.0000
VS7	2.0000
VS9	2.0000
AMs2	2.0000
AMs3	2.0000
AZm3	2.0000
AZm4	2.0000
APv1	2.0000
AZm1	2.1667

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000

Tabla B2.4 Longitud de la raiz

Tukey B<sup>a</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05	
	b	a
C4	11.8333	
AZm2	12.6667	
Sp7	13.4167	
Testigo	14.5833	14.5833
VS1	15.0833	15.0833
AZm4	15.1667	15.1667
Cd	16.1833	16.1833
VS7	17.0833	17.0833
AMs2	17.9167	17.9167
AMs1	18.0333	18.0333
AZm3	18.5000	18.5000
AZm5	18.5833	18.5833
AZm1	19.0833	19.0833
VS9	19.3000	19.3000
AAAs1	19.9167	19.9167
AMs3	20.0000	20.0000
APv1	22.5000	22.5000
Pox		25.5833

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Tabla B2.5 Peso fresco de la raiz

Tukey B<sup>a</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05	
	a	
Testigo	1083	
AZm2	1117	
APv1	1750	
C4	1967	
AMs1	2100	
AZm1	2283	
VS7	2350	
AZm3	2433	
AMs2	2467	
Pox	3017	
Sp7	3133	
AMs3	3167	
AAAs1	3200	
Cd	3433	
AZm4	3450	
VS1	3683	
VS9	4200	
AZm5	4250	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Tabla B2.6 Peso fresco de la parte aérea

Tukey B<sup>a</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05	
	b	a
AZm2	.1350	
Testigo	.1617	
APv1	.1883	
Pox	.2050	.2050
C4	.2317	.2317
Cd	.2367	.2367
AMs1	.2500	.2500
Sp7	.2617	.2617
VS1	.2650	.2650
AZm3	.2783	.2783
AMs2	.2817	.2817
AAAs1	.3267	.3267
VS7	.3350	.3350
AZm1	.3517	.3517
AZm4	.3717	.3717
AMs3	.3733	.3733
VS9	.4350	.4350
AZm5		.5133

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

## BIOENSAYO 3

Tabla B3.1 ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F <sup>a</sup>
Altura de la parte aérea	Between Groups	100.513	17	5.913	1.443
	Within Groups	299.036	73	4.096	
	Total	399.549	90		
Número de hojas	Between Groups	29.867	17	1.757	1.374
	Within Groups	94.600	74	1.278	
	Total	124.467	91		
Longitud de la raíz	Between Groups	1041.138	17	61.243	1.613
	Within Groups	2809.587	74	37.967	
	Total	3850.726	91		
Peso fresco de la raíz	Between Groups	.140	17	8.21E-03	1.366
	Within Groups	.445	74	6.01E-03	
	Total	.585	91		
Peso fresco de la parte aérea	Between Groups	1.205	17	7.09E-02	1.619
	Within Groups	3.238	74	4.38E-02	
	Total	4.443	91		
Peso seco de la parte aérea	Between Groups	5.71E-03	17	3.36E-04	2.416
	Within Groups	1.03E-02	74	1.39E-04	
	Total	1.60E-02	91		

a. F 0.05,17,73= 1.84

Tabla B3.2 Altura de la parte aérea

Tukey B<sup>a,b</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05
	a
FLe4	3.6667
T2P10Az	4.6000
SLe1	4.8000
Testigo	4.8250
R1B	4.9167
R2P2B	5.0833
PLe3	5.0833
PLe4	5.6000
FLe7	5.8750
SLe2	5.8750
S5BE	6.1000
SAs1	6.2000
SZm1	6.4000
SZm2	6.8333
FLe5	6.9167
FLe6	7.2600
SMS1	7.3000
SMS2	7.7167

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.887.  
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B3.3 Número de hojas

Tukey B<sup>a,b</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05
	a
T2P10Az	1.1667
R1B	1.1667
Testigo	1.5000
PLe4	1.6000
R2P2B	1.6667
FLe7	1.7500
SLe2	1.7500
FLe4	2.0000
FLe6	2.0000
SLe1	2.0000
PLe3	2.0000
SAs1	2.2000
FLe5	2.3333
SZm2	2.6667
SMS1	2.8000
SZm1	2.8000
SMS2	2.8333
S5BE	3.0000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.932.  
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B3.4 Longitud de la raíz

Tukey B <sup>a,b</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05
	a
FLe4	7.1667
R1B	8.0000
SLe1	8.5000
Testigo	8.5000
T2P10Az	9.1667
PLe3	10.2500
R2P2B	11.8333
SLe2	12.3750
SAs1	13.0000
PLe4	13.0000
SZm2	13.5000
FLe6	14.2000
SMS1	14.6000
FLe7	15.2500
FLe5	15.4167
SZm1	15.6000
SMS2	17.8333
S5BE	19.6000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.932.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B3.5 Peso fresco de la raíz

Tukey B <sup>a,b</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05
	a
FLe4	3.3333E-02
Testigo	3.8750E-02
SLe1	4.2000E-02
PLe3	4.6667E-02
R2P2B	5.0000E-02
T2P10Az	5.0000E-02
R1B	6.0000E-02
SLe2	6.2500E-02
PLe4	6.8000E-02
SAs1	8.8000E-02
FLe6	9.6000E-02
FLe7	.10750
SZm2	.12167
FLe5	.12667
SMS2	.13000
SMS1	.13000
SZm1	.13400
S5BE	.16000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.932.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B3.6 Peso fresco de la parte aérea

Tukey B <sup>a,b</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05
	a
R1B	.1167
FLe4	.1467
R2P2B	.1567
SLe1	.1920
Testigo	.2100
T2P10Az	.2117
SLe2	.2550
PLe4	.2580
PLe3	.2600
SAs1	.3040
SZm2	.3600
SZm1	.3620
FLe7	.3675
FLe5	.3850
FLe6	.4360
SMS2	.4517
S5BE	.4720
SMS1	.4820

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.932
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B3.7 Peso seco de la parte aérea

Tukey B <sup>a,b</sup>

Tratamientos	Subset for alpha = .05	
	b	a
R1B	6.6E-03	
FLe4	6.9E-03	
SLe1	8.4E-03	
T2P10Az	9.4E-03	9.4E-03
Testigo	1.0E-02	1.0E-02
R2P2B	1.1E-02	1.1E-02
PLe3	1.1E-02	1.1E-02
SAs1	1.1E-02	1.1E-02
PLe4	1.3E-02	1.3E-02
SLe2	1.5E-02	1.5E-02
FLe5	1.9E-02	1.9E-02
FLe6	2.0E-02	2.0E-02
FLe7	2.0E-02	2.0E-02
SZm2	2.2E-02	2.2E-02
SMS2	2.3E-02	2.3E-02
S5BE	2.4E-02	2.4E-02
SZm1	2.7E-02	2.7E-02
SMS1		3.6E-02

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.932.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

## BIOENSAYO 4

Tabla B4.1 ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F <sup>a</sup>
Altura de la parte aérea	Between Groups	286.301	31	9.236	12.695
	Within Groups	82.933	114	.727	
	Total	369.235	145		
Número de hojas	Between Groups	50.231	31	1.620	4.353
	Within Groups	42.433	114	.372	
	Total	92.664	145		
Diámetro del tallo	Between Groups	8.697	31	.281	5.080
	Within Groups	6.296	114	5.52E-02	
	Total	14.993	145		
Peso fresco de la parte aérea	Between Groups	1.469	31	4.74E-02	8.385
	Within Groups	.644	114	5.65E-03	
	Total	2.113	145		
Peso seco de la parte aérea	Between Groups	5.86E-03	31	1.89E-04	4.736
	Within Groups	4.55E-03	114	3.99E-05	
	Total	1.04E-02	145		
Longitud de la raíz	Between Groups	5452.459	31	175.886	7.851
	Within Groups	2531.500	113	22.403	
	Total	7983.959	144		
Peso fresco de la raíz	Between Groups	1.603	31	5.17E-02	6.369
	Within Groups	.918	113	8.12E-03	
	Total	2.521	144		
Número de raíces adventicias	Between Groups	3115.140	31	100.488	5.208
	Within Groups	2180.267	113	19.294	
	Total	5295.407	144		

a. F 0.05,31,114= 1.55

Tabla B4.2 Longitud de la raíz

Tukey B <sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05					
	f	e	d	c	b	a
PZm2	8.7500					
PMs2	9.2500					
TF	9.6000					
TP	9.7500					
PAs2	11.0000	11.0000				
TS	11.3333	11.3333				
SMs2	11.6000	11.6000				
TA	14.0000	14.0000	14.0000			
PAs1	14.2000	14.2000	14.2000			
PMs1	14.3333	14.3333	14.3333			
AZm5	14.6000	14.6000	14.6000	14.6000		
PMs3	16.2500	16.2500	16.2500	16.2500	16.2500	
AMs3	17.4000	17.4000	17.4000	17.4000	17.4000	
AAs1	17.6000	17.6000	17.6000	17.6000	17.6000	
SZm1	17.8000	17.8000	17.8000	17.8000	17.8000	
VS9	18.0000	18.0000	18.0000	18.0000	18.0000	18.0000
FLe7	18.4000	18.4000	18.4000	18.4000	18.4000	18.4000
FLe6	18.5000	18.5000	18.5000	18.5000	18.5000	18.5000
PLe3	18.7500	18.7500	18.7500	18.7500	18.7500	18.7500
AZm1	19.2500	19.2500	19.2500	19.2500	19.2500	19.2500
PMs4	19.3333	19.3333	19.3333	19.3333	19.3333	19.3333
FZm2		22.6000	22.6000	22.6000	22.6000	22.6000
R2P2B		22.8000	22.8000	22.8000	22.8000	22.8000
FLe4			23.8000	23.8000	23.8000	23.8000
SZm2			24.0000	24.0000	24.0000	24.0000
FMs1			24.8000	24.8000	24.8000	24.8000
SMs1			25.4000	25.4000	25.4000	25.4000
FAs1				26.4000	26.4000	26.4000
FLe1				26.4000	26.4000	26.4000
S5BE					27.6000	27.6000
AZm3					28.0000	28.0000
FLe5						29.8000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.414.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.



Tabla B4.3 Peso fresco de la raíz

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05					
	f	e	d	c	b	a
PMS2	2.75E-02					
PZm2	4.25E-02	4.25E-02				
PAs2	5.20E-02	5.20E-02				
TS	5.33E-02	5.33E-02				
TF	5.40E-02	5.40E-02				
PMS1	5.67E-02	5.67E-02				
SMS2	6.20E-02	6.20E-02	6.20E-02			
TP	6.75E-02	6.75E-02	6.75E-02			
AMS3	8.40E-02	8.40E-02	8.40E-02			
PAs1	9.40E-02	9.40E-02	9.40E-02			
AZm5	.1000	.1000	.1000	.1000		
PMS4	.1167	.1167	.1167	.1167		
FLe7	.1180	.1180	.1180	.1180		
TA	.1200	.1200	.1200	.1200		
SZm1	.1240	.1240	.1240	.1240		
PLe3	.1500	.1500	.1500	.1500	.1500	
VS9	.1575	.1575	.1575	.1575	.1575	
AZm1	.1625	.1625	.1625	.1625	.1625	
FLe6	.1900	.1900	.1900	.1900	.1900	.1900
AA1	.1920	.1920	.1920	.1920	.1920	.1920
FA1	.2140	.2140	.2140	.2140	.2140	.2140
PMS3	.2175	.2175	.2175	.2175	.2175	.2175
R2P2B	.2300	.2300	.2300	.2300	.2300	.2300
SZm2	.2360	.2360	.2360	.2360	.2360	.2360
FLe4		.2620	.2620	.2620	.2620	.2620
FMS1		.2640	.2640	.2640	.2640	.2640
SMS1		.2640	.2640	.2640	.2640	.2640
AZm3			.2880	.2880	.2880	.2880
FLe1				.3240	.3240	.3240
FLe5					.3500	.3500
S5BE					.3720	.3720
FZm2						.4000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.414

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B4.4 Número de raíces adventicias

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05					
	f	e	d	c	b	a
TP	6.2500					
PZm2	6.7500	6.7500				
PMs2	6.7500	6.7500				
TA	7.7500	7.7500	7.7500			
TF	7.8000	7.8000	7.8000			
PMs4	8.0000	8.0000	8.0000	8.0000		
AMs3	8.6000	8.6000	8.6000	8.6000		
PAAs2	8.6000	8.6000	8.6000	8.6000		
VS9	8.7500	8.7500	8.7500	8.7500		
PLe3	9.0000	9.0000	9.0000	9.0000		
TS	9.3333	9.3333	9.3333	9.3333		
PAAs1	9.6000	9.6000	9.6000	9.6000		
SMs2	10.0000	10.0000	10.0000	10.0000	10.0000	
SZm1	11.2000	11.2000	11.2000	11.2000	11.2000	
AZm5	11.2000	11.2000	11.2000	11.2000	11.2000	
PMs1	12.0000	12.0000	12.0000	12.0000	12.0000	
AZm1	13.7500	13.7500	13.7500	13.7500	13.7500	13.7500
AZm3	14.6000	14.6000	14.6000	14.6000	14.6000	14.6000
AAAs1	14.6000	14.6000	14.6000	14.6000	14.6000	14.6000
FLe7	15.0000	15.0000	15.0000	15.0000	15.0000	15.0000
PMs3	16.2500	16.2500	16.2500	16.2500	16.2500	16.2500
FLe6	16.2500	16.2500	16.2500	16.2500	16.2500	16.2500
FMs1	16.6000	16.6000	16.6000	16.6000	16.6000	16.6000
R2P2B	16.8000	16.8000	16.8000	16.8000	16.8000	16.8000
FZm2	17.0000	17.0000	17.0000	17.0000	17.0000	17.0000
FLe5	17.0000	17.0000	17.0000	17.0000	17.0000	17.0000
FLe1	17.2000	17.2000	17.2000	17.2000	17.2000	17.2000
FAs1		17.8000	17.8000	17.8000	17.8000	17.8000
S5BE			18.6000	18.6000	18.6000	18.6000
FLe4				19.2000	19.2000	19.2000
SMs1					20.8000	20.8000
SZm2						23.2000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.414

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed

Tabla B4.5 Altura de la parte aérea

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05										
	k	j	i	h	g	f	e	d	c	b	a
TS	2.125										
PZm2	2.250	2.250									
TP	2.500	2.500	2.500								
PAs2	2.700	2.700	2.700	2.700							
TA	3.250	3.250	3.250	3.250	3.250						
PMs1	3.333	3.333	3.333	3.333	3.333	3.333					
TF	3.600	3.600	3.600	3.600	3.600	3.600	3.600				
PMs4	3.667	3.667	3.667	3.667	3.667	3.667	3.667				
SMs2	3.700	3.700	3.700	3.700	3.700	3.700	3.700	3.700			
SZm1		4.200	4.200	4.200	4.200	4.200	4.200	4.200	4.200		
PLe3		4.250	4.250	4.250	4.250	4.250	4.250	4.250	4.250		
AZm5			4.300	4.300	4.300	4.300	4.300	4.300	4.300		
PAs1				4.700	4.700	4.700	4.700	4.700	4.700	4.700	
PMs2					4.750	4.750	4.750	4.750	4.750	4.750	
VS9					5.125	5.125	5.125	5.125	5.125	5.125	
AAAs1					5.300	5.300	5.300	5.300	5.300	5.300	
R2P2B					5.300	5.300	5.300	5.300	5.300	5.300	
AZm1						5.375	5.375	5.375	5.375	5.375	
AMs3							5.600	5.600	5.600	5.600	5.600
PMs3								5.750	5.750	5.750	5.750
FLe7									5.800	5.800	5.800
FLe6									5.875	5.875	5.875
FAs1									5.900	5.900	5.900
FLe1									6.000	6.000	6.000
S5BE									6.000	6.000	6.000
SZm2									6.100	6.100	6.100
SMs1									6.300	6.300	6.300
AZm3									6.300	6.300	6.300
FLe4										6.500	6.500
FLe5										6.500	6.500
FMs1										6.800	6.800
FZm2											7.500

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.465.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B4.6 Número de hojas

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05				
	e	d	c	b	a
PZm2	.7500				
TS	1.0000	1.0000			
SMs2	1.2000	1.2000			
TP	1.2500	1.2500	1.2500		
SZm1	1.4000	1.4000	1.4000		
PMS2	1.5000	1.5000	1.5000		
TF	1.6000	1.6000	1.6000		
PMs1	1.6667	1.6667	1.6667	1.6667	
PMs4	1.6667	1.6667	1.6667	1.6667	
AMs3	1.8000	1.8000	1.8000	1.8000	1.8000
PAs2	1.8000	1.8000	1.8000	1.8000	1.8000
FLe1	1.8000	1.8000	1.8000	1.8000	1.8000
AZm1	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
AZm5	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
AAs1	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
VS9	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
PAs1	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
FLe7	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
R2P2B	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
AZm3	2.2000	2.2000	2.2000	2.2000	2.2000
FAs1	2.2000	2.2000	2.2000	2.2000	2.2000
S5BE	2.2000	2.2000	2.2000	2.2000	2.2000
TA	2.2500	2.2500	2.2500	2.2500	2.2500
PLe3	2.2500	2.2500	2.2500	2.2500	2.2500
FLe6	2.2500	2.2500	2.2500	2.2500	2.2500
FMs1		2.4000	2.4000	2.4000	2.4000
FLe4		2.4000	2.4000	2.4000	2.4000
SMs1			2.8000	2.8000	2.8000
FZm2			2.8000	2.8000	2.8000
SZm2				3.2000	3.2000
FLe5				3.2000	3.2000
PMs3					3.2500

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.465

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B4.7 Diámetro del tallo

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05			
	d	c	b	a
VS9	1.0000			
PZm2	1.0000			
PMs2	1.0000			
TP	1.1250	1.1250		
PAAs2	1.2000	1.2000	1.2000	
TA	1.2500	1.2500	1.2500	
TF	1.3000	1.3000	1.3000	1.3000
PMs4	1.3333	1.3333	1.3333	1.3333
TS	1.3750	1.3750	1.3750	1.3750
AMs3	1.4000	1.4000	1.4000	1.4000
FLe1	1.4000	1.4000	1.4000	1.4000
SZm1	1.5000	1.5000	1.5000	1.5000
SMs2	1.5000	1.5000	1.5000	1.5000
AZm1	1.5000	1.5000	1.5000	1.5000
AZm3	1.5000	1.5000	1.5000	1.5000
AZm5	1.5000	1.5000	1.5000	1.5000
AAAs1	1.5000	1.5000	1.5000	1.5000
PAAs1	1.5000	1.5000	1.5000	1.5000
PMs3	1.5000	1.5000	1.5000	1.5000
FLe7	1.5000	1.5000	1.5000	1.5000
R2P2B		1.6000	1.6000	1.6000
PLe3		1.6250	1.6250	1.6250
PMs1		1.6667	1.6667	1.6667
SZm2		1.7000	1.7000	1.7000
FZm2		1.7000	1.7000	1.7000
S5BE		1.7000	1.7000	1.7000
FLe6			1.7500	1.7500
SMs1			1.8000	1.8000
FMs1			1.8000	1.8000
FLe5			1.8000	1.8000
FAs1				1.9000
FLe4				1.9000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.465.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B4.8 Peso fresco de la parte aérea

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05					
	f	e	d	c	b	a
PZm2	3.75E-02					
TS	4.00E-02					
PAs2	4.60E-02					
TP	4.75E-02					
TF	5.60E-02					
PMs4	7.00E-02	7.00E-02				
PMs1	7.33E-02	7.33E-02				
SMS2	9.40E-02	9.40E-02	9.40E-02			
TA	9.50E-02	9.50E-02	9.50E-02			
SZm1	.1020	.1020	.1020	.1020		
PLe3	.1075	.1075	.1075	.1075		
PAs1	.1080	.1080	.1080	.1080		
AZm5	.1360	.1360	.1360	.1360	.1360	
VS9	.1400	.1400	.1400	.1400	.1400	
AMs3	.1460	.1460	.1460	.1460	.1460	
FLe7	.1520	.1520	.1520	.1520	.1520	
PMs3	.1700	.1700	.1700	.1700	.1700	
PMs2	.1725	.1725	.1725	.1725	.1725	
AZm1	.1750	.1750	.1750	.1750	.1750	
AAAs1	.1760	.1760	.1760	.1760	.1760	
R2P2B	.2040	.2040	.2040	.2040	.2040	.2040
FLe6	.2175	.2175	.2175	.2175	.2175	.2175
SZm2		.2540	.2540	.2540	.2540	.2540
S5BE			.2660	.2660	.2660	.2660
FMS1			.2720	.2720	.2720	.2720
FAs1			.2760	.2760	.2760	.2760
SMs1				.2860	.2860	.2860
FLe4					.3000	.3000
FLe1					.3080	.3080
AZm3					.3100	.3100
FZm2						.3740
FLe5						.3740

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.465.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed

Tabla B4.9 Peso seco de la parte aérea

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05				
	e	d	c	b	a
PMs4	1.6E-03				
PZm2	2.1E-03				
TS	3.4E-03	3.4E-03			
TP	3.7E-03	3.7E-03	3.7E-03		
PAs2	4.2E-03	4.2E-03	4.2E-03	4.2E-03	
TF	4.3E-03	4.3E-03	4.3E-03	4.3E-03	
PLe3	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03	
TA	6.0E-03	6.0E-03	6.0E-03	6.0E-03	
SMS2	6.0E-03	6.0E-03	6.0E-03	6.0E-03	
AZm5	6.5E-03	6.5E-03	6.5E-03	6.5E-03	
SZm1	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03	8.7E-03
VS9	9.1E-03	9.1E-03	9.1E-03	9.1E-03	9.1E-03
AZm1	9.4E-03	9.4E-03	9.4E-03	9.4E-03	9.4E-03
AMs3	9.6E-03	9.6E-03	9.6E-03	9.6E-03	9.6E-03
PMs2	1.0E-02	1.0E-02	1.0E-02	1.0E-02	1.0E-02
PAs1	1.0E-02	1.0E-02	1.0E-02	1.0E-02	1.0E-02
FLe7	1.0E-02	1.0E-02	1.0E-02	1.0E-02	1.0E-02
PMs3	1.3E-02	1.3E-02	1.3E-02	1.3E-02	1.3E-02
AAAs1	1.3E-02	1.3E-02	1.3E-02	1.3E-02	1.3E-02
R2P2B	1.4E-02	1.4E-02	1.4E-02	1.4E-02	1.4E-02
FLe6	1.4E-02	1.4E-02	1.4E-02	1.4E-02	1.4E-02
SZm2	1.6E-02	1.6E-02	1.6E-02	1.6E-02	1.6E-02
S5BE	1.7E-02	1.7E-02	1.7E-02	1.7E-02	1.7E-02
FAs1	1.7E-02	1.7E-02	1.7E-02	1.7E-02	1.7E-02
FMS1	1.8E-02	1.8E-02	1.8E-02	1.8E-02	1.8E-02
FLe4	1.8E-02	1.8E-02	1.8E-02	1.8E-02	1.8E-02
FLe1		1.9E-02	1.9E-02	1.9E-02	1.9E-02
PMs1			2.0E-02	2.0E-02	2.0E-02
SMS1			2.0E-02	2.0E-02	2.0E-02
AZm3				2.0E-02	2.0E-02
FZm2					2.3E-02
FLe5					2.4E-02

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 4 465.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

## BIOENSAYO 5

## B5.1 ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F <sup>a</sup>
Altura de la parte aerea	Between Groups	29851.83	30	995.061	7.683
	Within Groups	12950.72	100	129.507	
	Total	42802.55	130		
Numero de hojas	Between Groups	1246.562	30	41.552	5.689
	Within Groups	730.400	100	7.304	
	Total	1976.962	130		
Diametro del tallo	Between Groups	281.876	30	9.396	10.516
	Within Groups	89.346	100	.893	
	Total	371.221	130		
Peso fresco de la parte aerea	Between Groups	143099.7	30	4769.989	5.700
	Within Groups	83687.55	100	836.876	
	Total	226787.2	130		
Peso seco de la parte aerea	Between Groups	1100.323	30	36.677	5.215
	Within Groups	703.275	100	7.033	
	Total	1803.597	130		
Longitud de la raiz	Between Groups	18106.89	30	603.563	5.812
	Within Groups	10281.31	99	103.852	
	Total	28388.20	129		
Peso fresco de la raiz	Between Groups	169846.3	30	5661.544	6.714
	Within Groups	83479.29	99	843.225	
	Total	253325.6	129		
Peso seco de la raiz	Between Groups	14616.93	30	487.231	4.306
	Within Groups	10749.52	95	113.153	
	Total	25366.45	125		

a. F 0.05,30,100= 1.55



Tabla B5.2 Longitud de la raíz

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05				
	e	d	c	b	a
TP	5.7500				
TS	13.0000	13.0000			
TA	19.0000	19.0000	19.0000		
TF	19.6667	19.6667	19.6667		
PZm2	20.1250	20.1250	20.1250		
PAAs1	20.8000	20.8000	20.8000	20.8000	
PMs1	26.0000	26.0000	26.0000	26.0000	26.0000
PAAs2	27.6667	27.6667	27.6667	27.6667	27.6667
SZm2	29.8750	29.8750	29.8750	29.8750	29.8750
PMs3	30.5000	30.5000	30.5000	30.5000	30.5000
SZm1		35.0000	35.0000	35.0000	35.0000
SMs1		37.7500	37.7500	37.7500	37.7500
AAAs1			39.4000	39.4000	39.4000
VS9			39.7500	39.7500	39.7500
PMs4			40.5000	40.5000	40.5000
R2P2B			41.3333	41.3333	41.3333
AZm3			42.0000	42.0000	42.0000
PMs2			43.1250	43.1250	43.1250
FLe6			43.2000	43.2000	43.2000
FZm2			44.2000	44.2000	44.2000
S5BE			44.2000	44.2000	44.2000
FLe7			45.2500	45.2500	45.2500
AZm1			45.7500	45.7500	45.7500
FMs1			46.0000	46.0000	46.0000
FLe4			46.0000	46.0000	46.0000
FLe5				47.7500	47.7500
FLe1					48.6000
SMs2					48.8000
FAAs1					49.2000
AMs3					49.7500
AZm5					53.2000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.009.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B5.3 Peso fresco de la raíz

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05						
	g	f	e	d	c	b	a
TP	6225						
TF	8 6200	8 6200					
TS	12.3667	12.3667	12.3667				
PZm2	13.7700	13.7700	13.7700				
TA	14.0567	14.0567	14.0567				
PMs3	17.5500	17.5500	17.5500	17.5500			
PMs1	20.6267	20.6267	20.6267	20.6267			
PAAs1	20.8380	20.8380	20.8380	20.8380			
SZm1	34.6460	34.6460	34.6460	34.6460	34.6460		
SZm2	37.4600	37.4600	37.4600	37.4600	37.4600		
PAAs2	38.3467	38.3467	38.3467	38.3467	38.3467		
SMs1	42.7200	42.7200	42.7200	42.7200	42.7200		
PMs2	47.2750	47.2750	47.2750	47.2750	47.2750	47.2750	
PMs4	51.0600	51.0600	51.0600	51.0600	51.0600	51.0600	
R2P2B	54.3700	54.3700	54.3700	54.3700	54.3700	54.3700	
AAAs1	67.9240	67.9240	67.9240	67.9240	67.9240	67.9240	67.9240
VS9	68.7675	68.7675	68.7675	68.7675	68.7675	68.7675	68.7675
SMs2	71.7120	71.7120	71.7120	71.7120	71.7120	71.7120	71.7120
AZm3	72.6075	72.6075	72.6075	72.6075	72.6075	72.6075	72.6075
FZm2	74.2800	74.2800	74.2800	74.2800	74.2800	74.2800	74.2800
FMs1	77.1640	77.1640	77.1640	77.1640	77.1640	77.1640	77.1640
FLe7		79.6600	79.6600	79.6600	79.6600	79.6600	79.6600
FAs1			87.2080	87.2080	87.2080	87.2080	87.2080
AZm1				92.0750	92.0750	92.0750	92.0750
S5BE				92.4300	92.4300	92.4300	92.4300
FLe6				94.3920	94.3920	94.3920	94.3920
FLe4					98.8880	98.8880	98.8880
FLe5					100.53	100.53	100.53
FLe1					104.55	104.55	104.55
AMs3						123.05	123.05
AZm5							143.03

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.052

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B5.4 Peso seco de la raíz

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05			
	d	c	b	a
TP	.1133			
TF	1.2967	1.2967		
TS	1.8700	1.8700		
TA	2.3067	2.3067		
PMs3	2.7350	2.7350	2.7350	
PAs1	4.0600	4.0600	4.0600	
PMs1	4.0967	4.0967	4.0967	
PZm2	4.4600	4.4600	4.4600	
SZm1	6.0800	6.0800	6.0800	6.0800
PMs2	6.6825	6.6825	6.6825	6.6825
SMs1	7.2475	7.2475	7.2475	7.2475
PAs2	7.4867	7.4867	7.4867	7.4867
SZm2	7.7575	7.7575	7.7575	7.7575
R2P2B	11.3067	11.3067	11.3067	11.3067
PMs4	15.2825	15.2825	15.2825	15.2825
VS9	16.1725	16.1725	16.1725	16.1725
AAs1	17.8660	17.8660	17.8660	17.8660
AZm3	18.3600	18.3600	18.3600	18.3600
FZm2	18.9780	18.9780	18.9780	18.9780
FMs1	20.8740	20.8740	20.8740	20.8740
SMs2	22.3140	22.3140	22.3140	22.3140
FLe7	22.4800	22.4800	22.4800	22.4800
FAs1	22.9560	22.9560	22.9560	22.9560
FLe6	25.9360	25.9360	25.9360	25.9360
FLe5	26.9750	26.9750	26.9750	26.9750
S5BE	27.7740	27.7740	27.7740	27.7740
AZm1	28.4275	28.4275	28.4275	28.4275
FLe4		30.4380	30.4380	30.4380
AZm5			31.8380	31.8380
AMs3				34.2700
FLe1				35.0140

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.859.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B5.5 Altura de la parte aérea

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05							
	h	g	f	e	d	c	b	a
TP	7 1250							
PZm2	17 750	17.750						
TA	22 750	22.750	22.750					
SZm2	24 750	24.750	24.750	24.750				
TF	25 667	25.667	25.667	25.667	25.667			
PAs1	25 800	25.800	25.800	25.800	25.800			
TS	27 000	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000		
PMs3	27 625	27.625	27.625	27.625	27.625	27.625		
SZm1	28 200	28.200	28.200	28.200	28.200	28.200		
PMs1	34 667	34.667	34.667	34.667	34.667	34.667	34.667	
SMs1		36.750	36.750	36.750	36.750	36.750	36.750	
PAs2		40.167	40.167	40.167	40.167	40.167	40.167	
R2P2B		40.333	40.333	40.333	40.333	40.333	40.333	
FZm2		43.400	43.400	43.400	43.400	43.400	43.400	
VS9		44.250	44.250	44.250	44.250	44.250	44.250	
AAs1		44.400	44.400	44.400	44.400	44.400	44.400	
FLe7		45.500	45.500	45.500	45.500	45.500	45.500	
AZm3		45.750	45.750	45.750	45.750	45.750	45.750	
FLe4			48.000	48.000	48.000	48.000	48.000	48.000
SMs2			51.200	51.200	51.200	51.200	51.200	51.200
FAs1			51.200	51.200	51.200	51.200	51.200	51.200
FLe6			51.600	51.600	51.600	51.600	51.600	51.600
PMs4			52.625	52.625	52.625	52.625	52.625	52.625
FLe5				52.875	52.875	52.875	52.875	52.875
FMs1					55.000	55.000	55.000	55.000
S5BE					55.400	55.400	55.400	55.400
PMs2						56.750	56.750	56.750
AZm5							59.800	59.800
FLe1							62.000	62.000
AZm1							64.500	64.500
AMs3								75.750

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.097.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed

Tabla B5.6 Número de hojas

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05					
	f	e	d	c	b	a
TP	3.5000					
TA	6.5000	6.5000				
PZm2	6.7500	6.7500				
TF	7.0000	7.0000	7.0000			
PAs1	7.4000	7.4000	7.4000	7.4000		
TS	8.3333	8.3333	8.3333	8.3333		
PMs3	8.7500	8.7500	8.7500	8.7500		
SZm1	9.8000	9.8000	9.8000	9.8000	9.8000	
SZm2	10.0000	10.0000	10.0000	10.0000	10.0000	
PMs1		10.6667	10.6667	10.6667	10.6667	10.6667
R2P2B		11.6667	11.6667	11.6667	11.6667	11.6667
SMs1		11.7500	11.7500	11.7500	11.7500	11.7500
FZm2		11.8000	11.8000	11.8000	11.8000	11.8000
PAs2		12.0000	12.0000	12.0000	12.0000	12.0000
AAAs1		12.2000	12.2000	12.2000	12.2000	12.2000
VS9		12.2500	12.2500	12.2500	12.2500	12.2500
FLe7		12.2500	12.2500	12.2500	12.2500	12.2500
FMs1		12.4000	12.4000	12.4000	12.4000	12.4000
FLe6		12.4000	12.4000	12.4000	12.4000	12.4000
FLe4		13.0000	13.0000	13.0000	13.0000	13.0000
PMs2		13.2500	13.2500	13.2500	13.2500	13.2500
AZm3		13.5000	13.5000	13.5000	13.5000	13.5000
FAs1		13.6000	13.6000	13.6000	13.6000	13.6000
SMs2			14.0000	14.0000	14.0000	14.0000
PMs4				14.2500	14.2500	14.2500
FLe1				14.4000	14.4000	14.4000
S5BE				14.4000	14.4000	14.4000
FLe5				14.5000	14.5000	14.5000
AZm1					16.0000	16.0000
AZm5					16.2000	16.2000
AMs3						17.2500

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.097.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B5.7 Diámetro del tallo

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05							
	h	g	f	e	d	c	b	a
TP	1.875							
TA	3.000	3.000						
PZm2	3.875	3.875	3.8750					
TS		4.333	4.3333	4.333				
TF		4.333	4.3333	4.333				
PAs1		4.500	4.5000	4.500	4.5000			
PMs3			5.2500	5.250	5.2500	5.250		
PMs1			5.6667	5.667	5.6667	5.667	5.6667	
SZm1			6.0000	6.000	6.0000	6.000	6.0000	6.000
PMs2			6.1250	6.125	6.1250	6.125	6.1250	6.125
PAs2			6.1667	6.167	6.1667	6.167	6.1667	6.167
SZm2				6.250	6.2500	6.250	6.2500	6.250
FLe7				6.250	6.2500	6.250	6.2500	6.250
PMs4				6.500	6.5000	6.500	6.5000	6.500
FMs1				6.600	6.6000	6.600	6.6000	6.600
FZm2				6.700	6.7000	6.700	6.7000	6.700
FLe4				6.700	6.7000	6.700	6.7000	6.700
R2P2B					6.8333	6.833	6.8333	6.833
S5BE					6.9000	6.900	6.9000	6.900
SMS1						7.000	7.0000	7.000
VS9						7.000	7.0000	7.000
FLe5						7.000	7.0000	7.000
FLe1						7.100	7.1000	7.100
AAAs1						7.300	7.3000	7.300
FLe6						7.300	7.3000	7.300
FAs1						7.500	7.5000	7.500
SMS2						7.600	7.6000	7.600
AZm1						7.750	7.7500	7.750
AZm3							8.0000	8.000
AZm5							8.1000	8.100
AMs3								8.250

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.097.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B5.8 Peso fresco de la parte aérea

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05					
	f	e	d	c	b	a
TP	3.9550					
PZm2	13.2150	13.2150				
TS	13.2400	13.2400				
TA	13.2575	13.2575				
TF	13.6833	13.6833				
PMs3	23.6875	23.6875				
PAAs1	24.5720	24.5720				
SZm1	27.8000	27.8000	27.8000			
PMs1	31.9967	31.9967	31.9967			
SZm2	36.6975	36.6975	36.6975	36.6975		
R2P2B	44.8767	44.8767	44.8767	44.8767		
PAAs2	47.6533	47.6533	47.6533	47.6533	47.6533	
FZm2	50.6200	50.6200	50.6200	50.6200	50.6200	
FLe7	57.0400	57.0400	57.0400	57.0400	57.0400	
SMs1	61.6000	61.6000	61.6000	61.6000	61.6000	
AAAs1	62.1340	62.1340	62.1340	62.1340	62.1340	
FMs1	64.2640	64.2640	64.2640	64.2640	64.2640	
VS9	66.5450	66.5450	66.5450	66.5450	66.5450	66.5450
FLe4	68.4160	68.4160	68.4160	68.4160	68.4160	68.4160
PMs4	70.4600	70.4600	70.4600	70.4600	70.4600	70.4600
PMs2	71.4650	71.4650	71.4650	71.4650	71.4650	71.4650
AZm3	73.2725	73.2725	73.2725	73.2725	73.2725	73.2725
FLe5	73.9700	73.9700	73.9700	73.9700	73.9700	73.9700
FLe6	79.3320	79.3320	79.3320	79.3320	79.3320	79.3320
SMs2	79.6580	79.6580	79.6580	79.6580	79.6580	79.6580
S5BE		82.4040	82.4040	82.4040	82.4040	82.4040
FAAs1		89.9260	89.9260	89.9260	89.9260	89.9260
FLe1			101.6080	101.6080	101.6080	101.6080
AZm1				112.1500	112.1500	112.1500
AZm5					121.6780	121.6780
AMs3						138.8000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.097

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B5.9 Peso seco de la parte aérea

Tukey B<sup>a,b</sup>

tratamiento	Subset for alpha = .05				
	e	d	c	b	a
TP	2.25E-02				
PZm2	.7950	7950			
TA	.9050	9050			
TF	.9367	9367			
TS	1.0867	1.0867			
PMs3	1.4175	1.4175			
PAs1	1.5240	1.5240			
SZm1	2.0200	2.0200	2.0200		
PMs1	2.1933	2.1933	2.1933		
SZm2	2.4875	2.4875	2.4875		
SMs1	3.1000	3.1000	3.1000		
R2P2B	3.1167	3.1167	3.1167		
PAs2	3.4600	3.4600	3.4600		
AAAs1	4.4620	4.4620	4.4620	4.4620	
PMs2	4.4900	4.4900	4.4900	4.4900	
FLe7	4.6325	4.6325	4.6325	4.6325	
FZm2	4.7760	4.7760	4.7760	4.7760	
FMs1	4.8440	4.8440	4.8440	4.8440	
VS9	4.9000	4.9000	4.9000	4.9000	
PMs4	5.0750	5.0750	5.0750	5.0750	
AZm3	5.1775	5.1775	5.1775	5.1775	
FLe4	5.8980	5.8980	5.8980	5.8980	5.8980
FAs1	6.5100	6.5100	6.5100	6.5100	6.5100
FLe5	6.6625	6.6625	6.6625	6.6625	6.6625
FLe6	7.0360	7.0360	7.0360	7.0360	7.0360
S5BE		7.2820	7.2820	7.2820	7.2820
SMs2		7.3200	7.3200	7.3200	7.3200
FLe1		7.6760	7.6760	7.6760	7.6760
AZm1			8.8075	8.8075	8.8075
AZm5				10.5460	10.5460
AMs3					11.8400

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.097

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed



**BIOENSAYO 6**  
**Desarrollo a los 70 días**

**Tabla B6.1 ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F <sup>a</sup>
Altura de la parte aérea	Between Groups	73.520	4	18.380	.575
	Within Groups	1405.439	44	31.942	
	Total	1478.959	48		
Número de hojas	Between Groups	4.508	4	1.127	1.184
	Within Groups	41.900	44	.952	
	Total	46.408	48		
Diámetro del tallo	Between Groups	1.763	4	.441	1.200
	Within Groups	16.156	44	.367	
	Total	17.918	48		

a.  $F_{0.05,4,44} = 2.61$

**Tabla B6.2 Altura de la parte aérea**

Tukey B<sup>a,b</sup>

TRATAMIENTOS	Subset for alpha = .05
	a
FLe1	26.4000
TFC	27.6000
TFM	27.8889
AZm5	29.4500
AMs3	29.6500

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.783
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed

**Tabla B6.3 Número de hojas**

Tukey B<sup>a,b</sup>

TRATAMIENTOS	Subset for alpha = .05
	a
TFM	10.0000
AZm5	10.1000
FLe1	10.1000
AMs3	10.5000
TFC	10.8000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.783
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

**Tabla B6.4 Diámetro del tallo**

Tukey B<sup>a,b</sup>

TRATAMIENTOS	Subset for alpha = .05
	a
TFM	5.7778
AZm5	5.9000
FLe1	6.0000
TFC	6.2000
AMs3	6.3000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.783.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

## Número de flores

Tabla B6.5 ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F <sup>a</sup>
98 DIAS	Between Groups	80.060	4	20.015	4.260
	Within Groups	197.344	42	4.699	
	Total	277.404	46		
120 DIAS	Between Groups	39.535	4	9.884	.987
	Within Groups	430.778	43	10.018	
	Total	470.312	47		
134 DIAS	Between Groups	30.301	4	7.575	.535
	Within Groups	608.511	43	14.151	
	Total	638.813	47		

a. F 0.05,4,42= 2.61

Tabla B6.6 98 Días

Tukey B<sup>a,b</sup>

TRATAMIENTO	Subset for alpha = .05	
	b	a
AZm5	1.4444	
AMs3	2.5000	
TFC	3.4000	3.4000
TFM	3.6667	3.6667
FLe1		5.4444

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.375.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B6.7 120 días

Tukey B<sup>a,b</sup>

TRATAMIENTO	Subset for alpha = .05
	a
AZm5	4.3000
TFM	5.1111
AMs3	6.0000
FLe1	6.1111
TFC	6.9000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.574.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B6.8 134 Días

Tukey B<sup>a,b</sup>

TRATAMIENTO	Subset for alpha = .05
	a
FLe1	9.5556
AMs3	10.9000
TFC	11.3000
AZm5	11.6000
TFM	11.8889

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.574.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Número de frutos

Tabla B6.9 ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F <sup>a</sup>
120 DIAS	Between Groups	77.724	4	19.431	4.392
	Within Groups	190.256	43	4.425	
	Total	267.979	47		
134 DIAS	Between Groups	64.011	4	16.003	2.515
	Within Groups	279.989	44	6.363	
	Total	344.000	48		

a. F 0.05,4,43= 2.61

Tabla B6.10 120 Días

Tukey B<sup>a,b</sup>

TRATAMIENTO	Subset for alpha = .05	
	b	a
TFM	2222	
AMs3	2.0000	2.0000
AZm5	2.5000	2.5000
FLe1		3.7000
TFC		3.7000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.574.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla B6.11 134 Días

Tukey B<sup>a,b</sup>

TRATAMIENTO	Subset for alpha = .05	
	b	a
TFM	2.8889	
AZm5	4.1000	4.1000
AMs3	4.9000	4.9000
FLe1	5.1000	5.1000
TFC		6.4000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.783.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Producción

Tabla B6.12 ANOVA

Producción total

	Sum of Squares	df	Mean Square	F <sup>a</sup>
Between Groups	113323.3	4	28330.84	3.410
Within Groups	315673.5	38	8307.197	
Total	428996.8	42		

a. F 0.05,4,38= 2.61

Tabla B6.13 Producción total

Tukey B<sup>a,b</sup>

Tratamiento	Subset for alpha = .05	
	b	a
TFM	173.4200	
AZm5	227.1711	227.1711
AMs3	237.0122	237.0122
TFC	246.3500	246.3500
FLe1		344.3514

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.473.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.