



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD ENTRE UN BIOFERTILIZANTE Y UN AGENTE
DE CONTROL BIOLÓGICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MÓNICA GARCÍA PAREDES

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



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis seres queridos

Marcos, Soledad, Edgar y Mauricio muchas gracias por ser parte de mi. Gracias por acompañarme en esta travesía de la vida y gracias también por todo el apoyo y amor brindado bajo todo tipo de circunstancias.

Gracias a quién me ha regresado a la vida con su infinito amor y paciencia, gracias por estar a mi lado a pesar de toda la adversidad, gracias por este año tan maravilloso, gracias por tu maravillosa forma de ser.

Gracias a todos los que han llenado mi vida de gratas experiencias: Oliva, Gerardo, Karla, Carolina, Irene, Conchita, Leticia.

Gracias a amistades que marcan la diferencia en lo vivido: Kathy y Juan Carlos.

Gracias a todos por su contribución para lograr, a pesar de mi misma, que lo que nació como un sueño se convierta en realidad.

A la comunidad

Con todo cariño y respeto a todos los que me han apoyado directa o indirectamente.

A la UNAM y al pueblo trabajador por haberme brindado la oportunidad de estudiar una licenciatura.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de Tesis

M. en C. Rosa María Ramírez Gama

Con todo cariño, admiración y respeto a quien ha sido participe entusiasta en este trabajo de tesis.

Mil gracias por toda la confianza, apoyo, comprensión y amistad brindada.

A mis compañeros de Laboratorio

M. en C. Carmen Urzúa, M. en C. Rosalba Esquivel, M. en C. Guadalupe Tsuzuki, Bióloga Adriana, Q.A. Israel, Sr. Roberto y Sr. Lugo.

Gracias a todos por su maravillosa calidad de persona, ha sido un placer desarrollar este trabajo de tesis conviviendo con ustedes.

A los integrantes del Invernadero JITOSAN

MVZ Fermín Jiménez Flores y familia, Aldair

Con afecto y respeto

A los integrantes del laboratorio de Edafología de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Dra. Norma E. García Calderón, Dra. Rosalía y M. en C. Ma. Del Socorro
Gracias por su apoyo, comprensión y confianza.

A mis sinodales

Dra. Ma. del Pilar Ortega Larrocea
M. en C. Ma. Guadalupe Tsuzuki Reyes
M. en C. Ma. del Socorro Galicia Palacios
Dra. Amada Laura Reyes Ortigoza

Por su paciencia, por sus valiosos consejos y sugerencias para lograr el presente trabajo.

Gracias.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN.....	9
1. ANTECEDENTES	9
1.1. Suelo	9
1.2. Rizósfera	9
1.3. PGPR	10
1.4. <i>Azospirillum</i>	11
1.4.1. Interacción de <i>Azospirillum</i> en el suelo	12
1.5. <i>Bacillus subtilis</i>	14
2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	16
2.1 Hipótesis	16
2.2. Objetivo General	16
2.2.1. Objetivos Específicos	16
3. MATERIALES Y METODOS	17
3.1. PGPR	17
3.2. Ensayo preliminar	17
3.3. Semillas	17
3.4. Suelo	18
3.5. Preparación de inoculantes	18
3.6. Calidad de inoculantes	19
3.7. Ensayo de invernadero, tratamientos y prácticas culturales.....	19
3.8. Colonización de raíces	23
3.9. Diseño de experimento	24
3.10. Análisis de resultados	24
4. RESULTADOS Y DISCUSION	26
4.1. Análisis de suelo	26
4.2. Determinación de antagonismo entre las bacterias	

en estudio por el método de estría modificado	26
4.3. Calidad de los inoculantes	26
4.4. Colonización de la raíz por <i>Azospirillum</i>	27
4.5. Diámetro del tallo	28
4.6. Producción del frutos	31
4.7. Calidad del frutos	34
5. CONCLUSIONES	42
6. RECOMENDACIONES	43
7. LITERATURA CITADA	44
8. ANEXOS	50

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1	17
Cuadro 2	18
Cuadro 3	19
Cuadro 4	21
Cuadro 5	23
Cuadro 6	26
Cuadro 7	27
Cuadro 8	28
Cuadro 9	33
Cuadro 10	33
Cuadro 11	34
Cuadro 12	35
Cuadro 13	35
Cuadro 14	36
Cuadro 15	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	25
Figura 2	25
Figura 3	29
Figura 4	29
Figura 5	30
Figura 6	32

Figura 7	32
Figura 8	33
Figura 9	37
Figura 10.....	37
Figura 11	38
Figura 12	38
Figura 13	39
Figura 14	39
Figura 15	40
Figura 16	40
Figura 17	41

ÍNDICE DE FOTOS

Fotos 1	22
Fotos 2	22
Fotos 3	24
Fotos 4	31

RESUMEN

El costo ecológico del uso de agroquímicos es muy alto ya que generan contaminación en el suelo, agua y aire; una alternativa para coadyuvar a la solución de este problema es el empleo de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) que brindan amplios beneficios sin alterar el medio ambiente.

Azospirillum es una rizobacteria que incrementa el rendimiento vegetal, en gramíneas ha dado resultados positivos (Urzúa, 2001), al igual que en jitomate (Urzúa, 2001 y Esquivel, 2002). *Bacillus subtilis* presente en “Probacil”, también ha sido ampliamente probado en el cultivo de papa, mejorando la calidad y producción (Jiménez *et al.*, 2001). Es posible emplear positivamente ambos microorganismos en cucurbitáceas.

Actualmente se investiga la doble inoculación de *Azospirillum* con otros microorganismos, como los hongos micorrícicos (Bashan y Holguin, 1993). La acción combinada se busca aprovechar las características positivas de cada microorganismo a fin de incrementar los rendimientos (Whipps, 2001). No existen estudios sobre la inoculación mixta en la planta del pepino por lo que todo conocimiento generado al respecto es bienvenido.

El presente trabajo tuvo como objetivos evaluar el efecto de la inoculación con la cepa VS9 de *Azospirillum*, el efecto de la inoculación con “Probacil” (*Bacillus subtilis*) y el efecto de la inoculación combinada de estos microorganismos en la producción del pepino variedades Idefe, Langley y Pointsett bajo condiciones de invernadero.

En la primera fase del estudio se utilizaron cuatro tratamientos en una sola repetición con distribución al azar, en pepino holandés variedades Idefe y Langley. La segunda fase se realizó con pepino americano variedad Pointsett, empleándose cuatro tratamientos con cuatro repeticiones y distribución completamente al azar. Las variables evaluadas fueron: colonización de la raíz, diámetro del tallo, calidad y producción del fruto. Los resultados obtenidos indican que *Azospirillum* tiende a colonizar más el área proximal de la raíz, la población bacteriana va disminuyendo proporcionalmente conforme aumenta la distancia entre tallo y raíz; en el diámetro del tallo hubo diferencias estadísticamente significativas, en las variedades Langley y Pointsett la cepa que dio mejores resultados fue VS9 de *Azospirillum* y en la variedad Idefe fue la mezcla de VS9 con “Probacil” (*Bacillus subtilis*). Estadísticamente no se encontró correlación entre el diámetro del tallo y la producción del fruto, sin embargo se observó la tendencia de un mejor desarrollo vegetal causado por VS9, en las variedades Langley y Pointsett estimuló un incremento en la producción del fruto, para Langley de un 95% y para Pointsett de un 11%.

La densidad poblacional de *Bacillus subtilis* presente en “Probacil” fue inferior a la señalada en la etiqueta (10^8) e inferior a la mínima requerida (10^6). A pesar de esto en la variedad Idefe se observó la tendencia de una invasión menor de hongos en las plantas inoculadas con “Probacil”.

En general se puede pensar que la acción benéfica de *Azospirillum* tuvo un poco o nulo efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas debido a que estas se cultivaron en un suelo fertilizado.

INTRODUCCIÓN

Para cubrir la demanda creciente de alimentos existen varias alternativas al alcance de los agricultores como son el uso de agroquímicos y la biotecnología. El uso de agroquímicos era una opción rentable con la que se logra aumentar la producción agrícola debido a que favorecen la nutrición vegetal o a través del combate de organismos fitopatógenos, sin embargo el uso indiscriminado de estos ha roto el equilibrio en el medio ambiente.

Los agroquímicos en promedio tienen una vida residual de 30 años por lo que la acumulación en el ambiente es cada vez mayor. En los últimos 20 años ha aumentado su uso; anualmente el consumo de fertilizantes se ha incrementado 3%. Cada año se han adicionado al suelo más de 100 millones de toneladas de nitrógeno y más de 90 millones de toneladas de fosfato en forma de fertilizantes (Glick *et al.*, 1999).

A la par de la problemática del uso de los agroquímicos, la biotecnología ofrece herramientas para el desarrollo sostenible de la agricultura, aumentando la producción sin alterar los ecosistemas. Entre las principales técnicas de la agro-biotecnología esta la aplicación de inoculantes biológicos que incluye la selección y multiplicación de microorganismos benéficos para las plantas (Jiménez *et al.*, 2001).

Estos inoculantes biológicos contienen bacterias que viven en la rizosfera y proporcionan beneficios a la planta, ya sea porque la protegen contra el ataque de patógenos o bien por qué le permiten aumentar la captación de nutrientes minerales. A estas rizobacterias se les denomina rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR Plant Growth Promoting Rizhobacteria).

En la actualidad el empleo de microorganismos (PGPR) en la agricultura es mínimo; en el caso de los las bacterias que controlan plagas y enfermedades su uso sólo representa el 1.4% (380 millones de dólares) del mercado global. Los productos más abundantes son los generados a partir de *Bacillus thuringiensis* (Jiménez *et al.*, 2001). Sin embargo son muchas las investigaciones que se desarrollan a nivel mundial a fin de mejorar la estabilidad y resultados de la aplicación de los inoculantes biológicos y se espera que en poco tiempo sean una práctica usual en la agricultura (Glick *et al.*, 2001).

1. ANTECEDENTES

1.1. Suelo

El suelo es un sistema natural muy dinámico constituido por tres fases: sólida, líquida y gaseosa que están en transformación constante, conformando diversos ecosistemas. La parte sólida está formada por partículas minerales, materia orgánica y organismos vivos; la parte líquida es agua y la gaseosa es aire (Honorato, 2000).

Las unidades estructurales minerales del suelo son: arcilla, limo y arena; las más reactivas son las arcillas cuyo diámetro es menor a los 2 micrómetros. Las arcillas al igual que el humus (materia orgánica) presentan propiedades coloidales, ambos componentes del suelo tienen carga eléctrica superficial gracias a la cual adsorben (por atracción electrostática) diferentes cationes presentes en la solución del suelo, tales como: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , H^+ , Al^{3+} , Cu^{2+} , NH_4^+ , etc., también son almacén de nutrientes y de agua (Foth, 1990).

El suelo es un recurso natural de gran importancia, actúa como medio filtrante y de protección durante la recarga de acuíferos (Jiménez, 2004), además en él se llevan a cabo los ciclos biogeoquímicos del agua, carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, etc. (Foth, 1990).

El suelo constituye un ecosistema de enorme riqueza biológica, donde la microbiota juega un papel preponderante; las bacterias son los organismos más numerosos y la biomasa más significativa es la de los hongos ya que a pesar de ser menos abundantes, tienen un mayor tamaño (Alexander, 1977; Tate III, 1995).

1.2. Rizosfera

La rizosfera es la zona del suelo alrededor de las raíces de las plantas, donde se acumulan nutrientes que generan un hábitat propicio para diferentes y muy variados organismos (El-Khawas y Adachi, 1999). La zona es muy distinta al resto del suelo (Díaz *et al.*, 2001) ya que posee características fisicoquímicas propias gracias a los exudados de la raíz, que proveen una gran cantidad de fuentes de carbono orgánico fácilmente degradables. La población de la rizosfera también contribuye a la formación de los ecosistemas terrestres con la aportación de productos provenientes de sus actividades fisiológicas (Assmus *et al.*, 1995). En conjunto la interacción entre la raíz y los organismos edáficos contribuye en la determinación del pH, la cantidad y naturaleza de los nutrientes en solución, la concentración de O_2 y CO_2 , la humedad y la cantidad de aire existentes en la rizosfera (El-Khawas y Adachi, 1999).

En la rizósfera se encuentran en mayor abundancia bacterias, hongos (micorrícicos o no), protozoarios, algas y microfauna, como por ejemplo nematodos y numerosos artrópodos (Glick, 1995).

La zona de mayor actividad en la rizósfera es el área cercana a la zona de crecimiento activo de la raíz: 1-3 cm, del ápice, los extremos de las raíces laterales y los pelos radicales

(Barea, 1998). Los exudados de las plantas contienen carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos, derivados de ácidos nucleídos, hormonas, enzimas y vitaminas (El-Khawas y Adachi, 1999; Barea, 1998 y Ferrera-Cerrato, 1995) los que directa o indirectamente tienen influencia positiva o negativa sobre los microorganismos que ahí se desarrollan.

Es importante señalar que por toda la actividad que ocurre en la rizosfera, las partículas de suelo poseen una gran estabilidad debido a la acción mecánica de las raíces y a la acción cementante de los exudados orgánicos, lo que facilita que las bacterias se unan a la superficie de las partículas del suelo (Olalde y Aguilera 1998). Ahí las bacterias se encuentran rodeadas de su propia cápsula de polisacáridos que con el tiempo pasará a formar parte integrante del mucigel (Barea, 1998).

1.3. PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

Los microorganismos al igual que la raíz fabrican exudados orgánicos que tienen un efecto directo o indirecto, positivo o negativo sobre las plantas, así como sobre los microorganismos (Díaz *et al.*, 2001).

Las bacterias que interactúan con las plantas, de acuerdo al efecto que producen se clasifican en:

- I) Benéficas (simbiontes y de vida libre).
- II) Dañinas (patógenos que atacan a las plantas, ejemplo: *Fusarium sp*, *Pythium sp*, *Rhizoctonia sp*).
- III) Neutrales (Glick *et al.*, 1999).

Las denominadas PGPR (Kloepper y Schroth, 1978) son las que se emplean como biofertilizantes y agentes de control biológico y tienen efectos en la planta de dos formas:

- 1) Acción directa: Proveen a la planta de nutrientes sintetizados por las bacterias o facilitan a la planta la captura de nutrientes provenientes del medio. Este tipo de PGPR se considera como biofertilizantes y fitoestimuladores.

Los mecanismos directos utilizados por las PGPR para estimular el crecimiento de las plantas son:

- a) Solubilización de fósforo.
- b) Fijación de nitrógeno atmosférico.
- c) Captura y solubilización del hierro presente en el suelo por medio de los sideróforos.
- d) Producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas, etc.) que contribuyen al desarrollo de las plantas.
- e) Disminución de la producción de etileno.
- f) Síntesis de enzimas que modulan el crecimiento de las plantas (Glick *et al.*, 1999).

Entre las PGPR que actúan directamente en la planta se encuentran las bacterias fijadoras de nitrógeno, las cuales brindan una ayuda significativa al desarrollo de la planta cuando hay poco nitrógeno en el suelo (Glick *et al.*, 1999).

2) Acción indirecta: Disminuyen o previenen los efectos negativos de agentes patógenos. Las bacterias que protegen a la planta del ataque de patógenos se denominan agentes de control biológico (Glick *et al.*, 1999).

Los mecanismos indirectos utilizados por las bacterias para estimular el crecimiento de las plantas corresponden a:

- a) Producción de antibióticos.
- b) Agotamiento del hierro procedente de la rizósfera.
- c) Inducción de resistencia sistémica.
- d) Síntesis de metabolitos antifúngicos.
- e) Producción de enzimas que destruyen la pared celular de los hongos.
- f) Competencia en la colonización de las raíces y
- g) Competencia por nutrientes (Whipps, 2001 y Glick *et al.*, 1999).

El “control biológico” de organismos fitopatógenos incluye el empleo de plantas transgénicas resistentes a varios patógenos o bien el uso de bacterias que suprimen o previenen la acción de los fitopatógenos (Glick *et al.*, 1999).

1.4. *Azospirillum sp*

Morfológicamente *Azospirillum* es un espirilo Gram negativo o Gram variable que se desarrolla a temperatura de 34 a 37 °C, el pH óptimo para algunas especies es de 7 pero otras crecen mejor en pH más ácido (Holt *et al.*, 1994). Presenta dos tipos de flagelos uno polar y otro lateral, durante su desarrollo en un medio líquido un flagelo polar es sintetizado (Hall y Krieg, 1983) con el que puede desplazarse helicoidalmente o con vibraciones (Holt *et al.*, 1994). Durante el desarrollo en un medio sólido se induce el crecimiento de un flagelo lateral, adicional al flagelo polar (Hall y Krieg, 1983), útil para trasladarse sobre superficies sólidas (Vande *et al.*, 1998).

La movilidad es una de las principales características del género *Azospirillum* la que es esencial para colonizar el sistema radicular (Tarrand *et al.*, 1978), la bacteria es atraída por compuestos químicos no específicos presentes en los exudados de la raíz (Bashan, 1986). Bajo condiciones de estrés *Azospirillum* presenta diversos mecanismos que le permiten sobrevivir, tales como: a) la formación de quistes, b) formación de flóculos, c) producción de melanina, d) síntesis de polisacáridos, etc. (Bashan *et al.*, 1991), los que aseguran su persistencia en la rizósfera por periodos prolongados en la rizósfera (Glick *et al.*, 1999).

Azospirillum es un género que se ha descrito como un buen competidor en la rizósfera (Bashan y Levanony, 1990) con capacidad para promover el desarrollo vegetal, no es específico por lo que puede ser utilizado en el cultivo de una gran variedad de familias de plantas comerciales (Bashan y Levanony, 1990). El género se encuentra ampliamente distribuido en el suelo y está asociado a plantas gramíneas y plantas no gramíneas (Baca *et al.*, 2000 y Han y New, 1998) coloniza principalmente la rizósfera de cereales en regiones tropicales y subtropicales proporcionando amplios beneficios (Assmus *et al.*, 1995 y Puente y Bashan, 1993).

Sin embargo el incremento en el rendimiento de las plantas por efecto de la inoculación con *Azospirillum* es variable e inconsistente en condiciones de campo (Bashan y Levonony, 1990 y Bashan *et al.*, 1995), esto debido a la diversidad de microambientes con los cuales se enfrenta y diferentes factores bióticos y abióticos del suelo, etc. (Bashan *et al.*, 1995 y Sánchez, 2000).

Existe poca información sobre las variables del suelo y su efecto en *Azospirillum*. No obstante en los últimos 30 años de estudio se han evidenciando sus habilidades potencialmente benéficas para las plantas, como la fijación de nitrógeno atmosférico (Tarrand *et al.*, 1978) y la producción de fitohormonas (Hartmann *et al.*, 1995) tales como el ácido indol-3-acético (IAA), giberelinas, auxinas, citoquininas y ácido absícico (Lynch, 1990 citado por Díaz *et al.*, 2001).

Por muchos años se pensó que la fijación del nitrógeno por parte de *Azospirillum* era determinante sobre las plantas, hoy en día, hay evidencias de que el incremento en el desarrollo de las plantas se debe más a la producción de fitohormonas (Han y New, 1998) y que la fijación del nitrógeno contribuye en no más del 5% para el desarrollo de las plantas (Lin *et al.*, 1983).

Azospirillum provoca cambios en las plantas como son la elongación de la raíz, el crecimiento de raíces laterales y de pelos radiculares; al aumentar el área radicular favorece la absorción de agua y minerales (Okon y Vanderleyden, 1997) incrementa el rendimiento de las plantas (De Freitas y Germida, 1992). La mejor captación de agua y nutrimentos minerales aumentan la cantidad de materia orgánica fijada por la planta, por lo que el tallo y las hojas lucen más robustas (Bashan y Dubrovsky, 1996).

Los efectos de *Azospirillum* en las plantas dependen de varios factores como son la concentración del inóculo aplicado, las especies de plantas a las cuales se les aplique el inóculo y las condiciones ambientales. La concentración óptima es de aproximadamente 10^7 UFC semilla⁻¹ o planta⁻¹; concentraciones relativamente altas pueden causar la inhibición de la elongación de la raíz (Okon y Kapulnik, 1986).

1.4.1. Interacciones de *Azospirillum* en el suelo

Adsorción a las partículas de suelo

La sobrevivencia que *Azospirillum* presenta en la rizosfera al ser introducido a diferentes suelos, varia, aun se desconoce el efecto proporcional que cada una de las variables edáficas aporta a la sobrevivencia de la bacteria y se ignora también si la manipulación de ellas puede afectar la sobrevivencia de *Azospirillum* (Bashan *et al.*, 1995).

El porcentaje de arcilla, materia orgánica, nitrógeno y capacidad de campo están positivamente asociados con la sobrevivencia de *Azospirillum* en el suelo, en tanto que la textura y los niveles de CaCO₃ en el suelo tienen una influencia negativa en la sobrevivencia de la bacteria. Otras variables del suelo como el porcentaje de fósforo, potasio, pH, conductividad eléctrica y la relación carbono/nitrógeno, no tienen efecto

notorio o directo alguno sobre la viabilidad de las bacterias en el suelo (Bashan *et al.*, 1995).

La distribución de las bacterias en el suelo generalmente es heterogénea, su penetración depende de la adsorción que exista entre las células bacterianas y las partículas del suelo, también es importante el movimiento bacteriano a través de los poros del suelo y la disponibilidad de las películas de agua (Bashan, 1999). La arcilla y la materia orgánica juegan el papel más importante en la adsorción de las bacterias a las partículas del suelo dentro de la rizósfera (Bashan y Levanony, 1988). La mayor parte de los minerales presentes en las arcillas tienen carga eléctrica negativa al igual que las células bacterianas (Bashan, 1999). Sin embargo el mecanismo por el cual ambas se adsorben se detalla a continuación.

Las arcillas y la materia orgánica presentan características coloidales, en su superficie tienen una carga eléctrica negativa alternada con cargas positivas procedentes de los cationes atraídos electrostáticamente (Glick *et al.*, 1999). Los cationes presentes en la solución del suelo que pueden ser adsorbidos por las partículas coloidales se denominan cationes intercambiables, los iones se mueven dentro del suelo de un coloide a otro y pueden ser absorbidos por seres vivos o ser lavados y perdidos en los mantos freáticos (Fanning, 1989 y Wild, 1992).

Los cationes atraídos por el campo eléctrico de los coloides se distribuyen alrededor de la superficie coloidal formando una concentración muy especial que recibe el nombre de doble capa difusa, la cual depende de la fuerza de atracción del coloide y de la carga eléctrica de los cationes adsorbidos. Esta doble capa difusa se genera del gradiente de concentración iónica entre la superficie del coloide y la solución del suelo, es menor entre mayor es la valencia de los iones adsorbidos ya que con mayor fuerza se unen a la superficie coloidal creando poca dispersión iónica; los coloides con los cationes intercambiables adsorbidos formando la doble capa difusa, presenta una carga superficial positiva (Wild, 1992).

Las arcillas con la doble capa difusa presentan carga eléctrica neta positiva y por fuerza electrostática adsorben a las bacterias que tienen carga eléctrica negativa en su membrana. En las interacciones entre bacterias y arcillas existen uniones por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (Stotzy, 1985 citado por Glick *et al.*, 1999). En el caso de *Azospirillum* se ha observado que la máxima adsorción a las partículas de arcilla ocurre cuando estas están presentes en el suelo en un 5 % y el contenido de materia orgánica alcanza el mismo valor (Bashan y Levanony, 1988 y Bashan, 1999).

La capacidad de cationes intercambiables del suelo refleja la cantidad de sitios positivos que existen sobre la superficie de las partículas del suelo, es por ello que tiene una relación directa con el nivel de adsorción entre las bacterias y las partículas del suelo, a una mayor capacidad de cationes intercambiables corresponde una mayor adsorción de células bacterianas (Govindarajan y Purushothaman, 1989).

Adsorción a la raíz

En la rizósfera *Azospirillum* es atraído hacia los exudados de la raíz tales como azúcares, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos y aminoácidos como el ácido aspártico y la glicina (Bashan, 1999; Glick *et al.*, 1999 y Vande *et al.*, 1998). *Azospirillum* se une a las raíces mediante dos formas de adhesión, una es débil y rápida y esta mediada por proteínas bacterianas; la segunda es fuerte e irreversible denominada fase de anclaje, esta ocurre mediante la acción de polisacáridos extracelulares bacterianos (Vande *et al.*, 1998).

En la rizósfera las bacterias tienen una distribución desigual; las zonas de mayor actividad bacteriana en general son los sitios de elongación y los pelos radicales (Bashan, 1994). *Azospirillum* se distribuye en la raíz primaria y secundaria pero es más abundante en los pelos radicales, prefiriendo los extremos de estos (Assmus *et al.*, 1995).

Azospirillum coloniza eficientemente la raíz en gran parte por los agregados que forma, los cuales le dan una ventaja ecológica en la lucha por los nutrientes en la rizósfera. Entre los factores que afectan su migración son: 1) la presencia en el suelo de una película continua de agua y 2) el gradiente de oxígeno que existe (Bashan, 1994).

Efecto en suelos degradados

El efecto benéfico en las plantas por la inoculación con *Azospirillum* es más evidente en suelos pobres en nutrientes y en suelos muy deteriorados. Bajo estas condiciones se ha registrado un incremento de la masa vegetal seca cercano al 60 % y la longitud de la raíz aumenta casi al 100 %. Es tan notable su beneficio que ya se está investigando su aplicación en la remediación ambiental: 1) biorremediación de aguas residuales, 2) reforestación de manglares y 3) reforestación de desiertos (Bashan 2000).

1.5. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es un bacilo Gram positivo con endospora en posición subterminal, presenta flagelos peritricos y su metabolismo es aerobio o anaerobio facultativo (Rojas, 2002). La endospora que produce es capaz de soportar condiciones extremas de temperatura, estrés hídrico y limitación de nutrientes (Alexander, 1977).

El principal hábitat de esta bacteria es el suelo, donde se encuentra libre o asociada a las raíces de las plantas, también se localiza en el agua y aire. Es estudiado desde los años sesentas por los efectos que tiene sobre el crecimiento de las plantas, ha sido identificado como una PGPR de competencia moderada en la rizósfera (Kloepper *et al.*, 1992).

Bacillus subtilis se emplea como un agente de control biológico gracias a los péptidos antifúngicos que produce tales como iturinas, y surfactinas (Stein, 2005), tiene una gran estabilidad y resistencia en el suelo por presentar endoesporas que facilitan su manejo (Asaka y Shoda, 1996). También es considerado como biofertilizante debido a que es capaz de sintetizar sustancias promotoras de crecimiento incluyendo giberelinas y ácido indolacético (Wilpat *et al.*, 1999 citado por Rojas, 2002). También puede convertir compuestos insolubles de fósforo [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] en formas más asimilables para las plantas (fosfatos di y

monobásicos) (Alexander, 1977; Salih *et al.*, 1989 citados por Díaz, 2001). Los estudios de *Bacillus subtilis* se han enfocado a la capacidad que exhibe para suprimir enfermedades fúngicas,

El control biológico es la acción de un organismo vivo (llamado antagonista), para eliminar o disminuir la enfermedad que otro organismo (patógeno) le causa a un tercer organismo (huésped) (Dowling y O'Gara, 1994).

Las preparaciones comerciales de bacterias antagonicas a hongos fitopatógenos son tan efectivas para el control como lo son los fungicidas (Herrera-Estrella y Chet 1996 citados por Jiménez, 1996), pero son muy pocas las que están disponibles en el mercado (Cook y Baker, 1983). Un ejemplo de control biológico comercial es *Bacillus subtilis* A-13 el cual incrementa la producción de cultivos de zanahoria y avena (Weller, 1988).

Para que un microorganismo antagonico se pueda utilizar en el desarrollo comercial de un agente de control biológico, deben de cumplirse los siguientes criterios: 1) efectiva supresión del patógeno; 2) consistencia en los resultados en condiciones de campo; 3) adaptación a un sistema de manejo integrado para el control de plagas y enfermedades; 4) precio competitivo con otras medidas de combate; 5) compatibilidad con otros tratamientos para el control de otras plagas o enfermedades; 6) adaptación al uso cotidiano de las prácticas agrícolas; 7) inocuidad a otras especies, al hombre y al ambiente (Jiménez *et al.*, 2001).

En el laboratorio de Bioquímica Ecológica del Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Unidad de Irapuato del CINVESTAV se probó la eficacia de la cepa BEB-8bs de *Bacillus subtilis* como un biofungicida útil en contra de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium spp.* y *Phytophthora infestans* y se determinó que la estabilidad de su capacidad antagonica es de más de 6 meses sin refrigeración (Jiménez *et al.*, 2001).

En diferentes estados de la República Mexicana bajo condiciones de campo se comprobó la eficacia de la cepa BEB-8bs de *Bacillus subtilis* en la producción de papa; la concentración empleada fue de al menos 10^6 UFC por mL, requiriéndose al menos un litro por hectárea; con lo que se logró controlar la enfermedad y obtener más Kg de cosecha por hectárea aumentando la calidad. Se concluyó que la cepa BEB-8bs de *Bacillus subtilis* aparte de inhibir el crecimiento de organismos fitopatógenos también estimula el crecimiento de las plantas (Jiménez *et al.*, 2001). El producto comercial de estas investigaciones es "Probacil", cuyo control de calidad asegura 10^8 células mL⁻¹.

2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Hipótesis

La acción de las PGPR que favorecen la nutrición de las plantas, así como de las que inhiben o suprimen a hongos fitopatógenos permitirá disminuir la cantidad y costo de aplicación de agroquímicos e incrementar la producción de hortalizas.

2.2. Objetivo General

Evaluar y comparar el efecto de la inoculación con un biofertilizante y un agente de control biológico en el crecimiento y producción de tres variedades de pepino bajo condiciones de invernadero.

2.2.1. Objetivos Específicos

- a) Evaluar el efecto de la cepa VS9 de *Azospirillum* en el crecimiento y producción del pepino.
- b) Evaluar el efecto del agente de control biológico *Bacillus subtilis* “Probacil” en la producción del pepino.
- c) Evaluar el efecto de la inoculación combinada de la cepa VS9 de *Azospirillum* junto con “Probacil” en el crecimiento y producción del pepino.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PGPR

Se emplearon dos bacterias promotoras del desarrollo vegetal cuyas características se describen en el cuadro 1.

Cuadro 1. PGPR empleados

Nombre	Origen	Ventajas	Uso
<i>Azospirillum brasilense</i> VS9	Cepario del Laboratorio de Microbiología Experimental, UNAM	Fija nitrógeno*, -Produce fitohormonas, -Promueve el crecimiento de jitomate	Biofertilizante Potencial
<i>Bacillus subtilis</i> BEB-8bs	Producto comercial denominado "Probacil" Aislamiento y crecimiento en el Laboratorio de Bioquímica Ecológica, Unidad de Irapuato del CINVESTAV	** Suprimen el desarrollo de <i>Rhizotocnia solani</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Verticillium</i> y <i>Phytophthora infestans</i> **	Agente de control biológico

* Esquivel (2002) y Ramírez *et al* (2002)

** Jiménez *et al* (2001) y Rojas (2002)

3.2 Ensayo preliminar

Determinación de antagonismo entre las bacterias en estudio por el método de estría modificado

En placas de medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) se inoculó *Bacillus subtilis* mediante una estría recta en la parte central de las placas y se incubó a 28° C durante 48 horas en oscuridad. Después cada placa se cubrió mediante la adición de 10 mL del mismo medio previamente fundido; las placas se colocaron en refrigeración por 24 h con el fin de que los metabolitos producidos por la bacteria se difundieran en el medio; posteriormente se inoculó con 0.1 mL de la suspensión de *Azospirillum brasilense*, se extendió homogéneamente en toda la superficie. Las placas se incubaron a temperatura ambiente de 1 a 3 días, procediéndose a observar las zonas de crecimiento y/o inhibición de *Azospirillum*.

3.3. Semillas

Se emplearon semillas de pepino holandés de dos variedades: Langley e Idate con germinación de 92 % y 90 % respectivamente y semillas de pepino americano variedad Pointsett con 90 % de germinación. La variedad Langley se adquirió en Ahern International seeds co. en la sucursal de Puebla, la variedad Idate se consiguió en Western seed co. México S.A de C.V. en Jalisco y la variedad Idate se obtuvo en "Semillas Treviño" en México, D.F.

3.4. Suelo

Se analizó una muestra compuesta procedente de las camas de siembra, en el cuadro 2 se señalan los análisis físicos y químicos realizados.

Cuadro 2. Análisis físicos y químicos del suelo.

ANÁLISIS	MÉTODO
Textura	Hidrómetro de Bouyoucos
Densidad Aparente	Probeta (Baver 1956)
Densidad Real	Picnómetro (Baver 1956)
pH agua	Potenciómetro
Materia Orgánica	Walkey y Black (1947)
CICT	Método volumétrico (EDTA)
Nitrógeno	Kjeldhal

3.5. Preparación de los inoculantes

Considerando que el “Probacil” se comercializa en forma líquida, en este experimento se empleó la misma presentación para el biofertilizante

Obtención del biofertilizante líquido

La cepa se activó en el medio Malato sales libre de nitrógeno más biotina en estado semisólido conocido como Nfbss (Döbereiner y Day 1976), se incubó a 34° C durante 72 h. Después se realizó la adaptación y propagación de la misma en el medio Malato sales con cloruro de amonio e incubación a 34° C, 200 rpm durante 72 h para la adaptación y 24 h para la propagación. El biofertilizante se obtuvo a partir del cultivo de propagación al que se le adicionó medio de cultivo estéril hasta obtener una absorbancia de 0.02 que corresponde a una densidad poblacional aproximada de 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) mL^{-1} de biofertilizante. Con esta concentración, en estudios previos realizados en el laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM, se obtuvieron los mejores resultados en la producción de jitomate (Cuadro 3) (Urzúa, 2001). Para las lecturas de absorbancia se empleó un espectrofotómetro Spectronic 20D a 560 nm (A_{560}).

Agente de control biológico

El inóculo de Probacil se hizo de acuerdo a las especificaciones de la etiqueta, en ella se indica la concentración de *Bacillus subtilis* que es de 10^8 células mL y la dosis de aplicación que corresponde a 500 mL ha^{-1} , se procedió a diluir el producto comercial en el agua necesaria para efectuar el riego de las charolas de germinación o de la superficie de suelo utilizada en el invernadero.

Cuadro 3. Concentración del biofertilizante con la cual se obtuvo el mejor rendimiento en la producción del jitomate (Urzúa, 2001).

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

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

3.6. Calidad de los inoculantes

Para determinar la calidad de estos productos se empleó el método de dilución y siembra en placa vertida. Para ello, de cada producto se preparó una serie de diluciones decimales (10^{-1} hasta 10^{-8}); a partir de cada dilución se hizo la inoculación en placa por triplicado, y después se agregó el medio de cultivo previamente fundido. Los medios de cultivo y condiciones de incubación empleados fueron: para *Azospirillum*, Agar nutritivo, 34 ° C/72 h y para *Bacillus subtilis* Tripticasa soya agar, 28° C/48 h

3.7. Ensayos de invernadero, tratamientos y prácticas culturales.

Se efectuaron dos experimentos: el primero, de agosto a diciembre de 2003 y el segundo, de marzo a junio de 2004, en el invernadero ubicado al sur de Santiago Tepalcatlalpan al oeste de la delegación Xochimilco.

Experimento 1

Se utilizó pepino de las variedades Langley e Idate, se probaron 4 tratamientos: Testigo (sin inocular) y los inoculados, uno con *Azospirillum* (VS9), otro con Probacil y el cuarto con mezcla de VS9 y Probacil.

Siembra

La siembra se realizó en agosto 29 y 30, y septiembre 4. Para ello se emplearon 4 charolas negras de plástico con 50 cavidades (1 charola por tratamiento); las que contenían como soporte una mezcla de turba, (PROMIX), agrolita y vermiculita (80,10,10); en cada cavidad se colocaron 1 o 2 semillas. Para eliminar residuos de fungicidas, antes de la siembra las semillas se lavaron cinco veces consecutivas con agua corriente.

Inoculación

Siete días después de la siembra (dds), cada plántula fue inoculada con 200 µL del Biofertilizante o de Probacil. En todos los casos se procuró el contacto del inoculante con la

raíz. Las charolas se mantuvieron dentro del invernadero a una temperatura de 35/18° C (día/noche) y una humedad de 70 %.

Transplante

Se realizó 28 dds y se efectuó en el invernadero en donde seis semanas antes, el suelo se trató con una solución nematicida, se volteó, niveló y se prepararon montículos o camas de siembra a lo largo del invernadero, con pasillos entre ellas. Para controlar la humedad se extendió una cubierta de plástico sobre cada cama y se hicieron perforaciones para colocar en cada una la plántula correspondiente. Los tratamientos se distribuyeron en cuatro camas de acuerdo a las facilidades otorgadas por el productor (Foto 1).

Experimento 2

Se utilizó pepino americano variedad Pointsett

Siembra

La siembra se realizó la primera semana de marzo y se hizo directamente en el suelo del invernadero preparado en la forma antes descrita.

Inoculación

Se realizó en dos ocasiones, la primera al momento de la siembra y la segunda 21 dds. En el primer caso las semillas previamente lavadas se colocaron en 250 mL del biofertilizante líquido y se dejaron reposar durante 1 hora; las semillas de los testigos se colocaron en agua por el mismo tiempo y para los tratamientos en los que se empleó el producto comercial, este se agregó inmediatamente antes de la siembra, para ello en cada horadación se colocó 1.0 mL de Probacil.

La segunda inoculación se hizo 21 dds, en este caso, a cada planta se le aplicaron 200µL del biofertilizante o de Probacil.

Cuidados del cultivo en ambos experimentos.

Riego y Fertilización

El riego se aplicó una vez al día y se procuró que en cada uno de los riegos se humedeciera completamente el sustrato. Los elementos y microelementos adquiridos a granel se agregaron una sola vez en diferentes etapas de desarrollo, para ello en el agua de riego se mezclaron los siguientes compuestos: nitrato de potasio marca Champion SQM, nitrato de calcio marca Barco Vikingo, nitrato de amonio marca Olmeca Champion, fosfato monoamónico marca High Purity, sulfato de potasio marca EPQN, sulfato de magnesio heptahidratado marca Sulmag Peñoles, sulfato ferroso marca EPQN, sulfato de manganeso marca Sulfamex, tetraborato de sodio marca IQC, sulfato cúprico marca IQCitrus, sulfato de zinc marca QFI y ácido fosfórico marca Abaquim; en proporciones tales que permitieran aportar las concentraciones indicadas en el cuadro 4, que corresponden a las dosis utilizadas por el productor.

Cuadro 4. Cantidad de nutrimentos suministrados al cultivo (ppm / 1000 L) a través del fertilizante.

Etapa de desarrollo	N	P	K	Mg	Ca	C	Fe	Mn	B	Cu	Zn
Antes del trasplante*	112	63	91	20	82	39	2	1	< 1	< 1	< 1
Al inicio de la floración	126	91	117	30	83.3	45	3	1	< 1	< 1	< 1
Durante la fructificación	201	96	186	40	162	64	3	1	< 1	< 1	< 1
Inicio de la cosecha	219	88	232	40	184	84	3	1	< 1	< 1	< 1

* En almácigo

Poda

Para controlar la forma de la planta y crecimiento se eliminaron yemas y brotes sin que se despuntara el tallo principal; en las ramas laterales sólo se permitió el desarrollo hasta el segundo fruto despuntándose en la tercera hoja. Estas actividades se realizaron con tijeras previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio comercial al 5 %.

Entutoramiento

El tutor se colocó cuando la planta alcanzó de 50 a 60 cm de altura. La base del tallo se ajustó con un anillo de plástico al cual iba sujeto un cordón de rafia, éste se enredo sobre la planta procurando no lastimar los ramilletes florales, el otro extremo del cordón se sujetó a un alambre, el cual estaba sujeto y tensado a la estructura del invernadero y corría a lo largo por encima y paralelo a cada una de las camas (Foto 2).

Control de plagas y enfermedades

En el cuadro 5 se observan las plagas y enfermedades que se presentaron durante el cultivo y el producto químico que se empleó para controlar a los organismos fitopatógenos. Las dosis que se emplearon estuvieron señaladas en la etiqueta de cada producto.



Foto 1. Distribución de las camas en el invernadero.



Foto 2. Entutoramiento de las plantas del pepino.

Cuadro 5. Control de plagas del cultivo.

Nombre Común	Nombre Científico	Producto empleado	Dosis	Aplicación
Mosca Blanca	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Confidor	0.75-1.0 L/ha	Se aplica al suelo dirigido a la base de la planta, después del trasplante.
Trips	<i>Frankliniella spp.</i>	Thiodan	0.6-1.0 L/ha	Se aplica por vía foliar cuando aparezca la plaga o al tener un 5% de infestación.
Cenicilla u Oído	<i>Erysiphe polygoni</i> y <i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Captan	2-3 kg/ha	Se aplica a los primeros síntomas. Repetir cada 5-7 días.
Mildiu	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Mancozeb	1.8 Kg/ha	Se aplica cuando comienzan a crecer las primeras hojas. Repetir cada 7 a 10 días si es necesario.
Araña Roja	<i>Tetranychus urticae</i>	Dicofol y Kelthane	0.1-0.15%	Se aplica cuando los ácaros están en estado larval y adulto.
Gallina Ciega	<i>Phyllophaga spp.</i>	Thionex, Vydalel y Oxamilo	10 L/ha	Se aplica con el primer riego después del trasplante. Máximo 2 aplicaciones.

VARIABLES EVALUADAS

3.8. Colonización en raíces

Para determinar el patrón de colonización por *Azospirillum*, las raíces de las plántulas fueron lavadas y desinfectadas con hipoclorito de sodio al 6 %, después las raíces se cortaron en tres segmentos iguales: corona, media y distal. Cada fracción se desinfectó y se sembró en un tubo con medio Nfbss, los tubos se incubaron a 35° C y se registró el crecimiento a las 24, 48 y 72 horas. Se consideraron positivos aquellos tubos que presentaron las características típicas de *Azospirillum* que corresponden a la alcalinización del medio y formación de una película blanca de 2 a 3 mm por debajo de la superficie del medio (Tarrand *et al.*, 1978) (Foto 3). Para confirmar la presencia de *Azospirillum*, de los tubos que resultaron positivos se tomó una asada y se transfirió a un tubo con solución salina isotónica estéril, a partir de esta suspensión se sembró en Agar Rojo Congo (Rodríguez Cáceres, 1982) y Agar Infusión de Papa (Tarrand *et al.*, 1978), estos medios de cultivo sirven para el diagnóstico de esta cepa ya que comprueban con el crecimiento típico de las colonias el género al cual pertenecen las mismas, también se hicieron observaciones en el microscopio óptico de campo claro.

Diámetro del tallo

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



Foto 3. Alcalinización del medio Nfbss por parte de *Azospirillum*, donde se sembraron los distintos segmentos de la raíz de pepino: corona, media y distal.

Calidad de los frutos y producción.

La cosecha del pepino europeo se inició a los 80 dds y se realizaron cinco cortes de los cuales el cuarto fue de limpieza, en el caso del pepino americano la cosecha se inició a los 70 dds y se hicieron 4 cortes. En los frutos cosechados se determinó la longitud, el diámetro y el peso.

3.9 Diseño de experimento

Los cuatro tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental unifactorial completamente al azar con cuatro repeticiones, en cada repetición se consideró un bloque con 42 plantas. De cada tratamiento se muestrearon 20 plantas. Los datos se observan en las figuras 1 y 2.

3.10 Análisis de resultados

Para establecer las diferencias globales entre tratamientos se empleó el análisis de varianza simple (ANOVA de una vía) con un nivel de significancia del 95 % ($\alpha = 0.05$). En las variables que se registraron diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey. El análisis estadístico se efectuó con el paquete estadístico SPSS (Programa estadístico para las ciencias sociales).

TA	PROBACIL	VS9	TA	VS9 + PROBACIL	PROBACIL	VS9	VS9 + PROBACIL
VS9 + PROBACIL	VS9	PROBACIL	VS9 + PROBACIL	VS9	TA	TA	PROBACIL
TA	PROBACIL	VS9	VS9 + PROBACIL	VS9	VS9 + PROBACIL	TA	PROBACIL
VS9 + PROBACIL	TA	PROBACIL	VS9	VS9 + PROBACIL	PROBACIL	VS9	TA

Figura 1. Distribución de los tratamientos en el invernadero durante el ensayo con pepino europeo.

VS9	PROBACIL	VS9 + PROBACIL	TA
PROBACIL	VS9 + PROBACIL	TA	VS9
TA	VS9	PROBACIL	VS9 + PROBACIL
VS9	TA	VS9 + PROBACIL	PROBACIL

* De cada tratamiento se muestrearon sólo 20 plantas.

Figura 2. Distribución de los tratamientos en el invernadero durante el experimento con pepino americano.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Análisis de suelo.

Es un suelo de origen volcánico basáltico, con densidad real de 2.13 g/cm^3 , formado por el transporte y acumulación de materiales (González *et al.*, 1979 citado por Salinas, 2002); constituyendo la unidad edafológica denominada Feozem háplico (INEGI, 1979). En el cuadro 6 se observan los resultados de los análisis realizados,

Cuadro 6. Características físicas y químicas del suelo, a no más de 20 cm de profundidad.

Textura			Densidad aparente (g/cm ³)	Densidad real (g/cm ³)	pH	Materia Orgánica (%)	Nitrógeno total (%)	CICT meq/100g
Arena	Limo	Arcilla						
84%	0%	16%	0.86	2.13	6.52	8.02	0.29	20.75

Es un suelo fértil, considerado rico a extremadamente rico por su alto porcentaje de materia orgánica (Cuadro 6) (Velasco, 1983 y Fassbender *et al.*, 1987). Su textura es migajón arenosa coincidiendo con lo descrito por Salinas (2002) y Jiménez (2004) para las zonas cerriles, presenta 16 % de arcillas, 0 % limo y 84 % de arenas, permitiendo la adecuada circulación de aire y agua así como el paso de las raíces de las plantas, retiene poco la humedad, tiene buen drenaje y permeabilidad (Foth, 1990 y Salinas, 2002). Se trata de un suelo de cultivo no muy profundo con poco grado de compactación (Fanning, 1989 y Wild, 1992), su densidad aparente es baja de 0.86 g/cm^3 . El pH que presenta es ligeramente ácido, permitiendo la máxima disponibilidad de nutrientes (Fanning, 1989 y Wild, 1992); presenta una alta capacidad de intercambio catiónico total (CICT) (Cottenie, 1980 citado por Vázquez y Bautista, 1993), es un suelo rico en coloides: arcilla y materia orgánica (Foth, 1990), los coloides adsorben y retienen a las bacterias en el suelo de la rizósfera. Por sus características fisicoquímicas, el suelo resulta ser adecuado para la sobrevivencia de las bacterias, permitiendo la colonización de la raíz de las plantas.

4.2. Determinación de antagonismo entre las bacterias en estudio por el método de estría modificado.

En las observaciones registradas a las 24, 48 y 72 h se observó el desarrollo masivo de *Azospirillum* sobre toda la superficie de las placas, lo que indica que los productos secretados por *Bacillus subtilis* no afectan su desarrollo.

4.3. Calidad de los inoculantes.

La calidad de los biofertilizantes y agentes de control biológico está dada en gran medida por la cantidad de microorganismos viables que contienen. En este tipo de productos poblaciones de 10^5 UFC mL^{-1} para los primeros y 10^6 UFC mL^{-1} para los agentes de

control biológico, son consideradas como índices de buena calidad (Jiménez, 2001; Okon y Kapulnik, 1986 y Urzúa, 2001).

En el cuadro 7 se observa que el biofertilizante producido es de buena calidad ya que la lectura de UFC mL⁻¹ fue superior a 10⁵ (Urzúa, 2001). En tanto que en el producto comercial se detectó el desarrollo de dos tipos de colonias, la observación microscópica de ellas permitió constatar la presencia de bacilos Gram positivos y Gram negativos, con base en estos resultados se procedió a cuantificar las colonias que correspondían a los Gram positivos y el número obtenido de UFC mL⁻¹ fue menor al señalado como índice de calidad (Jiménez, 2001) así como al registrado en el membrete del producto.

Cuadro 7. Cantidad de microorganismos viables en los inoculantes en estudio

Biofertilizante	Cepas	A ₅₆₀	UFC mL ⁻¹
		VS9	0.022
Agente de control biológico	Probacil	ND*	1.5 X 10 ⁴

*No se determinada

A₅₆₀. Longitud de onda

Experimentos 1 y 2

4.4. Colonización de la raíz por *Azospirillum*

En el cuadro 8 se muestran los resultados de crecimiento de las diferentes secciones de raíces sembradas en tres tubos con Nfbss los que resultaron similares en la tres variedades empleadas (Langley, Idate y Pointsett). En este se observa que el testigo (sin inocular) estuvo libre de bacterias, lo que confirma que el experimento fue bien conducido y que la colonización fue exitosa en todos los tratamientos inoculados. En todos los casos la mayor colonización se ubicó en el área de la corona y disminuyó progresivamente a lo largo de la raíz. En el tratamiento inoculado con *Azospirillum* y *Bacillus*, se observó que *Azospirillum* sólo se presentó en la corona, en tanto que en las otras secciones de la raíz no se registró, lo que probablemente sea una consecuencia de competencia en donde *Bacillus* desplazó la población de la otra bacteria. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo reportado por Roberts *et al* (1999), quienes al analizar la distribución vertical de *Enterobacter cloacae* en la raíz del pepino encontraron el mayor porcentaje de población bacteriana en la parte proximal de la raíz decreciendo proporcionalmente al aumentar la distancia entre raíz y planta, por lo que indican que existe una correlación directa entre el área superficial radical y la colonización bacteriana.

Otros estudios sobre patrón de colonización bacteriana de raíces demuestran que éste varía con el tipo de bacterias, así como de vegetales. En el caso de *Azospirillum*, la literatura indica que esta se distribuye a lo largo de la raíz primaria y secundaria y que se encuentra de manera más abundante en los pelos radicales (Assmus *et al.*, 1995). Urzúa (2001) en sus estudios con jitomate confirmó la distribución de *Azospirillum brasilense* a lo largo de toda la raíz y reporta cantidades de 2 X 10⁶ UFC g⁻¹ de raíz.

Cuadro 8. Resultados de la colonización bacteriana en raíces de plántulas de pepino de 35 días de desarrollo.

Tratamiento	Colonización		
	Corona	Sección media	Sección distal
Testigo	---	---	---
VS9	+++	++d	d--
VS9+Probacil	+--	---	---
Probacil	ND	ND	ND-

+ Formación de película a las 24 horas con la alcalinización del medio a las 72 h
d Formación de película a las 48 h y a las 72 h está en la superficie. No hay alcalinización del medio, pero la observación microscópica, así como el desarrollo registrado en los medios selectivos, permitió concluir que se trata de *Azospirillum*
 - Sin crecimiento
ND No determinada

4.5. Diámetro del tallo

Los resultados de esta variable se muestran en las figuras 3, 4 y 5; se observa que en las variedades Langley e Idefe, los mejores tratamientos corresponden a los inoculados con el biofertilizante y la mezcla de éste con Probacil, en la variedad Pointsett el mejor tratamiento fue VS9, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (DES) con respecto a los tratamientos testigos.

Los resultados coinciden con lo reportado sobre las dos bacterias en estudio, referente a propiedades y efecto que tienen sobre el desarrollo de diversos vegetales. *Azospirillum* incrementa la elongación y el área superficial de la raíz, el desarrollo de raíces laterales y de pelos radicales (El-Shantnawi y Makhadmeh, 2001), favorece la absorción de agua y minerales (Okon y Vanderleyden, 1997), lo que se traduce en una mejor nutrición de la planta logrando que el tallo y las hojas luzcan más robustas (Bashan y Dubrovsky, 1996). Se deduce que las bacterias probadas son buenas competidoras en la rizósfera con capacidad para promover el desarrollo vegetal, como lo indican Bashan y Bashan (2002).

Bacillus subtilis por su parte contribuye a un mejor rendimiento vegetal al sintetizar sustancias promotoras de crecimiento como giberilina y ácido indolacético, facilita también la absorción de fósforo y ayuda principalmente al control de organismos patógenos al producir péptidos antifúngicos (Díaz *et al.*, 2000 y Rojas, 2002).

En el caso concreto de la cepa VS9 de *Azospirillum*, Urzúa (2001) y Esquivel (2002) reportan un efecto similar en plántulas de jitomate.

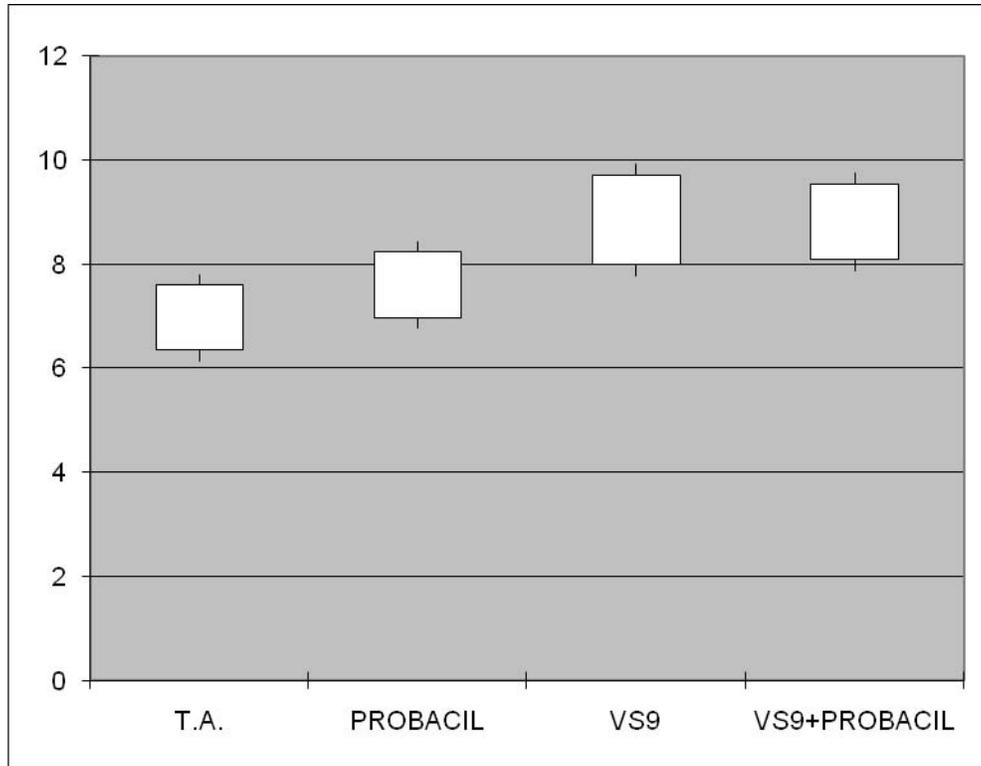


Figura 3. Diámetro del tallo de la planta a los 52 dds, variedad Langley

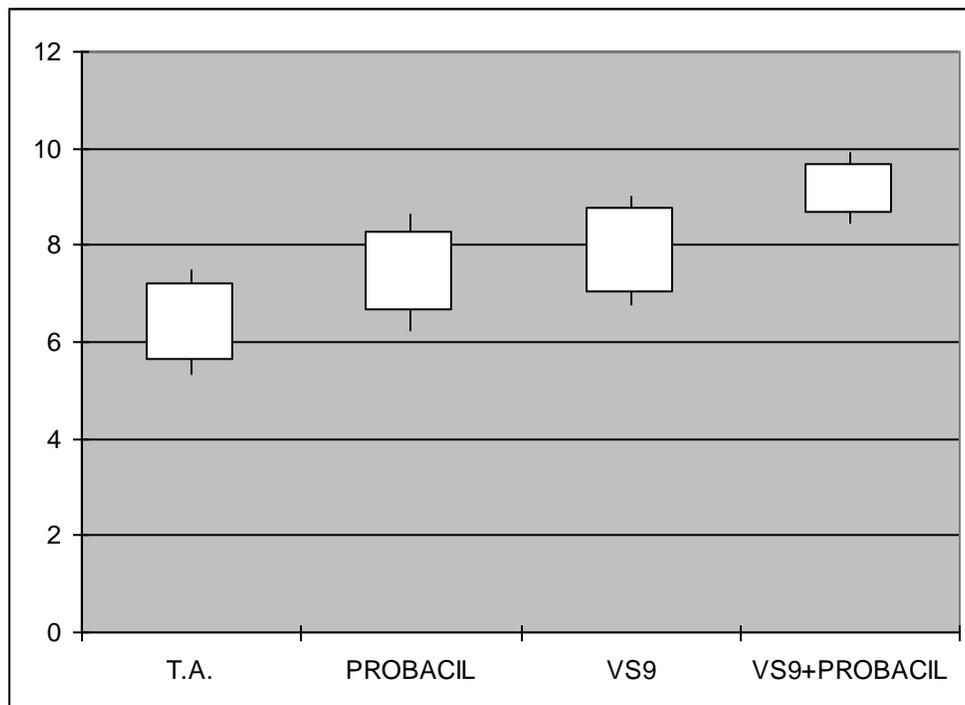


Figura 4. Diámetro del tallo de la planta a los 52 dds, variedad Idafe.

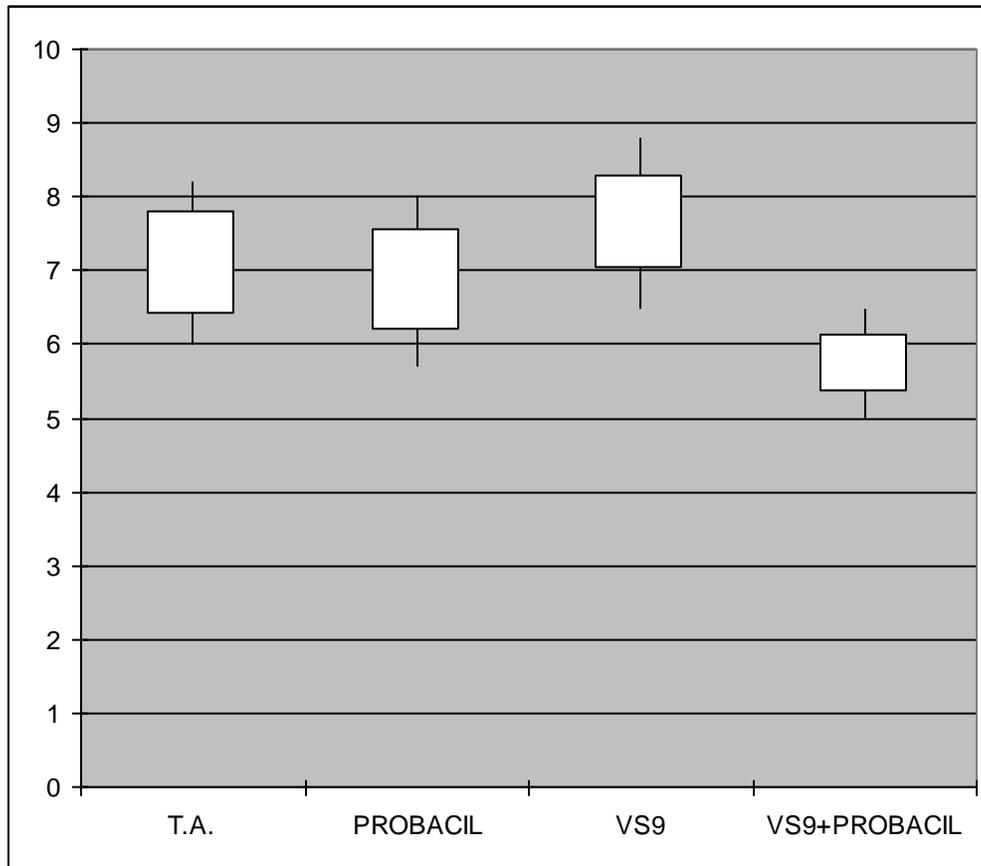


Figura 5. Diámetro del tallo de la planta variedad Pointsett a 51 dds.

Producción y Calidad del fruto

Los resultados obtenidos en cuanto a la producción y calidad del fruto estuvieron muy por debajo de lo esperado, esto se debió a los factores que afectaron al cultivo durante el desarrollo de ambos experimentos. En el experimento 1 la temperatura descendió considerablemente, alcanzando una temperatura de 0° C entre los 96 y 101 dds, lo que repercutió en la disminución del crecimiento de las plantas, así como en la alteración de los frutos que presentaron deformaciones tales como a) curvatura (que va de ligera hasta la formación de un círculo), b) adelgazamiento de la parte superior del fruto y c) ablandamiento (Foto 4) y consecuentemente en la producción, lo que coincide con lo descrito por Vicente (2002), el cual indica que la temperatura óptima para el desarrollo del pepino es de 18 a 25° C, y que temperaturas inferiores a 10° C originan serios problemas fisiológicos y la malformación de los frutos y que a temperaturas inferiores a 1° C las plantas sufren un fuerte marchitamiento de difícil recuperación (citado por Vicente, 2002). Por otro lado se descarta un posible efecto de *Azospirillum* en la deformación de los frutos puesto que existe abundante información en la que se indica que esta bacteria puede emplearse de manera segura en el cultivo de diferentes especies de plantas mono o dicotiledóneas (Bashan *et al.*, 1995). Estos problemas se manifestaron de manera particular durante el 4° corte en el que a pesar de que la cantidad de pepinos cosechados fue más alta,

estos fueron curvos y de bajo peso y por tanto no aptos para ser comercializados, por lo que fueron eliminados y se consideró este corte como de limpieza. En tanto que en el experimento 2, el cultivo resultó severamente afectado por las plagas en particular por la araña roja, así como por hongos, por lo que fue necesario aplicar diversos agroquímicos (Cuadro 5). A pesar de estas dificultades y considerando que todos los tratamientos estuvieron sujetos a los mismos factores adversos, se procedió a evaluar las variables establecidas.



Figura 4. Efecto del frío en el desarrollo del fruto del pepino Langley e Idate.

4.6. Producción de frutos

Experimento 1.

En las figuras 6 y 7 se observa que la cantidad de frutos cosechados en la mayoría de los casos fue superior durante el 4° corte, sin embargo estos fueron desechados debido a que eran de mala calidad. En los cuadros 9 y 10 se registran los datos de producción, en la variedad Langley se observa que la cepa VS9 incrementó la producción del fruto en un 95 % con respecto al testigo, en tanto que el Probacil tuvo un efecto negativo, por lo que el incremento de 73 % en el tratamiento VS9 y Probacil se atribuye a la cepa VS9. En la variedad Idate todos los tratamientos inoculados tuvieron una influencia positiva, la producción fue superior respecto al testigo, en este caso los tratamientos que estimularon una mayor producción fueron: la combinación de VS9 con Probacil y el Probacil solo, pero los frutos no fueron de buena calidad.

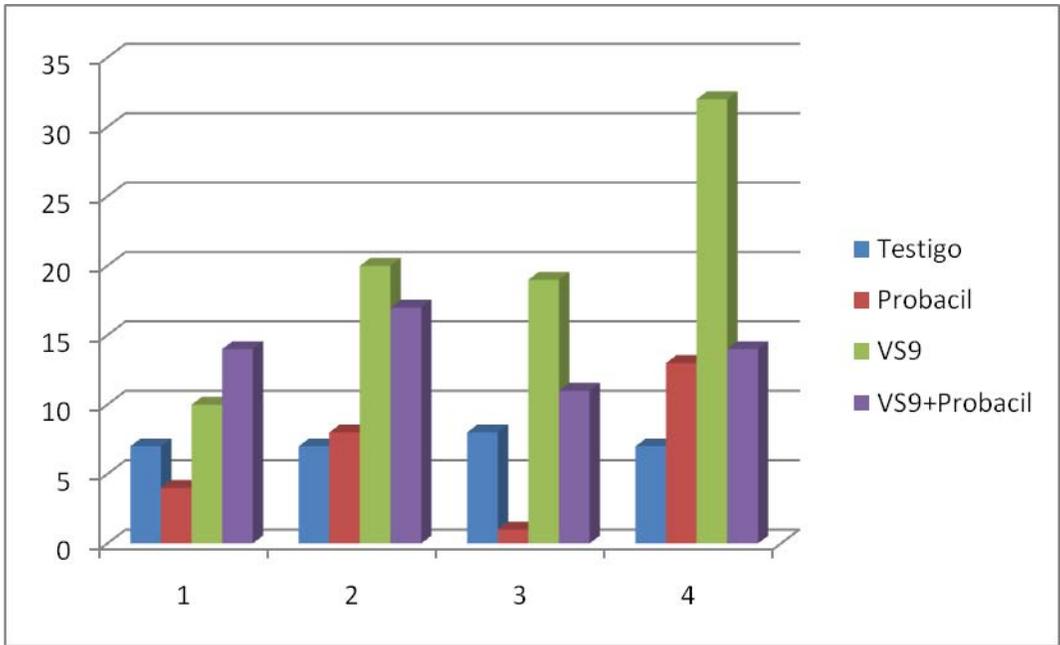


Figura 6. Número de frutos recolectados por cada corte, variedad Langley.

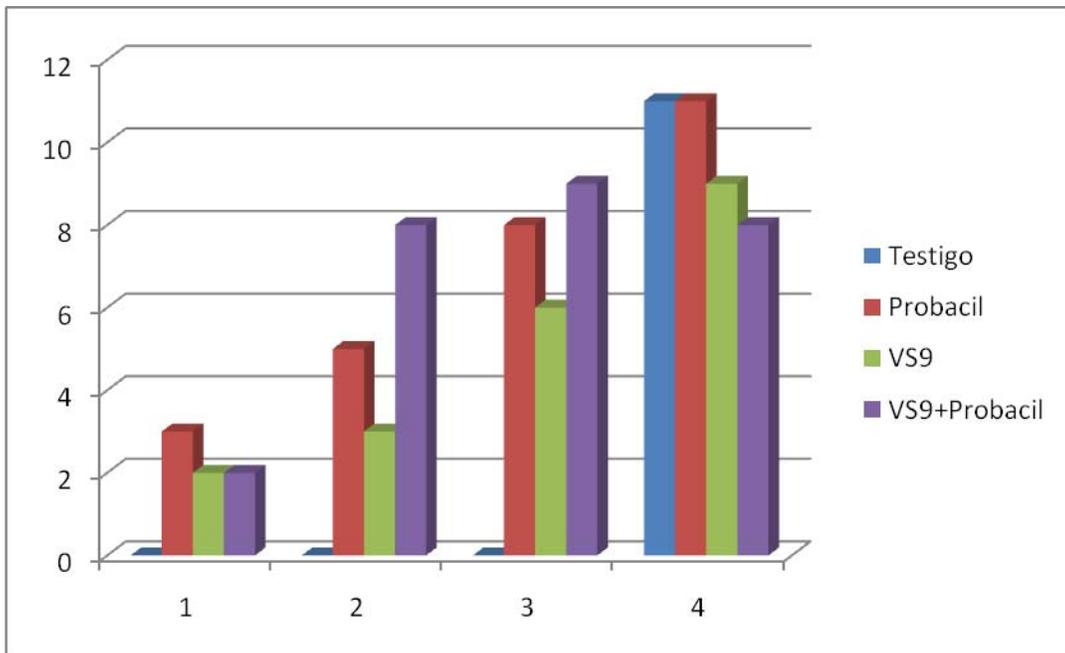


Figura 7. Número de frutos recolectados por corte en la variedad Idefe.

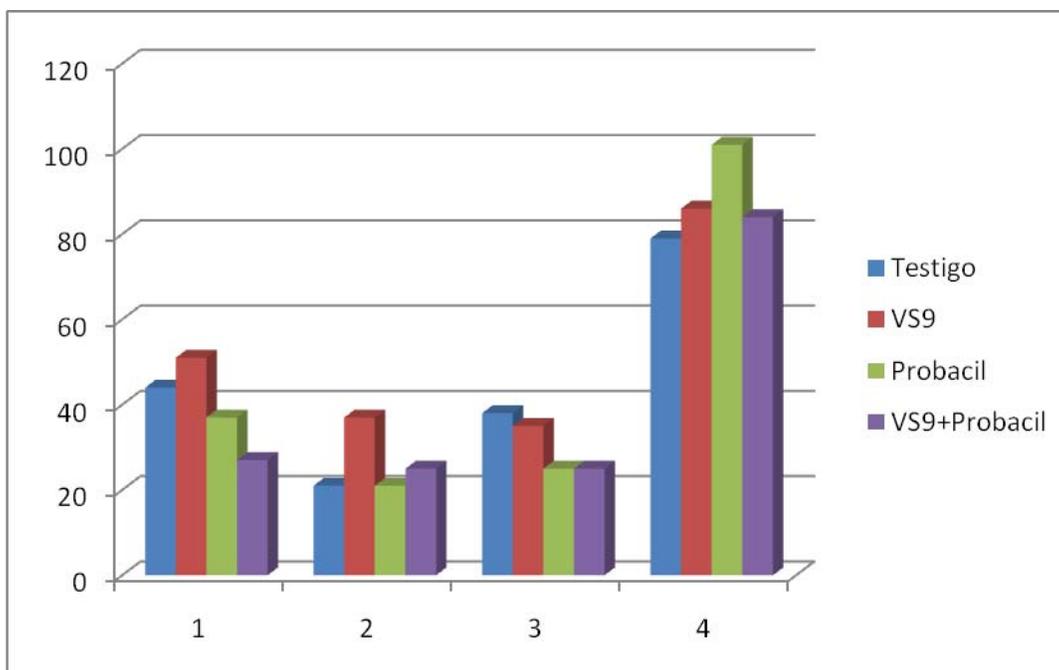


Figura 8. Número de frutos cosechados por corte en la variedad Pointsett.

Cuadro 9. Producción de fruto de la variedad Langley.

Tratamiento	Producción (Kg) de los cortes 1, 2, 3 y 5	Aumento de la producción con respecto al testigo (%)
VS9	14.64	95
VS9+Probacil	12.96	73
Testigo	7.49	
Probacil	6.72	-11*

*Valor por debajo de la producción del testigo.

Cuadro 10. Producción de fruto de la variedad Idefe.

Tratamiento	Producción (Kg) de los cortes 1, 2, 3 y 5	Aumento de la producción con respecto al testigo (%)
VS9+Probacil	5.82	268
Probacil	4.28	170
VS9	3.83	142
Testigo	1.58	

Experimento 2

En la variedad Pointsett la mayor cantidad de frutos se registró en el 4° corte (Figura 8). Respecto a producción se tiene que los mejores tratamientos corresponden a VS9 y a la mezcla de VS9 con Probacil y nuevamente el Probacil tuvo un efecto detrimental (Cuadro 11).

Al relacionar los resultados del diámetro del tallo con la producción de los frutos y la calidad de los mismos, se observa que en las variedades Langley y Pointsett los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento VS9 en tanto que en la variedad Idefe el mejor tratamiento corresponde a la mezcla de VS9 con Probacil. Esto se atribuye a que la cepa VS9 presenta mayor compatibilidad con dos de las variedades empleadas, lo que permitió mayor absorción de nutrimentos y un mejor desarrollo de la planta de pepino, coincidiendo con lo mencionado por Díaz *et al* (2001).

Cuadro 11. Producción de fruto de la variedad Pointsett.

Tratamiento	Producción de los cortes 1, 2, 3 y 4 (Kg)	Aumento de la producción con respecto al testigo (%)
VS9	52.08	11
VS9+Probacil	50.91	8
Testigo	46.86	
Probacil	41.87	-11

Un aspecto que resultó de interés es que las plantas inoculadas con Probacil fueron menos afectadas por los hongos que dañaron el cultivo, lo que probablemente se debió al control biológico ejercido por *Bacillus subtilis*, pero deben efectuarse mas experimentos para comprobar este supuesto.

4.7. Calidad del fruto.

En cada corte después de contar y pesar los frutos y con base en las características que éstos presentaban en longitud y peso, se procedió a separarlos en dos lotes que corresponden a pepinos comerciales y pepinos no comerciales (Cuadros 12-14).

No hubo diferencias estadísticamente significativas, en el cuadro 12 es posible apreciar que en la variedad Langley, la mayor cantidad de frutos comerciales corresponde al tratamiento VS9+Probacil con un 70 %, contra el 60 % obtenido en el testigo, en tanto que el tratamiento Probacil dió lugar al porcentaje más bajo en esta variable con sólo un 27 % de frutos comerciales. Los frutos que presentaron mayor peso corresponden a VS9.

En el cuadro 13 se observa que en la variedad Idefe el tratamiento que provocó el mejor efecto en la producción de frutos fue la combinación del biofertilizante con Probacil con un 70 % aproximadamente, contra el 59 % obtenido en el testigo. Nuevamente el tratamiento Probacil dio lugar al porcentaje más bajo en esta variable con un 27 % de frutos

comerciales. Que tuvieron un peso que fluctuó entre 200 y 399 g considerados como de calidad media y buena respectivamente y de acuerdo a los criterios comerciales, mientras que en ninguno de los tratamientos se registraron frutos de calidad excelente (peso mayor a 400 g).

Cuadro 12. Frecuencia relativa porcentual de frutos comerciales, variedad Langley.

Tratamiento	Frecuencia de frutos no comerciales	Frecuencia relativa de frutos comerciales por su peso (%)		
		200-299 g	300-399	> 400 g
Probacil	73	23	4	0
VS9	43	36	16	5
Testigo	40	46	14	0
VS9+Probacil	29	52	17	2

En el 2° experimento, la cantidad de frutos comerciales fluctuó entre 90 % (Probacil) y 86 % (VS9) (Cuadro 14); en este caso, en todos los tratamientos se obtuvieron frutos de calidad media, buena y excelente.

Cuadro 13. Frecuencia relativa porcentual de frutos comerciales, variedad Idate.

Tratamiento	Frecuencia de frutos no comerciales	Frecuencia relativa de frutos comerciales por su peso (%)		
		200-299 g	300-399 g	> 400 g
Testigo	82	18	0	0
Probacil	56	22	22	0
VS9	50	46	4	0
VS9+Probacil	42	45	13	0

Existen numerosos reportes que demuestran el efecto benéfico de las PGPR bajo condiciones controladas, no obstante el comportamiento de estas al ser inoculadas en un ambiente natural resulta impredecible y frecuentemente decepcionante, puesto que las propiedades benéficas de las PGPR en general y *Azospirillum* en particular, no siempre se expresan (Bashan, 1999; Glick, 1995; Glick et al., 2001). Es importante señalar que el suelo empleado fue ricamente fertilizado y tratado con agroquímicos; en este sentido la literatura indica que el efecto de *Azospirillum* es más evidente cuando se emplea en suelos pobres en nutrientes, en tanto que en suelos ricos en materia orgánica el efecto es menor e incluso nulo (Bashan, 2000 y Glick *et al.*, 1999). En estas condiciones la fijación de nitrógeno por *Azospirillum* prácticamente no contribuye al desarrollo vegetal, ya que es un proceso con alto costo energético, este no se lleva a cabo cuando existe nitrógeno combinado en el suelo (Glick *et al.*, 1999 y Baca *et al.*, 2000). Con respecto a los biocidas, hay que señalar que el efecto tóxico de estos no sólo afecta a los parásitos, sino también a

la microbiota del suelo y los organismos inoculados (biofertilizante o agente de control biológico (Bashan, 1999). Por todas las variables que determinan la sobrevivencia de las bacterias introducidas a la rizósfera, los efectos positivos de las PGPR sobre el desarrollo de las plantas cultivadas en condiciones naturales aún no puede asegurarse y requiere de más investigación (Glick *et al.*, 1999)

Cuadro 14. Frecuencia relativa porcentual de frutos comerciales, variedad Pointsett.

Tratamiento	Frecuencia de frutos no comerciales	Frecuencia relativa de frutos comerciales por su peso (%)		
		200-299 g	300-399 g	> 400 g
Testigo	15	18	52	15
VS9	14	21	45	20
VS9+Probacil	11	22	52	15
Probacil	10	22	57	11

A continuación se muestran las variaciones que presentaron los frutos en los diferentes cortes realizados. En la variedad Langley, el tratamiento con Probacil corresponde al que tuvo mayor variación en la longitud, diámetro y peso del fruto a lo largo de la cosecha; la producción de este tratamiento terminó en el cuarto corte, en el cual se registraron los valores más bajos en la calidad del fruto. En los otros tratamientos, la longitud y diámetro permanecieron más o menos constantes, en cambio el peso disminuyó considerablemente en el 4° corte, tiempo en el que se registró la menor temperatura (Figuras 9 a 11). En la variedad Idafe en el testigo se registró producción sólo en los cortes 4 y 5 por lo que la producción fue mínima y los frutos eran pequeños y de bajo peso. Respecto a las características del fruto evaluadas, la mayor diferencia se observó en el tratamiento de Probacil, en el que la calidad del fruto decreció con el tiempo, la producción fue poca y se terminó en el cuarto corte (Figuras 12 a 14). En la variedad Pointsett la longitud y diámetro permanecieron casi constantes durante los cuatro primeros cortes, registrándose un ligero incremento en ambas variables del primer al cuarto corte (Figuras 15 y 16). El peso presentó un incremento notable entre cortes sucesivos; de 200 g aumentó a más de 300 g alcanzando el máximo valor en el tercer corte que corresponde a 350 g (Figura 17).

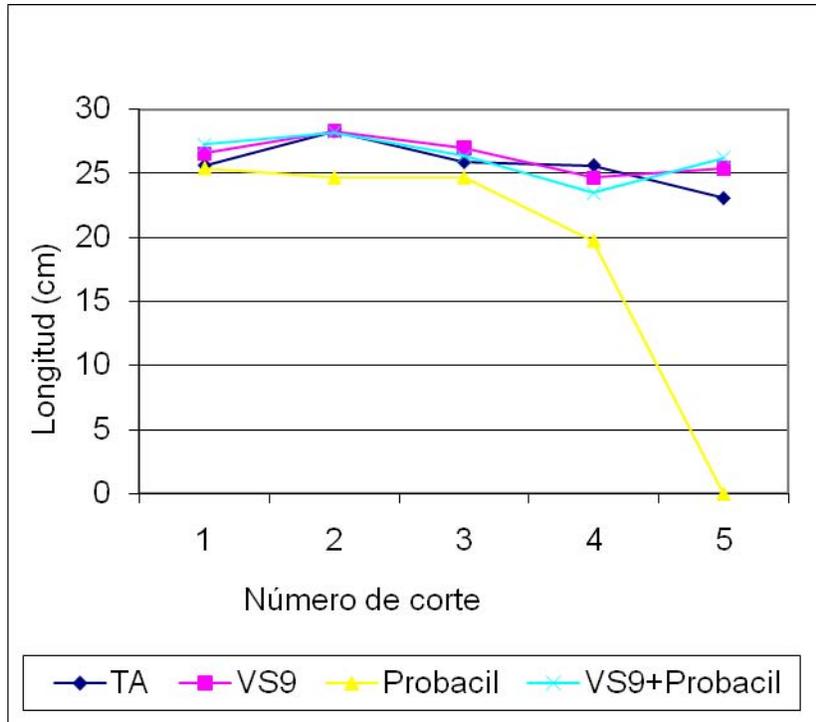


Figura 9. Longitud promedio del fruto en cada uno de los cortes (n=20) en la variedad Langley.

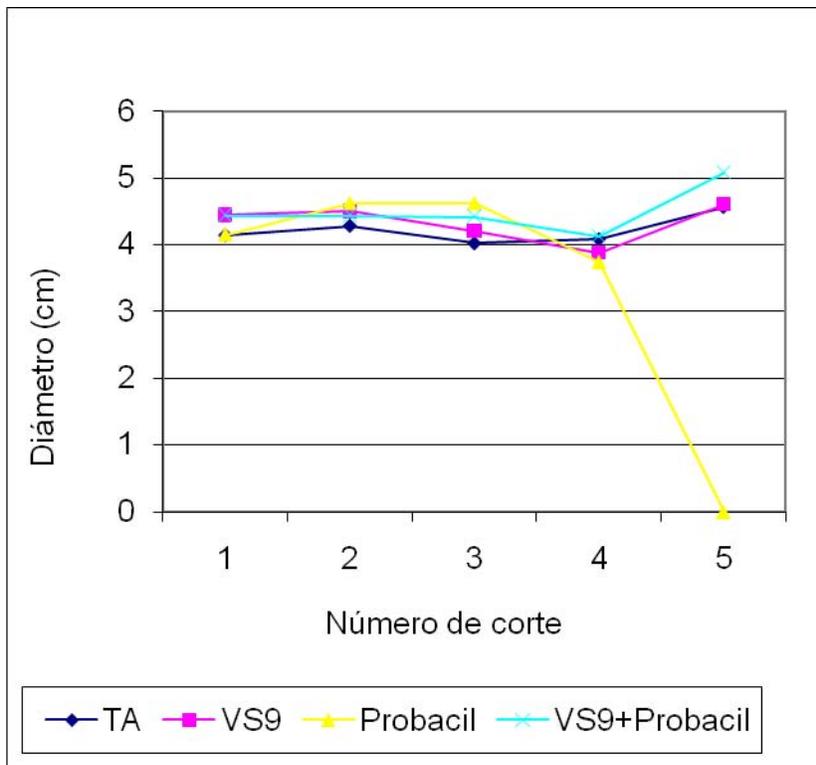


Figura 10. Diámetro promedio del fruto en cada uno de los cortes (n=20) en la variedad Langley.

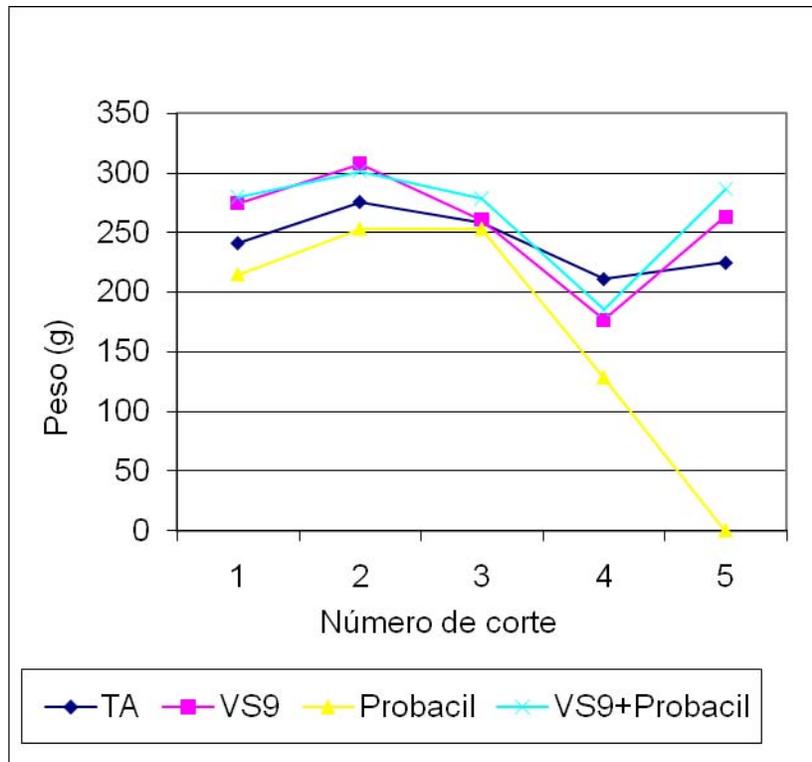


Figura 11. Peso promedio del fruto en cada uno de los cortes (n=20) en la variedad Langley.

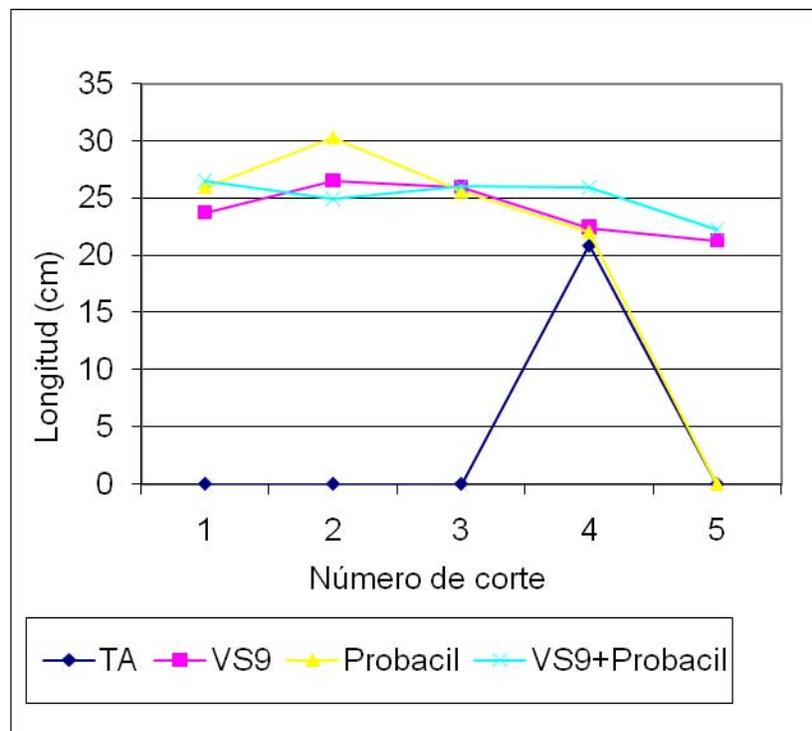


Figura 12. Longitud promedio del fruto en cada uno de los cortes (n=20) en la variedad Idafe.

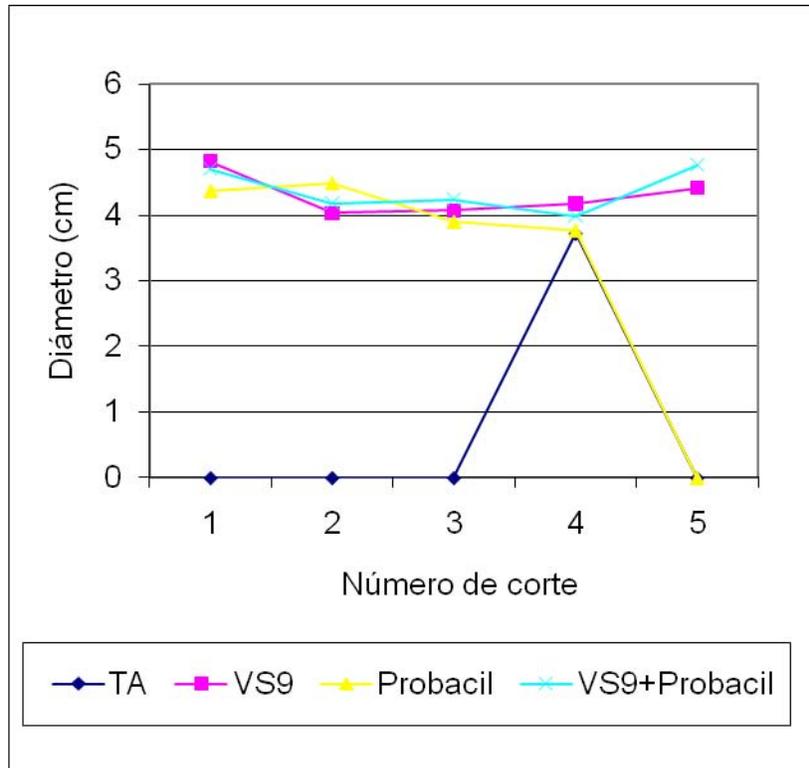


Figura 13. Diámetro promedio del fruto en cada uno de los cortes (n=20) en la variedad Idafe.

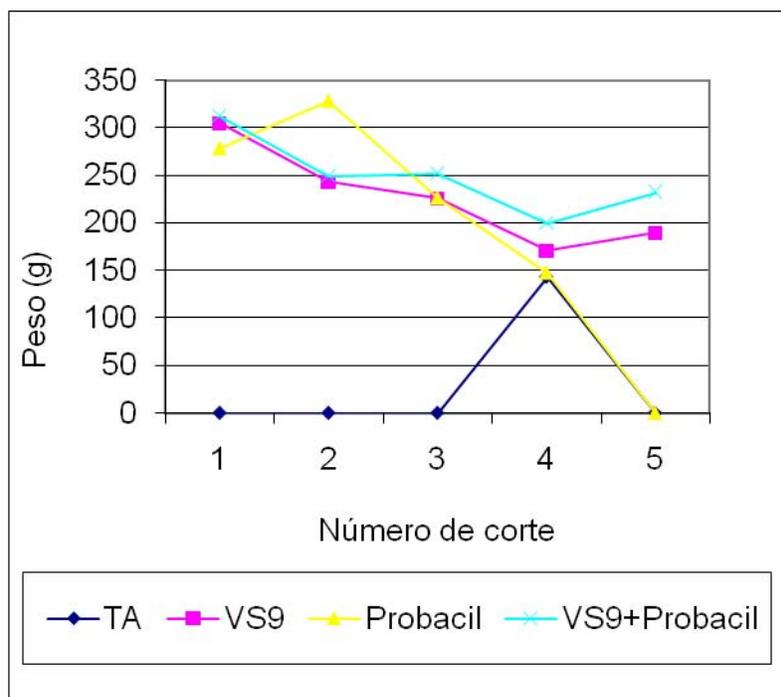


Figura 14. Peso promedio del fruto en cada uno de los cortes (n=20) en la variedad Idafe.

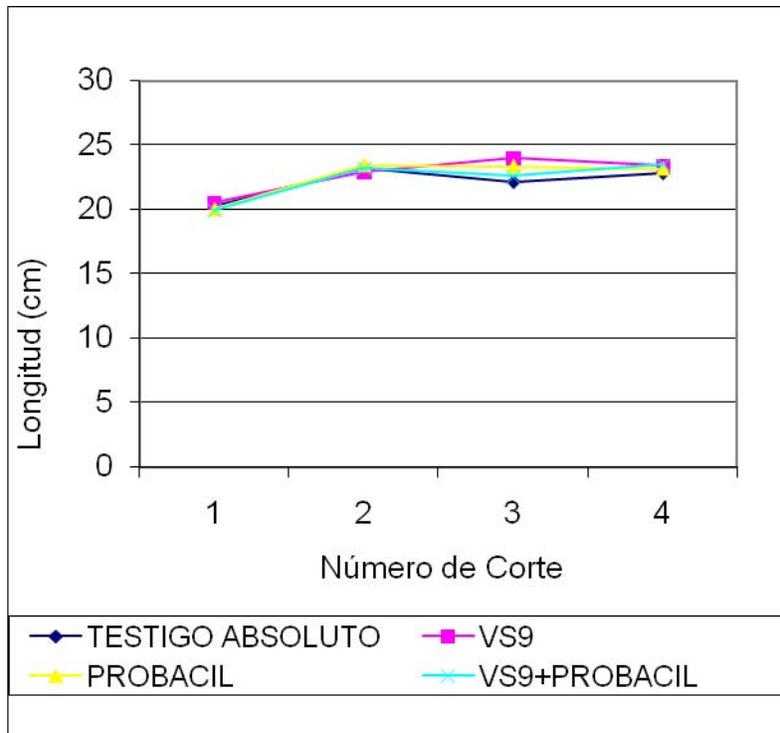


Figura 15. Longitud promedio del fruto en cada uno de los cortes (n=20) en la variedad Pointsett.

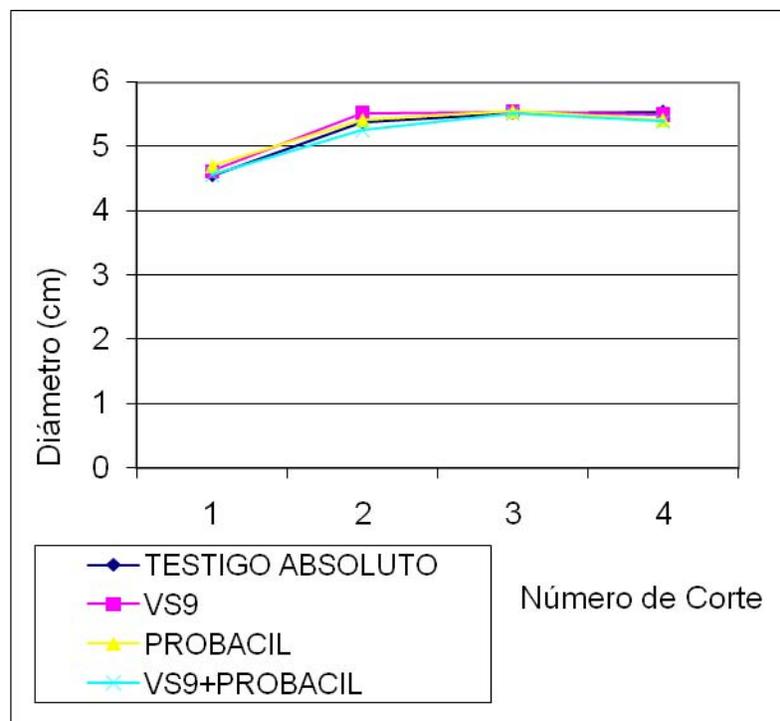


Figura 16. Diámetro promedio del fruto en cada uno de los cortes (n=20) en la variedad Pointsett.

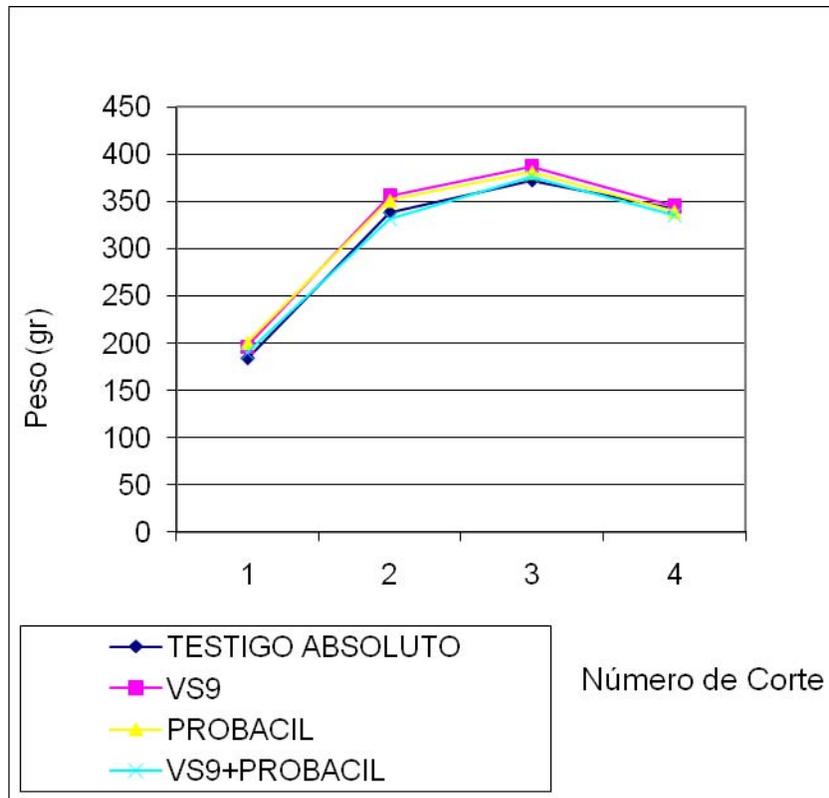


Figura 17. Peso promedio del fruto en cada uno de los cortes (n=20) en la variedad Pointsett.

5. CONCLUSIONES

1. El patrón de colonización por *Azospirillum*, en las raíces del pepino, está determinado por el área superficial existente, mayor en la parte proximal y menor en la distal.
2. La cepa VS9 de *Azospirillum* mostró una afinidad diferencial por las distintas variedades de pepino, en las variedades Langley y Pointsett originó el incremento la producción del fruto, para Langley en un 95% y para Pointsett en un 11%.
3. La acción benéfica de *Azospirillum* tiene poco o nulo efecto significativo sobre el crecimiento del pepino variedades Langley, Idate y Pointsett, cuando éstas son cultivadas en suelos ricamente fertilizados.
4. En el presente estudio la concentración del agente biológico *Bacillus subtilis* contenido en "Probacil" fue inferior a la señalada en la etiqueta.
5. *Bacillus subtilis* no produjo efecto positivo sobre el crecimiento y la producción del pepino variedades Langley, Idate y Pointsett.
6. La acción combinada del biofertilizante y del agente de control biológico no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento y la producción del pepino variedades Langley, Idate y Pointsett.

6. RECOMENDACIONES

- 1.- Reevaluar el efecto de la cepa VS9 de *Azospirillum* interactuando con Probacil en el desarrollo de pepino cultivado en hidroponía a fin de quitar las variables edáficas.
- 2.- Evaluar el efecto de otras cepas de *Azospirillum* en la producción del pepino variedades Langley, Idate y Pointsett, bajo condiciones controladas a fin de seleccionar las asociaciones óptimas de *Azospirillum*-variedades de pepino.
- 3.- Bajo condiciones de invernadero evaluar el efecto de las asociaciones seleccionadas y compararlo con respecto al tratamiento fertilizado y sin fertilizar.
- 4.- Evaluar la compatibilidad entre *Azospirillum* y agroquímicos de uso cotidiano en las prácticas agrícolas, para que puedan emplearse conjuntamente en condiciones de invernadero o de campo.
- 5.- Realizar otros estudios en invernadero a fin de confirmar el efecto de Probacil en el control de hongos fitopatógenos del pepino.

7. LITERATURA CITADA

1. Alexander, M. 1977. **Introduction to Soil Microbiology**. John Wiley and Sons, Inc., New York. 467 p.
2. Asaka, O. y Shoda, M. 1996. **Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14**. Applied and Environmental Microbiology. Nov. Vol. 62 Número 11. 4081-4085.
3. Assmus, B., Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, R., Lawrence, J., y Hartmann, A. 1995. **In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy**. Applied and Environmental Microbiology. 61 (3): 1013-1019.
4. Baca, B. Soto, L. y Pardo, M. 2000. **Fijación Biológica de Nitrógeno**. Elementos. 38: 43-49.
5. Barea, J. 1998. **Biología de la rizosfera**. Investigación y Ciencia. 256: 74-81.
6. Bashan, Y. 1986. **Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil**. J. Gen. Microbiol. 132:3407-3414.
7. Bashan, Y. 1994. **Root-to-Root travel to the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense***. Applied and Environmental Microbiology. 60 (6): 2120-2131.
8. Bashan, Y. 1999. **Interactions of *Azospirillum* sp. in soil: a review**. Biol. Fertil Soils. 29: 246-256.
9. Bashan, Y. 2000. **Environmental applications for *Azospirillum* sp.** In: Proceedings of the 5th International plant growth promoting rhizobacteria conference, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 29 octubre-3 noviembre, 2000. 80 p.
10. Bashan, Y. y Dubrovsky, J. 1996. ***Azospirillum* spp. Participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level**. Biol. Fertil. Soils 23: 435-440.
11. Bashan, Y., y H. Levanony. 1990. **Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture**. Can. J. Microbiol. 36:591-608.
12. Bashan, Y. y Holguin, G. 1993. **Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots**. Journal of General Microbiology 139:379-385.

13. Bashan, Y., y L. de Bashan. 2002. **Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. Tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*.** Applied and Environmental Microbiology. 68 (6): 2637-2643.
14. Bashan, Y., y Levanony, H. 1988. **Adsorption of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to soil sand and peat particles.** J. Gen. Microbiol. 134:1811-1820.
15. Bashan, Y., Levanony, H. y Whitmoyer, R.E. 1991. **Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd.** Journal of General Microbiology. 137: 187-196.
16. Bashan, Y., Puente, M., Rodríguez, M. Toledo, G., Holguín, G. Ferrera, R. and Pedrín, S. 1995. **Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types.** Applied and Environmental Microbiology. 61 (5): 1938-1945.
17. Cook, J. y Baker, K. 1983. **The nature and practice of biological control of plant pathogens.** Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. APS Press. 539 p.
18. De Freitas, J. y Germida, J. 1992. **Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonads under field conditions.** Soil biology. 24:1137-1146.
19. Díaz, P., Ferrera, R., Almaraz, J. y Alcántar, G. 2001. **Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga.** Terra 19: 327-335.
20. Döbereiner J.; Day, J.M. 1976. **Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites.** In: Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation, Ed. Newton, W. y Nyman. vol. 2. Pullman, WA: Washington State University Press 518-538 p.
21. Dowling, D. y O’Gara, F. 1994. Genetic manipulation of ecologically adapted *Pseudomonas* strains for PCB degradation, Current Topics in Molecular Genetics. 2:1-8.
22. El-Khawas H. y Adachi, K. 1999. **Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots.** Biol. Fertil. Soils 28: 377-381.
23. El-Shatnawi, M. y Makhadmeh, I. 2001. **Ecophysiology of the Plant-Rhizosphere System.** Agronomy & Crop Science 187: 1-9.
24. Esquivel, R. 2002. **Selección e identificación de rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal aisladas de cultivos regados con aguas residuales y su efecto sobre el desarrollo del jitomate (*Lycopersicon esculentum*).** Tesis de Maestría en Ciencias (Edafología). UNAM. Fac. Ciencias México, D.F. 154 p.

25. Fanning, D. 1989. **Soil morphology, genesis and classification**. Ed. Wiley, New York. 416 p.
26. FAO- UNESCO e INNFA. 2002. **Manual práctico de manejo integrado de plagas y enfermedades en cultivos hidropónicos en invernadero**. Roma.
27. Fassbender, W.; Bornemisza, E. 1987 **Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina**. 2ª Ed. rev. IICA, San José, Costa Rica. 420 p.
28. Ferrera-Cerrato, R. 1995. **Agricultura en México** In Primera reunión Internacional de Ecología Microbiana. Programas y resúmenes I.P.N. 8-12 de mayo. México, Distrito Federal. 43 p.
29. Foth, H. 1990. **Fundamental of soil science**. Wiley and Sons. New York. 384 p.
30. Glick, B.R., 1995. **The enhanced of plant growth by free-living bacteria**. Can. J. Microbiol. 41: 109-117.
31. Glick, B., Patten, C., Holguin, G. y Penrose, D. 1999. **Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria**. Imperial College Press. Londres, Inglaterra. 280 p.
32. Glick, B., Penrose, D. and Wenbo, M. 2001. **Bacterial promotion of plant growth**. Biotechnology Advances 19: 135-138.
33. Govindajaran, K., Purushothaman, D. 1989. **Cation Exchange capacity of soil and adsorption of *Azospirillum* to soil particles**. Curr Sci 58:983-984.
34. Guenkov, G. 1989. **Fundamentos de la horticultura cubana**. Edit. Inst. Cubano del Libro. La Habana, Cuba. 355 p.
35. Hall, P. y Krieg, N. 1983. **Swarming of *Azospirillum brasilense* on solid media**. Can J. Microbiol. 29:1592-1594.
36. Han, S. y New, P. 1998. **Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum***. Microbial Ecology 36: 193-201.
37. Hartmann, A., Assmus, B., Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, R., Lawrence, J. 1995. **In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy**. Applied and environmental microbiology, 61 (3): 1013-119.
38. Holt, J., Krieg N.; Sneath .P.; Stanley J., Williams S. 1994. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9a. Ed. The Williams and Wilkins C. Baltimore Maryland USA 787 p.

39. Honorato, R. 2000. **Manual de edafología**. Alfaomega Grupo Editor, S.A. de C.V. México. 267 p.
40. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 1979. **Carta edafológica ciudad de México. E 14-A-39**. Escala 1: 50 000 Km. México.
41. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 1983. **Carta geológica ciudad de México. E 14-2**. Escala 1: 250 000 Km. México.
42. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2002. **Xochimilco, Distrito Federal. Cuaderno estadístico delegacional**. Edición 2002. México, D.F. Páginas totales
43. Jiménez, R. 1996. **Aislamiento, selección e identificación de rizobacterias antagónicas contra *Rhizoctonia solani* y cuantificación de su actividad antagónica**. Tesis de Licenciatura (Químico Bacteriólogo Parasitólogo). IPN. ENCB. México. 56 p.
44. Jiménez, R., Virgen, G., Tabares, S., Olalde, V. 2001. **Bacterias promotoras del crecimiento de plantas**. Agro-biotecnología. Avance y Perspectiva 20: 395-400.
45. Jiménez, I. 2004. **Evaluación de la concentración de metales pesados en suelo y hortalizas de la zona chinampera de Xochimilco, D.F.** Tesis de Licenciatura. UNAM. FES Zaragoza. México, D.F. 104 p.
46. Kloepper, J. y Schroth, M. 1978. **Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes**. Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria. Anger, Francia. 2:879-882.
47. Kloepper, J., Zablotowicz, R. Tipping, E. y Lifshitz, R. 1992. **Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers**. Beltsville symposia in Agriculture Research 14: 315-326.
48. Langer, R. y Hill, G. 1992. **Agricultural plants**. Cambridge University Press. London. 386 p.
49. Lin, W., Okon, Y., Hardy, R. 1983. **Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense***. Appl Environ Microbiol 45:1775-1779.
50. Maroto, J. 1995. **Horticultura herbácea especial**. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 611 p.
51. Okon Y, Kapulnik Y. 1986 **Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots**. Plant Soil 90: 3-16.
52. Okon, Y. y Vanderleyden, J. 1997. **Root associated *Azospirillum* species can stimulate plants** ASM news. 63: 336-30.

53. Olalde, V. y Aguilera, L. 1998. **Microorganismos y Biodiversidad**. Terra 16 (3): 289-292.
54. Parson, D. 1992. **Manuales para la educación agropecuaria. Cucurbitáceas**. 2º Edición. SEP. Trillas. México. 54 p.
55. Puente, M.-E. and Bashan, Y. 1993. **Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*)**. Symbiosis 15: 49-60.
56. Ramírez, R., Tsuzuki, M., Urzúa, M. y Esquivel, R. 2002. **Rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal y su importancia en la biofertilización**. Memorias del XX Curso Diplomado Internacional de Edafología. En: Calderón G N. “Los retos de la edafología en el entorno de las megalópolis” (Versión C.D., Facultad de Ciencias).
57. Roberts, D., Kobayashi, D., Dery, P., Short, N. 1999. **An image analysis method for determination of spatial colonization patterns of bacteria in plant rhizosphere**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 653-658.
58. Rodríguez-Cáceres, E. 1982. **Improved medium for isolation of *Azospirillum spp.*** Appl. Environ. Microbiol. 4:990-991.
59. Rojas, D. 2002. **Uso de *Bacillus subtilis* como biocontrolador en contra de *Phytophthora infestans***. Tesis de Licenciatura. Q.B.P. IPN. ENCB. México, D.F. Páginas totales
60. Rosales, P. 1996. **Tópicos selectos de la producción agrícola actual. Elementos de fenología del pepino (*Cucumis sativus* L.) en Apatzingan, Michoacán**. Tesis de Licenciatura. UNAM. FES. Cuautitlán. México, D.F. 52 p.
61. Salinas, U. 2002. **Evaluación de la salinización y sodificación de los suelos de la zona lacustre de San Gregorio. Xochimilco, D.F.** Tesis de Maestría en Ciencias (Edafología). UNAM. Fac. Ciencias. México, D.F. 126 p.
62. Sánchez, C. 2000. **Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum* y colonización con micorrizas arbusculares *in situ*, en un andisol encalado del Estado de México**, Tesis de Maestría en Ciencias (Biología). UNAM, Fac. de Ciencias México, D.F. 112 p.
63. Sobrino, E. 1992. **Tratado de horticultura herbácea. I Hortalizas de flor y de fruto**. Edit. Adeos, S.A. Barcelona. España. 352 p.
64. Stein T. 2005. ***Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions**. *Molecular Microbiology*. 56(4), 845-857.

65. Tarrand, J., Krieg, R. y Döbereiner, J. 1978. **A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description 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.
66. Tate III, R.L. 1995. **Soil microbiology.** John Wiley & Sons, New York, USA. 398 p.
67. Urzúa, C. 2001. **Selección de la concentración óptima de *Azospirillum* y su combinación con diferentes dosis de fertilización en 2 sistemas de cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum* M).** Tesis de Maestría en Ciencias (Edafología). UNAM. Fac. Ciencias. México, D.F. 67 p.
68. Valenzuela, G., 2001. **Manejo integrado de plagas y enfermedades en tomate, chile y papa.** INCAPA. Guadalajara, México. 135 p.
69. Vande, A., Lambrecht M., Vanderleyden, J. 1998. **Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*.** Microbiology 144: 2599-2606.
70. Vázquez, A., Bautista, N. 1993. **Guía para interpretar el análisis químico de agua y suelo.** Universidad Autónoma de Chapingo. México. 29 p.
71. Velasco, M. 1983. **Uso y manejo del suelo.** Ed. Limusa. México. 191 p.
72. Vicente, E., 2002. **Evaluación de transplantes en pepino europeo (*Cucumis sativus* L.) en hidroponía bajo invernadero.** Universidad Autónoma de Chapingo. Tesis de Licenciatura. México. Chapingo. 60 p.
73. Weier, E. 1983. **Botánica.** Edit. Limusa. México. 741 p.
74. Weller, D. 1988. **Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria.** Annu. Rev. Phytopathol. 26:379-407
75. Whipps, J. 2001. **Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere.** Journal of Experimental Botany. 52: 487-511.
76. Wild, A. 1992. **Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell.** Ediciones Mundi Prensa, Madrid. 1045 p.

8. ANEXOS

ANEXO I

MEDIOS DE CULTIVO

I. Para bacterias del género *Azospirillum*

a) Nfb semisólido modificado (Tarrand et al, 1978)

Formulación	1000 mL
Ácido Succínico	10g
K ₂ HPO ₄ (10%)	10mL
MgSO ₄ 7H ₂ O (4%)	10mL
NaCl (2%)	10mL
CaCl ₂ (1%)	4m L
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.002g
Fe EDTA (1.64%)	4mL
Azul de bromotimol (0.5%)	4 mL
Biotina (0.01%)	2mL
Agar-Agar	1.8g
pH	7.0

b) Malato Sales semisólido modificado (Tarrand et al, 1978)

Formulación	1000 mL
Ácido Málico	10g
K ₂ HPO ₄ (10%)	10mL
MgSO ₄ 7H ₂ O (4%)	10mL
NaCl (2%)	10mL
CaCl (1%)	4m L
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.002g
Fe EDTA (1.64%)	4mL
Biotina (0.01%)	2mL
NH ₄ Cl	1g
pH	7.0

c) Medio BMS (Tarrand *et al.*, 1978)
(Agar papa dextrosa modificada)

Formulación	1000 mL
Papa lavada y pelada	200g
Ácido Málico	2.5g
Potasa	2.0g
Azúcar comercial	2.5g
Biotina (0.01%)	1.0mL
Azul de bromotimol (0.5%)	2 gotas
Agar-Agar	15g
pH	7

Preparación:

1. Cortar la papa en trozos pequeños y colocar en una bolsa de gasa. Utilizar la papa pelada.
2. Hervir por 30 min. Filtrar con algodón.
3. Se disuelve el ácido málico en 50 mL de agua destilada y se agrega el indicador.
4. Agregar potasa hasta obtener una coloración verde (verde esmeralda).
5. Se agrega la papa hervida en la mezcla del ácido málico, agregar el azúcar y la biotina.
6. Ajustar el volumen.
7. Agregar el agar, fundir y esterilizar bajo condiciones estándar.

II. **Para bacterias del género *Bacillus***

a) Agar Nutritivo (Gelosa)

Formulación 1000 mL

Peptona de Gelatina	5.0g
Extracto de Carne	3.0g
Agar Bacteriológico	15.0g
pH	6.8 ± 0.2

Del medio de cultivo estándar, comercial ya preparado se toman 23 g y se suspenden en un litro de agua purificada, dejar reposar por 15 min. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante uno o dos minutos. Esterilizar a 121 °C por 15 min.

ANEXO 2

ANALISIS DE SUELO

I. DETERMINACION DE LA TEXTURA (Método del Hidrómetro de Bouyoucos)

- 1) Pesar 60 g de suelo tamizado.
- 2) Añadir 20 mL de H₂O₂ al 8 %, mezclar.
- 3) Secar en placa caliente o baño María.
Repetir esta acción desde el paso 2
- 4) Tomar 50 g de esta muestra seca, colocarlos en un vaso de batidora Oster para textura, a fin de dispersar el suelo.
 - a) Añadir H₂O (3/4 del contenido) hasta la segunda ranura del vaso.
 - b) Añadir 5mL de oxalato de sodio al 5 %.
 - c) Añadir 5 de meta silicato de sodio al 5 %.
- 5) Agitar durante 20 min en la batidora.
- 6) Transferir la mezcla a una probeta de 1000 mL.
 - a) Añadir agua de la llave hasta aforar a 1000 mL.
 - b) Agitar con varilla durante un minuto.
- 7) Reposar durante 40 s y tomar la primera lectura con el hidrómetro de Bouyoucos, este se coloca verticalmente dentro de la muestra, flota y alcanza el equilibrio en ese momento es cuando se realiza la lectura.
- 8) Medir la temperatura ambiente con el termómetro y anotarla.
 - a) Las lecturas se repiten después de 2 hrs.

Cálculos de acuerdo a la Ley de Stockes

Sumar 0.2 a la lectura por cada °C por arriba de 20 °C

Restar 0.2 a la lectura por cada °C por abajo de 20 °C

$$\% \text{ de arcillas + limo} = \frac{1^{\text{a}} \text{ lectura}}{\text{g de suelo}} \times 100$$

$$\% \text{ de arenas} = 100 - \% (\text{limo} + \text{arcillas})$$

$$\% \text{ de arcillas} = \frac{2^{\text{a}} \text{ lectura}}{\text{g de suelo}} \times 100$$

$$\% \text{ de limo} = (\% \text{ limo} + \text{arcillas}) - \% \text{ arcillas}$$

II. CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO TOTAL
(CICT)
(Método volumétrico de EDTA)

- 1) Pesar un gramo de suelo en un tubo de centrifuga.
- 2) Agregar 5 mL de cloruro de calcio (CaCl_2) 1N pH 7 y agitar.
- 3) Centrifugar por 5 min a 3000 rpm. Decantar el sobrenadante.
Repetir el procedimiento 5 veces.
- 4) Agregar 5 mL de alcohol etílico industrial y agitar.
- 5) Centrifugar por 5 min a 3000 rpm. Decantar el sobrenadante.
Repetir el procedimiento 5 veces.
- 6) Agregar 5 mL de NaCl 1N pH 7 y agitar.
- 7) Centrifugar por 5 min a 3000 rpm. El sobrenadante se vacía a matraz aforado de 50 mL.
Realizar el procedimiento 5 veces.
- 8) Titular la solución con EDTA 0.02N como se describe a continuación.

Titulación con EDTA

- 1) Al extracto total agregar 10 mL de buffer pH 10.
- 2) Agregar 5 gotas de Clorhidrato de hidroxilamina.
- 3) Agregar 5 gotas de KCN 2 %.
- 4) Agregar 5 gotas de negro de encromo "T".
- 5) Titular con EDTA 0.02 N (vire a color azul).
- 6) Hacer dos blancos Nr- EDTA con:
 - a) 10 mL CaCl_2 (para valorar el EDTA)
 - b) 10 mL de buffer pH 10
 - c) 5 gotas de clorhidrato-hidroxilamina
 - d) 5 gotas de KCN
 - e) 5 gotas de negro de encromo "T"

Nota: Titular los blancos con EDTA.

$$\text{CICT} = \frac{\text{mL EDTA} \times \text{Nr} \times 100}{\text{g de suelo}}$$

$$\text{Nr} = \frac{10 \times 0.02}{\text{mL EDTA de Blanco}} \quad \frac{\text{Vt} \times \text{Nt}}{\text{mL EDTA de Blanco}}$$

III. DENSIDAD REAL

(Método del picnómetro) (Baver 1956)

1. Pesar 5 g de suelo secado al aire.
2. Pesar el picnómetro vacío con tapa en la balanza analítica.
3. Pesar el picnómetro con el suelo seco.
4. Añadir agua al picnómetro con suelo, llenar 1/3 parte y agitar después adicionar lentamente más agua hasta aforar; no olvidar agitar constantemente para reemplazar el aire, presente en los poros, por el agua. Al colocar la tapa observar que en el capilar no quede ninguna burbuja de aire.
5. Pesar el picnómetro con suelo y con agua.
6. Vaciar y enjuagar el picnómetro, llenarlo con agua destilada y pesarlo.

$$\text{Densidad Real} = \frac{S}{S+A - (s + a)}$$

S = Peso del suelo

A = Peso del agua

s + a = Peso del suelo + agua

Para calcular la Porosidad tenemos la siguiente fórmula:

$$\%P = \left(1 - \frac{DA}{DR}\right) 100$$

ANEXO 3

PEPINO

Cucurbitácea. *Cucumis sativus* L. Herbácea anual, dicotiledónea.

Características

Sistema Radical

Abundante, la raíz principal está ramificada en raíces secundarias y pelos absorbentes superficiales muy finos, alargados y de color blanco (Parson 1992 y Sobrino, 1992). El sistema de raíces está situado a poca profundidad, aproximadamente 40 cm, por lo que su capacidad de extracción no es mucha, esto justifica sus grandes exigencias hídricas (Vicente, 2002).

Tallo principal

Herbáceo, anguloso por los cuatro lados y veloso, de porte rastrero y trepador, sólido cuando joven y hueco al madurar (Parson 1992 y Sobrino, 1992). De cada nudo parte una hoja y un zarcillo sencillo sin ramificación, insertos en lados opuestos; también de cada nudo salen ramas laterales además de las flores (Parson, 1992 y Vicente, 2002).

Hoja

De largo pecíolo, gran limbo acorazonado, con tres lóbulos más o menos pronunciados de color verde oscuro, recubierta de un vello muy fino (Sobrino, 1992), su longitud es de 7 a 20 cm (Parson, 1992). Las células de la epidermis tienen una cutícula delgada que permite una excesiva evaporación de agua (Guenkov, 1989).

Flores

Son unisexuales, de pedúnculo corto y pétalos amarillos; se forman en las axilas de las hojas. Una planta puede ser dioica o monoica (Langer y Hill, 1992 y Sobrino, 1992). Las flores femeninas nacen solitarias y las masculinas salen en grupos formando un corimbo (Rosales, 1996). Actualmente todas las variedades comerciales son plantas monoicas sólo poseen flores femeninas que fructifican por partenogénesis, sin la polinización de flores masculinas (Maroto, 1995).

Fruto

Es una baya o péndulo oblongo de forma variable, de pulpa suave y cáscara dura, áspera o lisa; vira desde un color verde claro, pasando por un verde oscuro hasta alcanzar un color amarillento cuando está totalmente maduro (Parson, 1992 y Weier, 1983)

Requerimientos de cultivo

Temperatura

El pepino crece en climas cálidos, la temperatura óptima para su crecimiento es de 30 ° C durante el día y 18 ° C por la noche (Langer y Hill, 1992), la temperatura mínima para la germinación es de 10 ° C (Guenkov, 1989). Temperaturas inferiores a los 16 ° C ocasionan malformaciones en hojas y frutos; a menos de 10 ° C el crecimiento se detiene y si se

prolonga se originan serios problemas fisiológicos. Cuando la temperatura desciende a 1 °C se produce la helada de la planta provocando la muerte o un fuerte marchitamiento de difícil recuperación (Langer y Hill, 1992 y Pérez, 1984 citado por Vicente, 2002).

Luz

Se desarrolla en condiciones de fotoperiodos cortos y soporta elevadas intensidades luminosas. Cuando los frutos están desprotegidos el exceso de rayos solares les ocasiona quemaduras (Rosales, 1996).

Humedad

Es un cultivo con alto requerimiento de agua, para su desarrollo óptimo la humedad del suelo debe ser de 70 a 80 % y la humedad relativa de entre 80 y 90 % (Guenkov, 1989 y Langer y Hill, 1992). Las fases críticas en cuanto a requerimiento de humedad se dan en el inicio de la floración y del fruto (Rosales, 1996). Es importante señalar también que el exceso de humedad puede facilitar el crecimiento de hongos dañinos para el cultivo (Langer y Hill, 1992).

Suelo

El cultivo se favorece en suelos de textura arenosa a franco arenosa, bien drenados y con un pH entre 6 y 7.5 (Parson, 1992 y Rosales, 1996). El suelo debe drenar bien ya que el pepino no tolera el exceso de agua.

Patógenos

En el cuadro 15 se presentan las enfermedades que afectan a *Cucumis sativus* L.

Cuadro 15 Enfermedades del Pepino *Cucumis sativus*

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	SINTOMAS	CONTROL	OTROS
<i>Alternaria cucumerina</i>	Mancha de hojas	Aparecen manchas circulares color "cuero", hundidas, de unos 3 cm de diámetro este tamaño va en aumento. Estas manchas se forman en las hojas aparecen con estrías o arrugas concéntricas	Eliminar y quemar hojas y tallos de plantas enfermas. Utilizar variedades resistentes. Mancozeb, Maneb, Oxidloruro de cobre o Zineb.	Hongo. Si el ataque es fuerte la planta puede desfoliarse.
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Antracnosis	En hojas, tallos y frutos aparecen manchas irregulares; en las hojas son de color pálido y aspecto húmedo; en los tallos se forman nudosidades gomosas. En el fruto se forman manchas ovales o redondas, parduzcas, hundidas. Al final se forman pequeñas pústulas rojas.	Tratamiento de semillas con productos mercuriales, Mancozeb, Maneb, FerbÁN o Zineb.	Las semillas y los restos vegetales son el mejor medio de transmisión de esta enfermedad. Hongo

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	SINTOMAS	CONTROL	OTROS
<i>Tetranychus urticae</i>	Araña Roja	Se desarrolla en el envés de las hojas, ahí teje una serie de hilos; en el haz causa decoloraciones, punteaduras o manchas amarillentas o pardas que se extiende en toda la hoja, las cuales acaban por secarse. Los ataques más graves se producen en los primeros estados fenológicos.	Desinfección de estructuras y suelo previa a la plantación. Eliminación de malas hierbas y restos de cultivo. Evitar los excesos de nitrógeno. Se recomienda el uso de productos a base de azufre, en horas de la tarde. También es útil mojar las hojas. Fosfamidón, Mevinfos, Metamidofos y Dimetoato.	Artrópodo. Las temperaturas elevadas y la escasa humedad relativa favorecen el desarrollo de la plaga. El tamaño de los adultos no llega a 0.5 mm; es de color amarillo verdosas y más adelante son rojizas.
<i>Botrytis cinerea</i>	Botrytis	Ataca a los tallos, peciolo de las hojas y frutos recién cuajados y en principio de desarrollo; se forman unas manchas húmedas y acuosas color gris que se recubren de una vellosidad grisácea.	Eliminar restos vegetales dentro y fuera del invernadero, sembrar una adecuada densidad de plantas. Ventilación adecuada. Maneb, Zineb, TMTD, Captán o Folpet.	
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Cladosporium	Ataca frutos y tallos, en las hojas aparecen pequeñas manchas angulares o circulares irregulares color parduzco y se recubren de una especie de goma. En frutos jóvenes aparecen manchas acuosas, profundas, en estas manchas se observa una gomosis parduzca.	Uso de variedades resistentes. Maneb, Captán o TMTD.	
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fusariosis	Ataca el cultivo en cualquier estado de desarrollo, si ataca a las plántulas los cotiledones y primeras hojas se caen después de adquirir un color amarillento. En plantas desarrolladas las nerviaciones de las hojas adquieren un color amarillento y los tallos muestran un color pardo y suelen exudar una goma rojiza.	Variedades resistentes y solarización y desinfección del suelo con Cloropicrina, Metilditiocarbato de sodio, TMTD, Quintoceno (PCNB). Evitar excesos de humedad	Hongo. Variedad <i>cucumerinum</i> . Las semillas pueden ser atacadas pudriéndose antes de nacer la plántula.
Nematodos	Agallamiento de la raíz	Pérdida de color en las hojas, achaparramiento y marchitamiento, las plantas muestran una aparente deficiencia de nutrientes. Las raíces de las plantas muestran agallas y nodulaciones, con el tiempo se pudren debido a microorganismos saprofitos.	Remover el suelo con barbechos y rastreros profundos, solarizar el suelo. Uso de variedades resistentes. Bromuro de Metilo, Vidate, Etoprop, Cadusafos.	Gusanos que afectan las raíces de las plantas. Las temperaturas promedio de 27 °C favorecen el desarrollo de estos organismos.

NOMBRE CIETIFICO	NOMBRE COMUN	SINTOMAS	CONTROL	OTRO
<i>Pseudomonas lacrymans</i>	Mancha angular Bacteriosis del pepino	En las hojas se forman manchas húmedas de 2 a 3 mm de diámetro, de forma angular, grises en la parte superior de la hoja y brillante o verde más intenso en el envés, al final estas manchas quedan necróticas y su interior se desprende. En los frutos maduros se forman manchitas pardas que exudan una especie de goma.	Captán, Estreptomicina, Oxitetraciclina, Ziram u Oxícloruro de cobre.	Se propaga por medio de la semilla y por los restos vegetales. La infección se propaga cuando la temperatura esta entre 24 y 27°C. Cuando la temperatura es superior a 30°C la enfermedad aminora.
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Mosca Blanca	Las larvas se agrupan en el envés de la hoja, donde se alimentan. Segregan una sustancia pegajosa "melaza" que da lugar al hongo "negrilla", que dificulta la fisiología de la planta, perjudicando la calidad de los frutos. Las plantas atacadas por esta plaga quedan muy debilitadas y su rendimiento baja considerablemente.	Colocar trampas de plástico de color amarillo, con grasa de automóvil, en diferentes sitios del cultivo. Si la población es notoria aplicar Lindano, Malatión, Endosulfan, Diazinón, Foxin o Fenitrotion.	Hemípteros. Los adultos son parecidos a diminutas mariposas blancas. Los huevos son muy pequeños de forma oval, color amarillo y luego negro. Las larvas son ovals.
<i>Frankliniella sp</i>	Trips	Las larvas de este insecto succionan los tejidos de las hojas, produciendo manchas de color verdoso blanquecino, de unos tres centímetros de diámetro. Las larvas son de color amarillento.	Destruir residuos de cultivos del interior y de los alrededores del invernadero. Estimular la presencia de mariquitas y crisopas que son eficientes depredadores de trips. Malatión	Otro método de control es colocar trampas adhesivas azules antitrips, desde el inicio del cultivo. Como vector puede transmitir virosis.
<i>Erysiphe polygoni y Sphaerotheca fuliginea</i>	Oídio o Cenicilla polvoriento o Mildiú polvoriento	En las dos caras de las hojas aparecen manchas circulares de color blanquecino, van tomando un aspecto pulverulento. Se unen unas a otras hasta que cubren totalmente la hoja. Entonces las hojas toman un color amarillento y luego mueren. Puede provocar la defoliación. La calidad del fruto disminuye mucho.	Uso de variedades resistentes. Se puede aplicar infusiones de cebolla al follaje por 3 noches seguidas. Aplicar productos a base de azufre. Dinocap, Benomilo, Quinometionato, Permanganato de potasio o Pyrazofos.	<i>E. Cichoracearum</i> Enfermedad producida por tres tipos de hongos que se expresan. Infusión: En un litro de agua poner una onza (28.7 g.) de cebolla, enfriar y aplicar.
<i>Aphis frangulae</i>	Pulgón	Segregan una sustancia pegajosa y azucarada sobre la parte aérea. Los pulgones se sitúan en el envés de las hojas y en los brotes tiernos. La melaza que segregan da lugar al desarrollo del hongo "negrilla". Los frutos pierden mucha calidad por la melaza.	Hay depredadores naturales que pueden controlar esta plaga, entre ellos se encuentran las crisopas, mariquitas y moscas syrphides. Lindano, Menazón, Diazinón, Malatión, Fenitrothión, Metadidofos.	Insectos chupadores con su pico absorben los jugos vegetales. Hay individuos alados y otros ápteros (sin ellas).

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	SINTOMAS	CONTROL	OTRO
<i>Virus del Mosaico del pepino</i>	Virosis	Aparece mosaico en las hojas, achaparramiento de las plantas y formación de un mármol en los frutos. El mosaico en las hojas se observa en las más jóvenes, junto a la yema terminal; en las hojas más viejas se forma una necrosis en forma de V, con el vértice hacia las nerviaciones y abertura en los bordes.	Uso de variedades resistentes. Eliminación de vectores transmisores como : pulgón, araña roja, etc.	No hay prevención.
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Mildiu veloso	En la parte superior de las hojas aparecen unas manchas irregulares de color pardo rojizo; por el envés se recubre de micelio aterciopelado de color grisáceo. Se desarrolla en ambiente de alta humedad y temperatura o rocío abundante	Uso de variedades resistentes. Aspersiones semanales con extractos de manzanilla, cebolla o cola de caballo. Mancozeb, Zineb u Oxidloruro de cobre.	Abundante en época con lluvias. Infusión para aspersiones: Licuar una onza (28.7 g.) de cualquiera de estas hierbas y diluirlas en 4 litros de agua.

(Serano, 1979; FAO-UNESCO e INNFA, 2002 y Valenzuela, 2001)