



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

El papel de *Azospirillum* y hongos micorrízicos  
arbusculares en la producción de jitomate y su  
mecanismo de acción

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. ROSALBA ESQUIVEL COTE

TUTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DEL PILAR HUANTE PÉREZ

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA  
DR. RONALD FERRERA-CERRATO

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **ESQUIVEL COTE ROSALBA** con número de cuenta **88208189** con la tesis titulada: "**EL PAPEL DE AZOSPIRILLUM Y HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES EN LA PRODUCCIÓN DE JITOMATE Y SU MECANISMO DE ACCIÓN**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MA. DEL PILAR HUANTE PÉREZ**:

Presidente:	DRA. MARINA GAVILANES RUIZ
Vocal:	DR. RONALD FERRERA CERRATO
Secretario:	DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA
Suplente:	DRA. ALMA DELFINA LUCIA OROZCO SEGOVIA
Suplente	DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ SÁNCHEZ

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud de la alumna, **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base en lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado (29 septiembre de 2006).

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F. a 28 de septiembre de 2011.

*M. del Coro Arizmendi*  
**Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga**  
Coordinadora del Programa

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (181624).

A los miembros del Comité Tutor:

- Dra. María del Rocío Cruz Ortega, del Laboratorio de Alelopatía, del Departamento de Ecología Funcional, Instituto de Ecología, UNAM.
- Dr. Ronald Ferrera-Cerrato, del Área de Microbiología, del Postgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México.

## AGRADECIMIENTOS

A los miembros del Jurado, por su tiempo, esfuerzo e interés en enriquecer el presente escrito de tesis:

Dra. Marina Gavilanes Ruíz.  
Dra. María del Rocío Cruz Ortega.  
Dra. Alma Delfina Lucía Orozco Segovia.  
Dr. Francisco Javier Álvarez.  
Dr. Ronald Ferrera-Cerrato.

A quienes me apoyaron con los análisis correspondientes e instalaciones para el cumplimiento de los objetivos de cada experimento:

Dra. Esperanza Martínez Romero y Dr. Antonio Rogel, del Centro de Ciencias Genómicas (UNAM), por asesoría y apoyo en el uso del cromatógrafo de gases para la determinación de la actividad nitrogenasa y la producción de etileno en las cepas AZm5 y VS9 de *Azospirillum*.

Dr. Jesús Caballero-Mellado, Dra. Jannet Onofre-Lemus y Q.F.B. Lourdes Martínez-Aguilar, del Centro de Ciencias Genómicas (UNAM), por su asesoría y apoyo en la identificación del gen *acdS* en las cepas AZm5 y VS9 de *Azospirillum*.

M.V.Z. Fermín Jiménez Flores y Sr. Pedro Jiménez Olivares, de la mini empresa productora y comercializadora de jitomate, JITOSAN de SPR de RL, de Santiago Tepalcatlalpan, Xochimilco, por las facilidades brindadas para llevar a cabo el estudio del efecto de la inoculación con *Azospirillum* en el crecimiento vegetal de plantas de jitomate en un cultivo en invernadero.

# AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química (UNAM).

Al Departamento de Biología de la Facultad de Química (UNAM), en especial a los profesores que fungieron como jefes del departamento durante el inicio y final de mis estudios de doctorado: Q.F.B. Raúl Garza Velasco y Dr. Rodolfo Pastelín Palacios.

---

A la hermosa familia que somos Mario, Nicolás y yo.

A mi esposo Mario Alberto Hernández Bautista, por el amor, el cuidado y el apoyo incondicional que me ha brindado para que yo pudiera conseguir este logro, el cual también es suyo.

A mi hijo Nicolás, mi mayor orgullo, por ser el hijo que toda madre sueña y por querernos tanto. Gracias por haber llegado a iluminar mi vida. Tú has sido mi mejor maestro. Te amo profunda e infinitamente *Colás*.

A mi mamá, Catalina Cote Soto, la mujer que más admiro y más amo. Sin tu amor y tu apoyo constante no hubiera sido posible este logro. Gracias por estar siempre conmigo.

A mi papá, Jorge Esquivel Vázquez, por su amor, su apoyo, sus consejos y sus palabras de ánimo para conmigo. Gracias por estar siempre conmigo.

A mis hermanos, Marisol y Aníbal Rodrigo, y a mi cuñada Licha, por su amor, su apoyo, sus palabras de aliento y por decirme que soy su orgullo y su ejemplo. Los amo.

A mi sobrino Pedro Armando, por quererme tanto, y quién junto con Aníbal, asistieron en la instalación del invernadero en Xochimilco con Fermín. Te amo y te apoyaré siempre.

A mis sobrinos Jesús, Ariana y Rodrigo, por su cariño, sus besos y sus abrazos. Los amo.

A mi otra familia: mis suegros, Hortensia Bautista Martínez y Nicolás Hernández Rivera, y mi cuñada Wendy, por el apoyo y el afecto que me han dado y demostrado. Gracias por los desayunos.

A la Maestra Rosa María Ramírez Gama, mi maestra y amiga. Agradezco no sólo su apoyo, sus consejos y su cariño; sino la confianza que me ha otorgado durante todos estos años. Con nada podré pagar todo lo que ha hecho por mí. Gracias, la quiero mucho.

A la Maestra Lupita Tsuzuki Reyes, mi maestra y amiga. Tal como una hermana mayor, agradezco su apoyo, sus consejos, su cariño. Ha sido todo mi ejemplo. Algún día se le reconocerá debidamente su dedicación y su esfuerzo. Gracias, la quiero mucho.

A la Dra. Pilar, mi respeto y mi admiración. Por su apoyo, su interés, su esfuerzo y su ejemplo. Ha sido un placer trabajar con usted y le estaré eternamente agradecida.

Al M.V.Z. Fermín Jiménez Flores y al Sr. Pedro Jiménez Olivares, por su apoyo, interés en mi trabajo de tesis. Gracias por su amistad.

A mis alumnos de Servicio Social, cuyo apoyo y trabajo fue indispensable para llevar a cabo el experimento en invernadero con Fermín: Gina, Angélica, y Juan Rodolfo.

A mi tesista y amiga Selene López Gómez, por apoyo en el trabajo del experimento acerca del efecto de la co-inoculación con *Azospirillum*-micorrizas en el crecimiento de plantas de jitomate. Cuando tú pensabas que aprendías de mí, en realidad yo aprendía más de tí.

A Javier Alfonso Bonifaz, por su apoyo incondicional e incansable para las diversas tareas extras al trabajo experimental. Agradezco tu tiempo y tu interés.

A mis “compañeras del mismo dolor”, que nos animábamos mutuamente para lograr doctorarnos: Carmen Urzúa Hernández (nos ganó), Patricia Castro Ortíz y Mónica Miranda Ríos, ya casi muchachas, recuerden que “*a cada capillita le toca su fiestecita*”. Gracias por su apoyo, su interés, su ánimo y su amistad.

A Jesica Alejandra Ibarra, por su apoyo y dedicación para la elaboración de los esquemas incluidos en la presente tesis. Gracias por tu interés y tu amistad.

A Bernardo Pérez Zamorano, por tu asesoría en la traducción del Abstract. Gracias por tu interés y tu amistad.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de ecofisiología vegetal, Instituto de Ecología, UNAM; en especial a Diana Soriano y a Irma Calixto, su apoyo y su amistad fueron invaluableles en mi ingreso al laboratorio y durante el trabajo experimental. Gracias por sus incontables asesorías y por su amistad. También agradezco a Tere, Bernardo e Inti.

A Patricia Martínez, secretaria de la oficina de Posgrado del Instituto de Ecología, por todo el asesoramiento tan amablemente recibido para los trámites de titulación y por su pronta y expedita respuesta ante mis dudas.

A todos mis alumnos, tanto de la Facultad de Química como de la Facultad de Ciencias, quienes también fueron mis maestros, que me animaron y se interesaron por mi trabajo de tesis. Seguí sus consejos.

A mis compañeros profesores tanto de la materia de Microbiología General como de Microbiología Experimental, de la Facultad de Química, UNAM, por su apoyo y por hacer más “ligero” mis compromisos con las clases y con mis estudios de doctorado: M. en C. Rosa María Ramírez Gama, M. en C. Guadalupe Tsuzuki Reyes, QFB Norma Trejo, QFB Alejandro Camacho Cruz, QFB Adriana G. Mejía Chávez, QFB Elsa Escudero García, QFB Ruth Martín Fuentes, QA Hugo A. Hernández Pérez y QFB Manuel Méndez.

Adry gracias por tus consejos y tu amistad, te quiero.

Al Sr. Crisóstomo Lugo, auxiliar de laboratorista del Laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química, UNAM, por el apoyo recibido en el laboratorio.

A todo el Laboratorio de Microbiología Experimental!





## AGRADECIMIENTOS PÓSTUMOS

Dra. Gina Holguín†, por su asesoría en la determinación de la actividad de la enzima ACC desaminasa, y por su interés en el estudio de dicha actividad en las cepas de *Azospirillum* de la colección del Laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química (UNAM). Su pérdida irreparable dejó un hueco enorme en todos aquellos que la conocimos y la apreciamos, así como para la investigación de la interacción microbiana y la restauración de ecosistemas áridos de México mediante el uso de inoculantes microbianos.

Dr. Jesús Caballero-Mellado†, por su apoyo e interés en el estudio de la actividad ACC desaminasa en las cepas de *Azospirillum* de la colección del Laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química (UNAM). Su ausencia fue una gran pérdida para quienes lo conocimos, así como para la investigación y el uso de inoculantes en México.

Sr. Roberto Saldívar†, laboratorista del Laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química (UNAM), por su ayuda a superar esos “detallitos” que surgieron durante los experimentos en el laboratorio. Gracias por su apoyo.

Descansen en paz!

## *DEDICATORIA*

*A la M. en C. Rosa María Ramírez Gama*

*A la M. en C. Guadalupe Tsuzuki Reyes*

*A la Dra. Pilar Huante Pérez*

# *DEDICATORIA*

*A los amores de mi vida:*

*Mario y Nicolás*

# INDICE

TEMA	PAG
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
<b>Capítulo I. Antecedentes</b>	7
1.1 El uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal para el desarrollo sustentable de la agricultura	7
1.1.1 Fertilizantes de origen biológico	8
1.1.2 Inoculantes microbianos	8
1.2 El uso de <i>Azospirillum</i> y hongos micorrízicos arbusculares en el desarrollo sustentable de la agricultura	9
1.2.1 <i>Azospirillum</i>	9
1.2.2 Hongos micorrízicos arbusculares	12
1.2.3 Co-inoculación con <i>Azospirillum</i> y hongos micorrízicos arbusculares	12
1.3 Importancia económica del jitomate en México y el mundo	14
1.3.1 Dosis de fertilizante empleadas en el cultivo de jitomate en la República Mexicana	15
1.4 Fertilizantes químicos	15
1.4.1 Uso de fertilizantes químicos	16
1.4.2 Fertilizantes químicos nitrogenados	16
1.4.3 Fertilizantes químicos fosfatados	18
1.5 Importancia del nitrógeno y fósforo en la nutrición vegetal	18
1.5.1 Nitrógeno	19
1.5.1.1 <i>Asimilación y funciones biológicas</i>	20
1.5.1.2 <i>Síntomas de deficiencia de N en plantas</i>	21
1.5.2 Fósforo	22
1.5.2.1 <i>Asimilación y funciones biológicas</i>	22
1.5.2.2 <i>Síntomas de deficiencia de P en plantas</i>	23
Literatura citada	23

TEMA	PAG
<b>Capítulo II. Importancia agro-ecológica de microorganismos promotores del crecimiento vegetal: rizobacterias que sintetizan la enzima ACC desaminasa y hongos micorrízicos arbusculares</b>	32
2.1 Rizosfera	32
2.1.1 Exudados de la rizosfera	32
2.2 Microorganismos rizosféricos promotores del crecimiento vegetal	34
2.2.1 <i>Azospirillum</i> : una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal	34
2.2.2 Características morfológicas y fisiológicas de bacterias del género <i>Azospirillum</i> sp.	34
2.2.3 Micorrizas: definición y características	35
2.2.3.1 <i>Hongos Micorrízicos Arbusculares</i>	35
2.3 Colonización microbiana de la raíz	37
2.3.1 Colonización radicular por <i>Azospirillum</i>	38
2.3.2 Colonización radicular por Hongos Micorrízicos Arbusculares: desarrollo de la simbiosis micorrízica	39
2.3.2.1 <i>Señales producidas por la planta</i>	39
2.3.2.2 <i>Etapa presimbiótica</i>	40
2.3.2.3 <i>Establecimiento de la simbiosis</i>	42
2.3.2.4 <i>Formación de arbúsculos</i>	43
2.3.2.5 <i>Bacterias que favorecen de la colonización micorrízica</i>	44
2.4 Interacción planta-microorganismo promotor del crecimiento vegetal	45
2.4.1 Plasticidad fenotípica	45
2.5 Mecanismos de acción empleados por los microorganismos promotores del crecimiento vegetal	46
2.5.1 Mecanismos empleados por los HMA para promover el crecimiento vegetal	47
2.5.1.1 <i>Absorción de nutrientes y su transporte a través del micelio extrarradical</i>	47
2.5.1.2 <i>Carbono</i>	48
2.5.1.3 <i>Nitrógeno</i>	48
2.5.1.4 <i>Fósforo</i>	50
2.5.2 Mecanismos empleados por <i>Azospirillum</i> para promover el crecimiento vegetal	51
2.6 Importancia de las fitohormonas	52
2.6.1 Auxinas	52
2.6.1.1 <i>Biosíntesis de las auxinas en plantas</i>	53

TEMA	PAG
2.6.2 Citocininas	53
2.6.2.1 <i>Biosíntesis de las citocininas en plantas</i>	54
2.6.3 Etileno	54
2.6.3.1 <i>Biosíntesis del etileno en plantas</i>	56
2.7 La enzima ACC desaminasa	57
2.7.1 Intervención de la enzima ACC desaminasa en la biosíntesis del etileno en plantas	58
2.7.2 Perfil bioquímico de la enzima ACC desaminasa	59
2.7.3 Genética de la enzima ACC desaminasa	59
2.8 Bacterias que producen la enzima ACC desaminasa	60
2.8.1 Importancia de la inoculación de plantas con bacterias productoras de la ACC desaminasa	67
2.8.1.1 <i>Estrés hídrico por salinidad</i>	67
2.8.1.2 <i>Estrés anaeróbico</i>	67
2.8.1.3 <i>Ataque de plantas por fitopatógenos</i>	68
2.8.1.4 <i>Contaminación del suelo por metales pesados e hidrocarburos</i>	68
2.8.1.5 <i>Deficiencia nutrimental y aplicación de fertilizantes</i>	69
2.8.2 Inoculación de plantas con bacterias productoras de ACC desaminasa y HMA	69
Literatura citada	70
<b>Justificación, Hipótesis, Objetivo y Metas</b>	86
<b>Capítulo III. <i>Azospirillum lipoferum</i> strain AZm5 containing 1-aminociclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency</b>	88
<b>Capítulo IV. Efecto de <i>Azospirillum</i> en el crecimiento y producción de plantas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) fertilizadas con diferentes dosis de nitrógeno, en un cultivo en invernadero</b>	100
Resumen	100
Introducción	101
Materiales y métodos	102
Resultados	107
Discusión	115
Conclusiones	118
Literatura citada	118

TEMA	PAG
<b>Capítulo V. Efecto de la interacción <i>Azospirillum</i> – hongos micorrízicos arbusculares en la etapa vegetativa del crecimiento de plantas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) fertilizadas con dosis reducidas de nitrógeno y fósforo</b>	122
Resumen	122
Introducción	123
Materiales y métodos	123
Resultados	130
Discusión	137
Conclusiones	139
Literatura citada	139
<b>Capítulo VI. Discusión general y conclusiones</b>	143
Literatura citada	152
<b>Anexo 1 (Capítulo IV)</b>	157

## INDICE DE CUADROS

CUADRO	PAG
<b>Capítulo I. Antecedentes</b>	
<b>Cuadro 1.2.1</b> Ejemplos del efecto de la inoculación con cepas de <i>Azospirillum</i> sp. en diferentes cultivos.	10
<b>Cuadro 1.2.3</b> Algunos ejemplos del efecto de la co-inoculación de plantas con hongos micorrízicos arbusculares y cepas de <i>Azospirillum</i> sp., y en algunos casos la incorporación de otro microorganismo.	13
<b>Cuadro 1.3.1</b> Dosis de fertilizante químico empleado en el cultivo de jitomate, en la República Mexicana.	15
<b>Capítulo II. Importancia agro-ecológica de microorganismos promotores del crecimiento vegetal: rizobacterias que sintetizan la enzima ACC desaminasa y hongos micorrízicos arbusculares</b>	
<b>Cuadro 2.2.3.1</b> Ubicación taxonómica y géneros formadores de la micorriza arbuscular (Schübler <i>et al.</i> , 2001; Walker <i>et al.</i> , 2004; Oehl y Sieverding, 2004; Schübler y Walker, 2010).	36
<b>Capítulo II. Importancia agro-ecológica de microorganismos promotores del crecimiento vegetal: rizobacterias que sintetizan la enzima ACC desaminasa y hongos micorrízicos arbusculares</b>	
<b>Cuadro 2.8.1</b> Géneros bacterianos reportados con actividad ACC desaminasa del Phylum Actinobacteria	61
<b>Cuadro 2.8.2</b> Géneros bacterianos reportados con actividad ACC desaminasa del Phylum Firmicutes	62
<b>Cuadro 2.8.3a</b> Géneros bacterianos reportados con actividad ACC desaminasa del Phylum Proteobacteria	63
<b>Cuadro 2.8.3b</b> Géneros bacterianos reportados con actividad ACC desaminasa del Phylum Proteobacteria	64
<b>Cuadro 2.8.3c</b> Géneros bacterianos reportados con actividad ACC desaminasa del Phylum Proteobacteria	65
<b>Cuadro 2.8.4</b> Géneros bacterianos reportados con actividad ACC desaminasa del Phylum Bacteroidetes	66
<b>Capítulo IV. Efecto de <i>Azospirillum</i> en el crecimiento y producción de plantas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) fertilizadas con diferentes dosis de nitrógeno, en un cultivo en invernadero</b>	
<b>Cuadro 4.1</b> Población de células de <i>Azospirillum</i> presente en los inóculos.	104
<b>Cuadro 4.2</b> Características de la variedad Juanita (832, Hazera Seeds, Inc., FL, EU)	105
<b>Cuadro 4.3</b> Solución nutritiva recomendada para el cultivo hidropónico de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ), recomendada por Hazera Seeds, Inc. (FL, EU).	105
<b>Cuadro 4.4</b> Variables evaluadas para el análisis de crecimiento vegetal de plantas de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).	106
<b>Cuadro 4.5</b> Características físicas y químicas del suelo empleado en el cultivo de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).	107
<b>Cuadro 4.6</b> Resultados del análisis microbiológico realizado en los sustratos empleados en el cultivo de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ), turba-agrolita (almácigo) y suelo (trasplante).	108
<b>Cuadro 4.7</b> Concentración de amonio y nitrato, presente en el sustrato, monitoreado a diferentes días de después de la siembra (dds) del cultivo de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).	109



TEMA	PAG
<b>Cuadro 4.8</b> Población de células de <i>Azospirillum</i> presente en raíces de jitomate Var. Juanita, a diferentes días después de la siembra (dds) del cultivo de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).	109
<b>Cuadro 4.9</b> Análisis de crecimiento de plántulas de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) (71 días después de la siembra, trasplante) inoculadas con cepas de <i>Azospirillum</i> (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo) y fertilizadas con diferentes dosis de nitrógeno.	111
<b>Cuadro 4.10</b> Análisis de crecimiento de plántulas de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) (122 días después de la siembra) inoculadas con cepas de <i>Azospirillum</i> (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo) y fertilizadas con diferentes dosis de nitrógeno.	112
<b>Cuadro 4.11</b> Producción de frutos en plantas de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ). (122 días después de la siembra) inoculadas con cepas de <i>Azospirillum</i> (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo) y fertilizadas con diferentes dosis de nitrógeno.	113
<b>Cuadro 4.12</b> Análisis Químico Proximal de frutos en plantas de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ), del primer corte, a los 122 días de desarrollo.	114
<b>Capítulo V. Efecto de la interacción <i>Azospirillum</i> – hongos micorrízicos arbusculares en la etapa vegetativa del crecimiento de plantas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) fertilizadas con dosis reducidas de nitrógeno y fósforo</b>	
<b>Cuadro 5.1</b> Solución nutritiva recomendada por Hazera Seeds, Inc. (FL, EU), para el cultivo hidropónico de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ), donde 170 kg N ha <sup>-1</sup> (dosis de N al 50%) y 340 kg N ha <sup>-1</sup> (dosis de N al 100%)	129
<b>Cuadro 5.2a</b> Análisis de crecimiento en plántulas de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) var. Juanita, a los 17 y 32 días después de la siembra (dds), inoculadas con la cepa AZm5 de <i>A. lipoferum</i> y un inóculo micorrízico silvestre (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo no fertilizado).	131
<b>Cuadro 5.2b</b> Análisis de crecimiento en plántulas de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) var. Juanita, a los 17 y 32 días después de la siembra (dds), inoculadas con la cepa AZm5 de <i>A. lipoferum</i> y un inóculo micorrízico silvestre (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo no fertilizado).	132
<b>Cuadro 5.3</b> Efecto en el crecimiento de plántulas de jitomate var. ACE VF55 (52 dds) inoculadas con cepa AZm5 de <i>A. lipoferum</i> , la cepa VS9 de <i>A. brasilense</i> y el inóculo micorrízico Zac19 (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo, fertilizado con 170 kg N ha <sup>-1</sup> y 0 kg P ha <sup>-1</sup> ).	136
<b>Cuadro 5.4</b> Colonización microbiana de plántulas de jitomate var. ACE VF55 (52 dds) inoculadas con cepas de <i>Azospirillum</i> y la cepa micorrízica Zac19 (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo, fertilizado con 170 kg N ha <sup>-1</sup> y 0 kg P ha <sup>-1</sup> ).	137

## INDICE DE FIGURAS

TEMA	PAG
<b>Capítulo I. Antecedentes</b>	
<b>Figura 1.5</b> Representación esquemática del movimiento de elementos minerales hacia la superficie de la raíz de plantas crecidas en suelo.	20
<b>Figura 1.5.1.1</b> El nitrógeno es absorbido por las plantas predominantemente en forma inorgánica ( $\text{NO}_3^-$ y $\text{NH}_4^+$ ).	22
<b>Capítulo II. Importancia agro-ecológica de microorganismos promotores del crecimiento vegetal: rizobacterias que sintetizan la enzima ACC desaminasa y hongos micorrízicos arbusculares</b>	
<b>Figura 2.3</b> Colonización de raíces por microorganismos.	39
<b>Figura 2.3.2.2a</b> Seguimiento del desarrollo de la micorriza arbuscular.	42
<b>Figura 2.3.2.2b</b> Crecimiento de diferentes hifas y sus estrategias de ramificación en los HMA.	43
<b>Figura 2.3.2.4</b> Arbúsculo, estructura simbiótica característica de la micorriza arbuscular.	45
<b>Figura 2.5.1.1</b> Flujo metabólico y transporte a larga distancia en la micorriza arbuscular (MA).	50
<b>Figura 2.5.1.4</b> El P frecuentemente se encuentra en cantidades limitantes para el desarrollo vegetal, por tanto muchas plantas se asocian con HMA (Myc) que mejoran la nutrición con P que intercambia con la planta por C reducido.	51
<b>Figura 2.6.1.1.</b> Biosíntesis de la auxina ácido indol acético en plantas.	54
<b>Figura 2.6.2.1.</b> Biosíntesis de citocininas en plantas.	56
<b>Figura 2.6.3.1.</b> Biosíntesis del etileno en plantas y degradación del ACC.	57
<b>Figura 2.7</b> Desaminación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor del etileno, por acción de la enzima ACC desaminasa.	58
<b>Figura 2.7.1</b> Representación esquemática del modelo propuesto mediante el cual las PGPR disminuyen los niveles de etileno en plantas (mecanismo de la enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) o ACC desaminasa).	59
<b>Capítulo IV. Efecto de <i>Azospirillum</i> en el crecimiento y producción de plantas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) fertilizadas con diferentes dosis de nitrógeno, en un cultivo en invernadero</b>	
<b>Figura 4.1</b> Esquema que muestra las medidas del invernadero y la distribución de las unidades experimentales.	102
<b>Capítulo V. Efecto de la interacción <i>Azospirillum</i> – hongos micorrízicos arbusculares en la etapa vegetativa del crecimiento de plantas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) fertilizadas con dosis reducidas de nitrógeno y fósforo</b>	
<b>Figura 5.1</b> Espora de hongo micorrízico arbuscular del inóculo silvestre empleado en el cultivo de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> , var Juanita), visto en un microscopio estereoscópico, con un aumento de 40x.	125
<b>Figura 5.2</b> Efecto de la interacción <i>A. lipoferum</i> (AZm5) - hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la tasa relativa de crecimiento (TRC) en la etapa vegetativa de plántulas jitomate (17 a 32 días después de la siembra).	133
<b>Figura 5.3</b> Porcentaje de colonización micorrízica con (HMA+AZm5) y sin inoculación con la cepa AZm5 de <i>A. lipoferum</i> (HMA-AZm5).	134
<b>Figura 5.4</b> Longitud de tallo a diferentes días después de la siembra (dds) en plantas de jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> , var. ACE VF55).	135

TEMA	PAG
<b>Capítulo VI. Discusión general y conclusiones</b>	
<b>Figura 6.1</b> Modelo hipotético propuesto por Van der Werf y Nagel (1996) que explica el efecto en el crecimiento vegetal de un alto o bajo aporte de nitrógeno. Tomado de Lambers <i>et al.</i> (1998).	148
<b>Figura 6.2</b> Modelo hipotético propuesto para explica el mecanismos de acción que la cepa AZm5 de <i>Azospirillum lipoferum</i> emplea para promover el crecimiento vegetal de jitomate.	150
<b>Figura 6.3</b> Aspectos con los cuales los resultados del trabajo de tesis contribuye a la ciencia básica y aplicada en el uso de inoculantes microbianos para el cultivo de jitomate.	151

---

## RESUMEN

### El papel de *Azospirillum* y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de jitomate y su mecanismo de acción

Uno de los graves problemas ambientales por los que atraviesa el campo mexicano y el de otros países del mundo, es el uso de fertilizantes químicos, los cuales son aplicados al suelo indiscriminadamente para obtener el mayor rendimiento de los cultivos. Ante esta situación, y de acuerdo con la agricultura sostenible, se ha propuesto el uso de inoculantes -elaborados con microorganismos promotores del crecimiento vegetal, como bacterias del género *Azospirillum* y hongos micorrízicos arbusculares (HMA)- para ayudar a reducir el uso de estos agroquímicos en cultivos como el jitomate, la hortaliza de mayor exportación de México. Esta situación presenta dos opciones para la ciencia: a nivel básico y aplicado. Respecto a la primera, los mecanismos de acción que se han reconocido en *Azospirillum* son la fijación de nitrógeno y la producción de fitohormonas; sin embargo, no se ha evaluado la actividad de la enzima ACC desaminasa, ni su gen (*acdS*). La enzima interviene en la biosíntesis de etileno en plantas, donde evita su sobreproducción cuando éstas se encuentran en condiciones adversas (calor, frío, sequía, inundación, contaminación por metales pesados). Este mecanismo de acción se identificó por primera vez en una levadura en 1978; no obstante, a partir de 1998 la enzima ACC desaminasa se ha identificado en sólo 36 géneros bacterianos, y no fue sino hasta el año 2006 que en *Azospirillum*, uno de los géneros más importantes como promotores del crecimiento vegetal, se identificó el gen *acdS*, pero sin reportar su actividad. A nivel de ciencia aplicada, en la actualidad ha sido reportado muy poco acerca del efecto de estos microorganismos en el crecimiento de plantas de jitomate y su relación con el nivel de fertilización de nitrógeno aplicado. De acuerdo con lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el mecanismo de acción de *Azospirillum* para promover el crecimiento y la producción de plantas de jitomate, así como evaluar las dosis óptimas y subóptimas de nitrógeno recomendadas para su cultivo, y su interacción con los HMA.

Para cumplir con estos objetivos, se diseñaron tres experimentos: en el primero, se caracterizaron cepas de *Azospirillum* en cuanto a la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas (auxinas, citocininas, etileno), la actividad de la enzima ACC desaminasa y la identificación del gen *acdS*; así como el efecto de la inoculación en plántulas de jitomate en condiciones subóptimas de nitrógeno respecto a la dosis recomendada para su cultivo (340 kg N ha<sup>-1</sup>). En el segundo, se evaluó el efecto de *Azospirillum* en el crecimiento de plantas y producción de frutos de jitomate cultivadas en un sistema semi hidropónico a nivel comercial (empresa Jitosan S.A. de R.L.S., San Santiago Tepalcatlalpan, Xochimilco, D.F.) y fertilizadas con el 50% y 75% de nitrógeno, respecto a la dosis recomendada. En el tercero, se evaluó el efecto de HMA en el crecimiento de plantas de jitomate y su interacción con cepas de *Azospirillum* en un cultivo en suelo fertilizado con 0% de fósforo y 50% de nitrógeno, respecto a la dosis recomendada.

Los resultados muestran que, la cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum* presenta una alta actividad de la enzima ACC desaminasa ( $2.68 \pm 0.013 \mu\text{mol } \alpha\text{-cetobutirato mg proteína}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), dato nunca antes reportado, y cuya actividad resultó mayor que la de algunas cepas transformadas genéticamente como *Escherichia coli* pRKACC ( $1.74 \pm 0.06$ ). Estos resultados se relacionan con un fragmento de ADN de 639pb (GU727865) que se identificó en esta cepa, el cual corresponde al gen *acdS*. De la misma forma, encontramos que la cepa AZm5 produce cantidades significativas de la fitohormona zeatina ( $149 \pm 3.06 \mu\text{g ml}^{-1}$  de medio de cultivo), una de las citocininas más importantes de las plantas (responsables de incrementar la expansión foliar y la capacidad fotosintética), y que sólo se había reportado en cepas de *A. brasilense*.

Por otro lado, la cepa AZm5 de *A. lipoferum* incrementa la expansión foliar de las plantas al ser fertilizadas con el 50% de nitrógeno de la dosis recomendada, y un incremento significativo de la tasa de asimilación neta (NAR) y la tasa relativa de crecimiento (RGR) en plantas de jitomate a los 71 días después de la siembra (etapa vegetativa o de trasplante). La producción de frutos en el primer corte, se tradujo en un mayor peso y un mayor número de frutos de las plantas inoculadas en comparación de aquellas plantas no inoculadas. Adicionalmente, la cepa AZm5 incrementó significativamente la concentración de potasio en el fruto; no obstante, que no existen reportes respecto a este fenómeno, si se ha documentado que las citocininas favorecen la absorción de potasio en tejido vegetal. Los resultados de los experimentos con HMA, sugieren que la colonización de plántulas de jitomate con HMA de una cepa silvestre responde a la presencia de la cepa AZm5, e incrementa el contenido de agua y la biomasa total del vástago en la etapa vegetativa de las plántulas. Al ser inoculadas las plantas con la cepa micorrízica Zac 19 favorece la absorción de N y P de las plántulas de jitomate fertilizadas con el 50% de nitrógeno y el 0% de fósforo de la dosis recomendada; no obstante, la co-inoculación con la cepa AZm5 no presenta diferencias significativas en el crecimiento de las plántulas de jitomate. El efecto de la cepa AZm5 en los diferentes parámetros del crecimiento vegetal podrían atribuirse a la actividad de la enzima ACC desaminasa, ya que estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura, donde mencionan que cepas rizobacterias que sintetizan ACC desaminasa, como *Pseudomonas*, incrementan el crecimiento vegetal y el contenido de nitrógeno en plantas de canola y trigo fertilizadas con dosis subóptimas de nitrógeno; así mismo, su interacción con HMA como *Glomus*, muestran un efecto sinérgico en el crecimiento de plántulas de pepino.

Por primera vez se reporta que el mecanismo de acción que permite a la cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum* promover el crecimiento vegetal en bajas dosis de fertilización, es la producción de citocininas y la actividad de la enzima ACC desaminasa, la cual se relaciona con el gen *acdS* identificado en este estudio. Así mismo, sugerimos que la dosis mínima de fertilizante químico nitrogenado necesaria para ser empleada en combinación con la inoculación con cepas de *Azospirillum* o con HMA en plantas de jitomate es de  $170 \text{ kg N ha}^{-1}$  (50% N) para un cultivo en invernadero. Con base en lo anterior, este trabajo aporta al conocimiento de los mecanismos de acción que emplea uno de los géneros más importantes reconocidos como promotores del crecimiento vegetal (PGPR): *Azospirillum*; y contribuye al conocimiento de la simbiosis micorrízica y a la interacción benéfica sinérgica planta-microorganismo.

---

## ABSTRACT

### **The role of *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal fungi on tomato production, and their action mechanism**

The indiscriminate use of chemical fertilizers, employed in order to obtain higher crop yields, is one of the most serious environmental problems of Mexican, and worldwide, agriculture. Faced with this situation; and in accordance with sustainable agriculture; the use of inoculants, made from plant growth promoting microorganisms - such as bacteria of the *Azospirillum* genus and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) - has been proposed, in order to help to reduce the use of these agrochemicals in crops like tomato, which is Mexico's largest vegetable export. This problem is studied considering basic and applied research. Regarding the first, the recognized action mechanisms in *Azospirillum* are nitrogen fixation and phytohormone production; however ACC deaminase activity has not been evaluated. This enzyme is involved in ethylene biosynthesis in plants, which prevents over production under adverse conditions (heat, cold, drought, flood, heavy metal contamination, etc.). This action mechanism was first identified in yeast in 1978, notwithstanding since 1998 ACC deaminase has been identified in only 36 bacterial genera, and it was not until 2006 that the *acdS* gene was identified in *Azospirillum* (one of the most important genres related to plant growth promotion) , although the enzyme activity was not reported. At applied science level, up to date, only some few papers has been issued about the effect of these microorganisms in the tomato plant grow and their relationship to the nitrogen applied fertilization. According to the aforementioned, the aim of this work was to study the action mechanism of *Azospirillum* for promoting growth and production in tomato plants, as well as assessing optimal and suboptimal nitrogen dosages for their cultivation; and their interaction with AMF.

In order to meet these aims, three experiments were designed: in the first one, *Azospirillum* strains were characterized in terms of nitrogen fixation, phytohormone production (auxins, cytokinins, ethylene), ACC deaminase activity and identification of the *acdS* gene; as well as the effect of inoculation of tomato seedlings in suboptimal nitrogen conditions in relation to the recommended cultivation dose (340 kg N ha<sup>-1</sup>). In the second experiment, the effect of *Azospirillum* on plant growth and fruit yield of tomato plants grown in a semi-hydroponic system at a commercial level (Jitosan S.A. de R.L., San Santiago Tepalcatlalpan, Xochimilco, D.F.) was evaluated, while fertilized at 50% and 75% nitrogen, in respect to the recommended dose. In the third experiment, the effect of AMF on the growth of tomato plants and their interaction with *Azospirillum* strains was evaluated, while cultivated in fertilized soil with 0% phosphorus and 50% nitrogen, in relation to the recommended dose.

The results show that the AZm5 strain of *Azospirillum lipoferum* presents a high ACC deaminase activity ( $2.68 \pm 0.013 \mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), a fact never reported before, and whose activity was higher than the one shown by some genetically transformed bacterial strains such as *Escherichia coli* pRKACC ( $1.74 \pm 0.06$ ). These results relate to a 639bp DNA fragment (GU727865) which was identified this strain and corresponds to the *acdS* gene. In a similar way, we found that the AZm5 strain produces significant amounts of the zeatin phytohormone ( $149 \pm 3.06 \mu\text{g ml}^{-1}$  of culture medium), one of the most important cytokinins in plants (responsible for increasing leaf expansion and photosynthetic ability), and which had only been reported in *A. brasilense* strains.

On the other hand, the AZm5 strain of *A. lipoferum* increases plant leaf area? when they are fertilized with 50% of the nitrogen recommended dose, and produces a significant increase in the net assimilation rate (NAR) and the relative growth rate (RGR) in tomato plants at 71 days after planting (vegetative stage or transplant). Fruit production in the first cut resulted in greater weight and greater fruit number from the inoculated plants compared to those that were not inoculated. Additionally, the AZm5 strain significantly increased potassium concentration in the fruit; although there are no reports on this phenomenon, it is documented that cytokinins promote potassium absorption in plant tissue. The results of the experiments with AMF suggest that the colonization of tomato seedlings with a wild AMF strain responds to the presence of the AZm5 strain and increases water content and total stem biomass in the vegetative stage of seedlings. When the tomato seedlings are inoculated with the Zac 19 mycorrhizal strain the absorption of N and P is promoted while fertilized with nitrogen at 50% and phosphorus at 0% of the recommended dose; however, the co-inoculation with the AZm5 strain produces no significant differences in the growth of tomato seedlings. The effect of the AZm5 strain in the different plant growth parameters could be attributed to ACC deaminase activity, as these results are consistent with those reported in the literature, where it is mentioned that rhizobacteria strains which synthesize ACC deaminase, such as *Pseudomonas*, increase plant growth and nitrogen content in canola and wheat plants fertilized with suboptimal doses of nitrogen; also, their interaction with AMF such as *Glomus* show a synergistic effect on the growth of cucumber seedlings.

For the first time it is reported that the action mechanism that allows the AZm5 strain of *Azospirillum lipoferum* promote plant growth at low fertilization doses, is cytokinin production and ACC deaminase activity, which is related to the *acdS* gene identified in this study. Also, we suggest that the minimum dose of nitrogen chemical fertilizer needed to be used in combination with *Azospirillum* strains or with AMF in tomato plants during inoculation is of  $170 \text{ kg N ha}^{-1}$  (50% N) for greenhouse cultivation. Based on the above, this work contributes to the understanding of the action mechanisms that uses one of the most important genres recognized of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Azospirillum*; and contributes to the knowledge of mycorrhizal symbiosis and beneficial synergistic plant-microorganism interactions.

---

## INTRODUCCIÓN

Uno de los graves problemas ambientales por los que atraviesa la agricultura en México, y el de otros países del mundo, es el uso de fertilizantes químicos nitrogenados, los cuales son aplicados al suelo en grandes cantidades para obtener un mayor rendimiento en los cultivos (Socolow, 1999; Pepper *et al.*, 2006; Wang, 2009). Ante esta problemática ha sido necesario incrementar investigaciones que ayuden a integrar los procesos biológicos y ecológicos para beneficiar la producción de alimento y a minimizar el uso de recursos no renovables que causen daño al ambiente o a la salud humana. En este sentido, lograr la sostenibilidad de los sistemas agrícolas implica la necesidad de desarrollar tecnologías y prácticas alternas que no dependan enteramente de la energía fósil, que no tengan efectos adversos en el ambiente, que sean accesibles y efectivos para los productores, y que permitan mejorar y asegurar la productividad alimentaria (Pretty, 2008). Algunas de estas alternativas ha sido el uso de inoculantes microbianos, que promuevan el crecimiento y nutrición vegetal (Lugthenberg *et al.*, 2002; Vessey, 2003; Morrissey *et al.*, 2004; Berg, 2009; Lugthenberg y Kamilova, 2009).

En los últimos años, los inoculantes microbianos han sido una alternativa viable para sustituir parcialmente y en algunos casos totalmente, el uso de fertilizantes nitrogenados y fosfatados, así como para potenciar su eficiencia (Adesemoye y Kloepper, 2009; Adesemoye *et al.*, 2009). Los microorganismos que se emplean son de tipo benéfico para las plantas, ya que mejoran la tolerancia al estrés (salinidad, sequía, heladas, inundación, contaminación) y proveen resistencia a las enfermedades, favorecen la disponibilidad y absorción de agua y nutrientes (Smith *et al.*, 1999; Lugthenberg *et al.*, 2002; Morrissey *et al.*, 2004). Estos inoculantes microbianos actúan mediante mecanismos como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo y la producción de fitohormonas, sideróforos, sustancias antimicrobianas y de enzimas específicas (Glick, 1995; Glick, 2005), de las cuales, hace poco más de una década se propuso a la actividad de la enzima ACC desaminasa como uno de los mecanismos de acción más importantes en la promoción del crecimiento vegetal de plantas desarrolladas en condiciones de estrés (Glick *et al.*, 1998).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) han sido empleados como inoculantes para mantener la fertilidad del suelo y estimular el crecimiento de especies de uso agrícola, principalmente (Artursson *et al.*, 2006; Bakker *et al.*, 2007; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2008).



En comparación con los pesticidas y fertilizantes sintetizados químicamente, a los inoculantes microbianos se les han atribuido las siguientes ventajas: muestran un daño ambiental reducido y potencialmente un menor riesgo a la salud humana, ya que no son patógenos; muestran mucho mayor actividad específica por lo que son efectivos en pequeñas cantidades; se multiplican a sí mismos, pero son controlados por la planta misma; se descomponen más rápido que los pesticidas químicos convencionales; y pueden ser también usados en conjunto o integrados a sistemas de manejo de plagas (Adesemoye *et al.*, 2009; Berg, 2009).

En este contexto, la presente tesis surge de la necesidad de buscar alternativas que permitan reducir el uso de fertilizantes químicos mediante el uso de microorganismos benéficos; así mismo, su meta es entender los mecanismos de acción de algunas cepas bacterianas para promover el crecimiento de las plantas. De esta forma, se puede contribuir a la incorporación de nuevas especies microbianas para ser usadas como inóculos para un mayor número de variedades vegetales, tanto en cultivos intensivos como en ambientes desfavorables.

Este trabajo tiene su antecedente directo en el estudio de especies bacterianas promotoras del crecimiento vegetal aisladas de cultivos agrícolas regados con aguas residuales, las cuales mostraron su capacidad promotora en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*), donde la cepa AZm5 (*Azospirillum lipoferum*) ha tenido un efecto positivo (Esquivel-Cote 2002). Así, este estudio es producto del esfuerzo conjunto del conocimiento de la microbiología agrícola y la fisiología vegetal.

Por un lado, los resultados aquí descritos aportan información relevante acerca de cómo la interacción microorganismo-planta puede mejorar el crecimiento vegetal aún en condiciones desfavorables, por ejemplo cuando el suelo tiene deficiencias en nutrimentos minerales como el nitrógeno y el fósforo. Y por otro lado, describen el mecanismo de acción recientemente descubierto en uno de los principales y más importantes géneros bacterianos promotores del crecimiento vegetal: la síntesis de la enzima ACC desaminasa por *Azospirillum lipoferum*.

## CAPÍTULO I

### Antecedentes

#### 1.1 El uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal para el desarrollo sustentable de la agricultura

La agricultura sostenible es un concepto de reciente creación, que surgió como respuesta al preocupante deterioro ambiental ocasionado por la agricultura intensiva y al uso y abuso de maquinaria y agroquímicos (Pretty, 2008). Esta alternativa contempla el problema como un todo, en el que existe una dimensión social, ecológica, política y económica y contempla considerar alternativas para establecer estrategias para facilitar el desarrollo vegetal en la agricultura, la horticultura y la silvicultura. Idealmente, se busca un remplazo de los químicos que, actualmente son usados ampliamente, que puedan no solo incrementar el desarrollo vegetal, sino que puedan inhibir a fitopatógenos. Ante ello, una alternativa viable ha sido el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y de hongos micorrízicos arbusculares (Lugthenberg *et al.*, 2002; Vessey, 2003; Cárdenas-Navarro *et al.*, 2004; Morrissey *et al.*, 2004; Planes-Leyva *et al.*, 2004; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2008; Guerra-Sierra, 2008; Berg, 2009; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Rashedul *et al.*, 2009).

Actualmente, estos microorganismos son usados comercialmente, aunque de manera limitada, en diferentes países alrededor del mundo para su uso en la agricultura, la horticultura, la silvicultura y en la biorremediación ambiental (Reed y Glick, 2004; Fravel 2005). Una razón por la limitación en su uso son los resultados tan inconsistentes que se han obtenido en pruebas a nivel de laboratorio, de invernadero y de campo (Bashan, 2008). No obstante, en años recientes se ha manifestado un considerable progreso en el conocimiento de los mecanismos de acción que las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y los hongos micorrízicos arbusculares utilizan para promover el crecimiento vegetal, y con ello se ha reforzado la expectativa del uso de este tipo de microorganismos como inoculantes microbianos (Bashan, 2008; Cárdenas-Navarro *et al.*, 2004).

### 1.1.1 Fertilizantes de origen biológico

Los avances biotecnológicos actuales y la necesidad de reciclar desechos y subproductos orgánicos para solventar problemas ambientales, han generado el desarrollo de una serie de alternativas tecnológicas para la producción de abonos orgánicos de alta calidad (biofertilizantes, bioestimuladores, bionutrientes, bioactivadores, rizoremediadores) a partir del proceso de descomposición de desechos sólidos (Terry *et al.*, 2002; Vessey, 2003; Berg, 2009; Lugtenberg y Kamilova, 2009).

En este contexto, el término biofertilizante tiene varias connotaciones. Para los agricultores el biofertilizante es aquél compuesto de origen orgánico que provee a las plantas de los nutrimentos esenciales, y que es producto de la fermentación de un sustrato orgánico (animal o vegetal) por medio de la actividad de microorganismos vivos, y que además contienen microorganismos con efectos positivos sobre algunos procesos de descomposición y síntesis que ocurren en el suelo (Restrepo, 2001; Matheus 2004; Bizzozzero, 2006; Traxco, 2010). Para la comunidad científica, el biofertilizante es un inoculante microbiano, cultivos de uno o varios microorganismos que pueden ser un sustituto parcial o total de la fertilización química, ya que transforman los nutrimentos del suelo en sus formas disponibles para las plantas, tal es el caso de *Rhizobium*, *Azospirillum* y hongos micorrízicos arbusculares (Vessey, 2003; Bashan, 2008; Berg, 2009; Lugtenberg y Kamilova, 2009). Por tanto, el término “biofertilizante” es común entre los agricultores, e “inoculante microbiano” es común en la literatura científica.

### 1.1.2 Inoculantes microbianos

El inoculante microbiano es una formulación que contiene una o más cepas (o especies) de microorganismos benéficos en un acarreador (orgánico, inorgánico o sintético) de fácil uso y económico, de esta forma el inoculante es el medio de transporte microbiano desde el sitio de producción hasta la planta (Bashan, 2008).

Los microorganismos que se emplean en la elaboración de los inoculantes microbianos son promotores del crecimiento vegetal (rizobacterias u hongos micorrízicos o ambos) que originalmente viven en el suelo, aunque en bajas concentraciones, y son capaces, entre otros beneficios, de poner a disposición de las plantas una parte importante de los elementos nutritivos que éstas necesitan para su desarrollo sin afectar el equilibrio biológico del suelo. Por ejemplo, los inoculantes se elaboran a partir de microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo, productores de fitohormonas y de aquellos promotores de la elongación radical que incrementa el área de suelo explorado para obtener agua y nutrimentos (Leaungvutiviroj *et al.*, 2010).

---

De acuerdo a lo descrito, los inoculantes microbianos son uno de los elementos más viables y más usados en la agricultura sustentable (Lugthenberg *et al.*, 2002; Vessey, 2003; Planes-Leyva *et al.*, 2004; Bashan, 2008; Berg, 2009; Lugtenberg y Kamilova, 2009).

## 1.2 El uso de *Azospirillum* y hongos micorrízicos arbusculares en el desarrollo sustentable de la agricultura

### 1.2.1 *Azospirillum*

*Azospirillum* es una bacteria de vida libre que representa a uno de los géneros más efectivos y mejor caracterizados como rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000), capaz de influir en el crecimiento y producción de numerosas especies vegetales, de importancia agrícola, medicinal y ecológica (Bashan y Levanony, 1990; Puente y Bashan, 1993; Bashan *et al.*, 2004; Hartmann y Bashan, 2009). Durante los años de 1974 a 1994 se analizaron datos de experimentos en campo llevados a cabo con cepas de *Azospirillum*, y mostraron que del 60% al 70% de todos los experimentos fueron exitosos con un incremento significativo del 5% y 30% en el rendimiento de las plantas (Okon y Labandera-González, 1994). Sin embargo, también se han reportado casos donde el efecto de *Azospirillum* en el crecimiento de las plantas ha sido indiferente o hasta detrimental (Okon y Kapulnik, 1986; Okon y Hadar, 1997). En la actualidad se ha registrado muy poco del comportamiento de plantas inoculadas con *Azospirillum* cultivadas en presencia de suelo (campo o en invernadero), debido a que los estudios se han inclinado más hacia la investigación básica. En el cuadro 1.2.1 se muestran algunos ejemplos del efecto de la inoculación con cepas de *Azospirillum* sp. en diferentes cultivos.

Se ha reportado que el desarrollo de plantas inoculadas con *Azospirillum* mejora en presencia de dosis óptimas y reducidas de fertilizante nitrogenado (Kapulnik *et al.*, 1981; Bhattarai y Hess, 1998; Gadagi *et al.*, 2004; Esquivel-Cote *et al.*, 2004). En plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*), *Azospirillum* incrementa la longitud, volumen y biomasa de la raíz, número de hojas, diámetro del tallo y la biomasa de la parte aérea (Bashan, 1989; Terry *et al.*, 2005; Ribaudó *et al.*, 2006).

**Cuadro 1.2.1** Ejemplos del efecto de la inoculación con cepas de *Azospirillum* sp. en diferentes cultivos.

Cepa	Cultivo	Efecto	Referencia
<i>A. lipoferum</i> (34H)	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	Reduce la longitud de la raíz y peso seco y fresco de la parte aérea. Incrementa significativamente la absorción del ión $PO_4^-$ cuando se incrementa el ión $NH_4$ .	Murty y Ladha, 1988
<i>Azospirillum</i> spp.	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> ) y sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> )	Incrementa el peso seco de la planta entera (14.7%), y N total en granos de sorgo (2.14%). Sin efecto en el rendimiento de granos de arroz.	Pereira <i>et al.</i> , 1988
<i>A. lipoferum</i> (ICM 1001)	Cacahuete ( <i>Arachis hypogaea</i> )	Incrementa el peso seco de los nódulos (31%-70%), contenido de N (10.4%-13%) y el rendimiento de vainas (23.5%-24.6%).	Raverkar y Konde, 1988
<i>A. lipoferum</i>	Maíz ( <i>Zea mays</i> )	Incrementa el desarrollo del sistema radical.	Arsac <i>et al.</i> , 1990
<i>A. brasilense</i> (Cd)	Garbanzo ( <i>Cicer arietinum</i> )	Promueve el crecimiento de la raíz y parte aérea.	Del Gallo y Fabbri, 1990
<i>A. brasilense</i>	Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> )	Incrementa la biomasa seca, crecimiento del área foliar y rendimiento en grano; demora la senescencia de las plantas.	Sarig <i>et al.</i> , 1988
<i>Azospirillum</i> spp.	Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Mercurio)	Cinco cepas incrementaron la producción de materia seca en parte aérea (35%-65.8%) y raíz (45.45%-63.63%).	Villarreal-Romero, 1990
<i>A. lipoferum</i>	Girasol ( <i>Helianthus annuus</i> )	Incrementa el crecimiento vegetal.	Fages y Arsac, 1991
<i>Azospirillum</i> spp.	Espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> ), Col de china ( <i>Brassica chinensis</i> ), Pepino ( <i>Cucumis sativus</i> )	Promueve el desarrollo de raíces y de hojas. Aunque la promoción del desarrollo de raíces y hojas fue insignificante. Incrementa el peso fresco de hojas y tallos.	Gamo y Ahn, 1991
<i>A. brasilense</i> (Az39-INTA)	Pino australiano ( <i>Casuarina cunninghamiana</i> )	Incrementa la producción de biomasa de la planta completa (18%), parte aérea (18%) y raíz (17.7%), y el contenido de N total de parte aérea.	Rodríguez-Barrueco <i>et al.</i> , 1991
<i>A. brasilense</i> (Cd y Sp245)	Cardón ( <i>Pachycereus pringlei</i> )	La cepa Cd inhibe la germinación de las semillas, Sp245 incrementa significativamente la germinación. Ambas cepas promovieron la altura, diámetro, volumen y relación volumen/superficie de la parte aérea.	Puente y Bashan, 1993
<i>A. lipoferum</i>	Maíz ( <i>Zea mays</i> )	Produce el doble de semillas por espiga, incrementa el peso seco de la semilla del 59%, promueve el crecimiento de la raíz	Fulchieri y Frioni, 1994
<i>A. brasilense</i>	Maíz ( <i>Zea mays</i> )	Incrementa el rendimiento de maíz del 11% al 14%, empleando bajas dosis de fertilizante nitrogenado.	Fallik y Okon, 1996
<i>A. brasilense</i>	Haba ( <i>Vicia faba</i> )	Incrementa significativamente el contenido total de N en la etapa de floración, la acumulación de materia seca de raíz (>30%) y parte aérea, así como la actividad de la nitrogenasa en nódulos.	Rodelas <i>et al.</i> , 1996

**Cuadro 1.2.1** Ejemplos del efecto de la inoculación con cepas de *Azospirillum* sp. en diferentes cultivos (continuación).

Cepa	Cultivo	Efecto	Referencia
<i>Azospirillum</i> spp. (OAD-2)	Flor de tipo anual y perenne ( <i>Gaillardia pulchella</i> )	Incrementa el contenido de N de las plantas con una fertilización media de N (150 kg N ha <sup>-1</sup> )	Gadagi <i>et al.</i> , 2004
<i>A. brasilense</i> (Cd)	Garbanzo ( <i>Cicer arietinum</i> )	Incrementa el peso seco de nódulos (90%) y el rendimiento de semillas (99%).	Hamaoui <i>et al.</i> , 2001
<i>A. brasilense</i> (VS9)	Jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Incrementa la longitud, peso fresco y seco del tallo y la raíz, acelera la aparición de racimos florales.	Urzúa, 1997; Urzúa, 2001
<i>A. brasilense</i> (VS9)	Jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Promueve el crecimiento de la parte aérea, a los 70 días después de la siembra, en un cultivo hidropónico.	Esquivel-Cote, 1997; Esquivel-Cote, 2002
<i>A. lipoferum</i> (VS1)	Jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Incrementa la producción de frutos (16%), respecto al testigo, en un cultivo en campo, con la reducción del 50% del fertilizante químico nitrogenado.	Esquivel-Cote <i>et al.</i> , 2004
<i>A. brasilense</i> (Cd)	Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	Incrementa la cantidad de varios los pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores	Bashan <i>et al.</i> , 2005
<i>A. brasilense</i> (Sp245)	Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	Induce el incremento de fosfolípidos en la raíz, lo que contribuyó a la protección de las plantas contra el estrés hídrico.	Pereyra <i>et al.</i> , 2006
<i>Azospirillum</i> spp.(B510)	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	Induce la resistencia a enfermedades provocadas por fitopatógenos como <i>Magnaporthe oryzae</i> y <i>Xanthomonas oryzae</i> .	Yasuda <i>et al.</i> , 2009
<i>A. brasilense</i> (Sp245)	Pepino ( <i>Cucumis sativus</i> )	Induce la elasticidad de las células de la la pared celular de hipocótilos, e incrementó el flujo de agua apoplástica, lo que provocó incrementos significativos en el crecimiento de las plantas	Pereyra <i>et al.</i> , 2010
<i>A. brasilense</i>	Orégano ( <i>Origanum x majoricum</i> )	Induce la síntesis de monoterpenos (aceite esencial) y el incremento en la producción de biomasa y en el peso seco de la raíz.	Banchio <i>et al.</i> , 2010

### 1.2.2 Hongos micorrízicos arbusculares

La mayoría de las plantas de interés agronómico como el cacao, café, coco, algodón, cebolla, ajo, yuca, papa, cítricos, todas las leguminosas y gran en parte de los cereales forman simbiosis micorrízica. Sin embargo, no todas estas especies, dependen de la misma manera de la simbiosis para su crecimiento. Plantas con altos grados de dependencia a la simbiosis micorrízica tienen menores sistemas radicales, menor plasticidad en la relación raíz-vástago y desarrollan muy pocos pelos radicales en suelos de baja fertilidad. En este tipo de suelo, las plantas dependientes de la micorriza reducen el costo metabólico para desarrollar sistemas radicales magnoloides, que son menos capaces de absorber nutrientes y de este modo crean alta dependencia a la simbiosis micorrízica (Alarcón, 2007, Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2008).

Es indispensable que en la producción de inoculantes micorrízicos, la calidad de éste se evalúe constantemente con el fin de evitar microorganismos patógenos y de monitorear su capacidad infectiva y efectiva de diferentes hospederos. Los hongos micorrízicos arbusculares deben considerarse como parte de los ecosistemas y como elementos primordiales que contribuyen a la estabilidad del mismo, participando como puentes entre los diversos hospederos, influyendo así junto con otros microorganismos, a la adquisición de nutrientes como N y P, y al control de hongos fitopatógenos, tales como *Aphanomyces*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinium*, *Verticillium* y *Thielaviopsis*, y varios nemátodos (Harrier y Watson, 2004; Alarcón 2007; Ferrera-Cerrato y Alarcón 2008; Adesemoye *et al.*, 2009).

### 1.2.3 Co-inoculación con *Azospirillum* y hongos micorrízicos arbusculares

El uso combinado de *Azospirillum* y hongos micorrízicos arbusculares ha mostrado en varios cultivos de interés agrícola que incrementan significativamente el crecimiento vegetal y el contenido de C, P y N total de la planta; resultados que han motivado la sustitución de fertilizantes parcial e incluso totalmente por la biofertilización con estos microorganismos (Linderman, 1992; Veeraswamy *et al.*, 1992). Así mismo, se ha documentado que el efecto sinérgico de *Azospirillum* y hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento vegetal, incrementa cuando éstos microorganismos se aplican en consorcio con otros microorganismos promotores del desarrollo vegetal, como *Rhizobium*, *Bacillus* o *Pseudomonas* (Berg, 2009). En el cuadro 1.2.3 se muestra algunos ejemplos del efecto de la co-inoculación de plantas con hongos micorrízicos arbusculares y cepas de *Azospirillum* sp., y en algunos casos, la incorporación de otro microorganismo.

**Cuadro 1.2.3** Algunos ejemplos del efecto de la co-inoculación de plantas con hongos micorrízicos arbusculares y cepas de *Azospirillum* sp., y en algunos casos la incorporación de otro microorganismo.

Microorganismos	Cultivo	Efecto	Referencia
<i>Azospirillum</i> spp. <i>Glomus</i> spp.	Maíz ( <i>Zea mays</i> )	Incrementan el contenido de N y P en la biomasa total de la planta	Barea <i>et al.</i> , 1983
<i>Azospirillum brasilense</i> <i>Glomus intraradix</i>	Jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Incrementan la biomasa total de la planta y la longitud de la raíz.	González-Salmerón, 2001
<i>A. brasilense</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Glomus aggregatum</i>	Palmerosa ( <i>Cymbopogon martinii</i> )	Incrementan la biomasa total de la planta, el contenido de P y el porcentaje de colonización micorrízica.	Ratti <i>et al.</i> , 2001
<i>A. brasilense</i> <i>Glomus intraradix</i>	Tomate verde ( <i>Physalis ixocarpa</i> )	Presentan efectos positivos en la tasa fotosintética, incrementos en la absorción de N en tejido foliar, incrementos en la acumulación de materia seca y rendimiento de frutos..	Velasco <i>et al.</i> , 2001
<i>Azospirillum brasilense</i> (V57) <i>Glomus claroideum</i>	Papaya ( <i>Carica papaya</i> )	Incrementan la biomasa total de la planta, el área foliar, el porcentaje de colonización del HMA y en la actividad de las fosfatasa ácidas. Sin embargo, no modificaron los contenidos de clorofila en hojas.	Alarcón <i>et al.</i> , 2002
<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Glomus clarum</i>	Jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Mejoran el estado nutricional de las plantas, incrementan la producción de frutos con buena calidad bromatológica.	Terry <i>et al.</i> , 2005
<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Glomus intraradice</i>	Maíz ( <i>Zea mays</i> )	Favorecen la altura, área foliar y rendimiento en plantas fertilizadas con dosis mínimas de N, P, K.	Uribe y Dzib, 2006
<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Glomus manihotis</i> , <i>Glomus occultum</i>	Melina ( <i>Gmelina arborea</i> )	Incrementaron germinación de esporas de los HMA y la colonización micorrízica, así como la altura de la planta.	Zambrano y Díaz, 2008
<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Glomus intraradices</i>	Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> )	Incrementan la altura de la planta y rendimiento de grano.	Díaz-Franco <i>et al.</i> , 2008
<i>Azospirillum lipoferum</i> <i>Pseudomonas mendocina</i> Palleroni <i>Glomus intraradices</i>	Lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> )	Incrementan el contenido de potasio, fósforo y agua foliar en condiciones sequía y con altas concentraciones de CO <sub>2</sub> .	Alguacil <i>et al.</i> , 2009



### 1.3 Importancia económica del jitomate en México y el mundo

El jitomate o tomate rojo (*Solanum lycopersicum* (Spooner *et al.*, 2011), antes de 2010 clasificado como *Lycopersicon esculentum* Mill.) pertenece a la familia Solanaceae, la cual comprende a muchos de los géneros de plantas de los cultivos más importantes, incluyendo las papas y las berenjenas. Es originario de América del Sur en variedades silvestres; sin embargo, en varios tratados se considera a México como el centro de domesticación del cultivo al ser utilizado como alimento cotidiano dentro de la dieta de sus habitantes (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995). La comercialización y difusión lograda a través del tiempo, han hecho que pase a formar parte de la dieta de diversas culturas en el mundo. De hecho, a nivel internacional, las hortalizas junto con las frutas, ocupan el segundo lugar de los productos agropecuarios, apenas superadas por los cereales, siendo la papa y el jitomate, las dos hortalizas que contribuyen con el 50% de la producción en el mundo. La producción mundial de jitomate (tanto fresco como procesado) alcanzó 108 millones de toneladas en el año 2002. La mayor parte de la producción se concentró en Asia, región que contribuyó con el 50% de la producción del 2002 (FAS/USDA, 2003). Los principales países productores (millones de toneladas) de jitomate son: China (20), Estados Unidos (10), India (8), Turquía (7), Egipto (7), Italia (6), España (5), Brasil (3), Irán (3) y México (2) (USDA/FAS, 2007).

En México, el jitomate está considerado dentro de las principales hortalizas que se producen; ya que su producción se extiende a un gran número de estados. Se estima que para el año agrícola 2008 abarcó a un total de 27 entidades federativas, tanto del norte, centro y sur de la nación. Pese a esta enorme diversidad podemos señalar que tan solo siete estados concentraron más del 60% tanto de producción, de superficie cosechada y sembrada: Sinaloa, Baja California, San Luis Potosí, Jalisco, Michoacán, Morelos y Nayarit, siendo el método de siembra por almácigo el que predomina en todo el país (SIAP, 2010). Es una de las especies hortícolas de gran importancia tanto económica como social; debido principalmente por un lado, al valor que tiene la producción (en 2008 se obtuvo una producción de 2,936,773 de toneladas, en un área de 101,784 ha cosechadas (FAO, 2010)); y por el otro, a la demanda de mano de obra que genera. Se estima que para la producción de 75,000 ha de jitomate se emplean alrededor de 172 mil trabajadores de campo (ASERCA, 1995).

En los últimos tres años, la exportación anual de jitomate registró un crecimiento promedio cercano al 10 por ciento; en 2009 se cultivaron 53 mil hectáreas en las que se obtuvo una producción de 2.3 millones de toneladas, de las cuales el 50 por ciento se destinó al mercado de exportación. No obstante, la superficie total sembrada de jitomates en México ha mostrado una tendencia a decrecer año con año, desde 85,000 hectáreas en 1990 a 75,000 en el 2000, y unas 58,300 en 2010. A pesar de ello, los rendimientos promedio de producción se

han incrementado debido a los avances tecnológicos y al uso de agricultura protegida, pasando de 23 t/ha en 1990 a 39 t/ha en 2010. En México se estima una producción de 2.2 millones de toneladas para la temporada 2010/11, asumiendo condiciones meteorológicas favorables y buenos precios internacionales. Por tanto, el jitomate es la hortaliza que genera la mayor cantidad de divisas al país con un promedio de mil 200 millones de dólares anuales. El año pasado (2009), tal como ha ocurrido en los últimos ciclos anuales, el crecimiento de la producción de esta hortaliza fue de alrededor del tres por ciento en relación al año anterior (incluye cielo abierto y agricultura protegida); dada la tendencia observada en el mercado del jitomate se espera que el aumento de la producción continúe (SIAP, 2010).

### 1.3.1 Dosis de fertilizante empleadas en el cultivo de jitomate en la República Mexicana

No obstante que el jitomate es uno de los cultivos más importantes en todo el mundo, para su cultivo intensivo, como muchos otros, los agricultores requieren de agroquímicos, y en la mayoría de los casos en dosis excesivas, como pesticidas y fertilizantes químicos, los cuales han provocado: resistencia de las plantas a plagas y patógenos, contaminación del ambiente y riesgos a la salud humana (PRODUCE-Michoacán, 2009). En México el uso de estos agroquímicos no está regulado, por ejemplo, respecto a las dosis de fertilizante químico nitrogenado, existe una enorme variación en las cantidades recomendadas, las cuales tienden a ser elevadas en el norte del país (Cuadro 1.3.1).

**Cuadro 1.3.1** Dosis de fertilizante químico empleado en el cultivo de jitomate, en la República Mexicana.

Estado	N (kg ha <sup>-1</sup> )	P (kg ha <sup>-1</sup> )	K (kg ha <sup>-1</sup> )	Referencia
Culiacán	450	150-400	200-225	Faxsa, 2003
Ensenada	300	n.d	n.d	Faxsa, 2003
Morelos	150	60	00	Morita y Galván, 1999
Nayarit	150	50	50	FUPRONAY, 2008
San Luis Potosí	180	90	00	INIFAP-San Luis Potosí, 2010
Sonora	150	150	150	Morita y Galván, 1999
Zacatecas	180	60	60	INIFAP-Zacatecas, 2008

n.d.=no determinado

## 1.4 Fertilizantes químicos

Los fertilizantes químicos son productos sintéticos desprovistos de materia orgánica que contienen en forma disponible uno o más de los 16 elementos nutritivos esenciales para el crecimiento y desarrollo vegetal (Hill y Kolb, 1999). Sin embargo el abuso de estos productos ha causado un impacto desfavorable en el ambiente (Pepper *et al.*, 2006).

### 1.4.1 Uso de fertilizantes químicos

A la llegada de la “Revolución Verde” (1940-1970) , se desarrollaron tecnologías modernas para favorecer una mayor producción de cereales en menor área, ya que los suelos naturales eran y son incapaces de brindar la cantidad suficiente de nutrientes para sostener cultivos intensivos y, en la mayoría de las veces, monocultivos. En México, la “Revolución Verde” se presentó como una vía para la modernización del país y en específico del espacio rural (Pichardo-González, 2006). No obstante, esta nueva estrategia provocó una disminución en la fertilidad de los suelos, debido principalmente a las excesivas prácticas de cultivo, como el uso de maquinaria, y a la pérdida del suelo por erosión, es decir, pérdida de la cobertura vegetal natural, y por la contaminación ocasionada por el abuso en la aplicación de agroquímicos, tales como plaguicidas, fungicidas, herbicidas y fertilizantes químicos, los cuales también generaron estragos en la salud humana (Torres y Capote, 2004; Pepper *et al.*, 2006).

### 1.4.2 Fertilizantes químicos nitrogenados

En el campo, el nitrógeno (N) es aplicado al suelo principalmente en forma de fertilizante amoniacal, el cual es producido por el proceso de Haber-Bosch, una reacción que energéticamente es muy costosa, ya que se requieren 16 moléculas de ATP por cada molécula de  $N_2$  que es reducida a  $NH_3$ ; comparativamente, la fijación de una molécula de  $CO_2$  consume sólo 3 moléculas de ATP (Marschner, 1995; Smil, 2001; Taiz y Zeiger, 2002; Mulvaney *et al.*, 2009).

A partir de la “Revolución Verde” una enorme cantidad de fertilizante químico nitrogenado ha sido aplicado a los cultivos cada año para alimentar a los cerca de 6.5 billones de personas que existen actualmente en todo el mundo, donde, el consumo de estos agroquímicos se ha incrementado dramáticamente de  $11.6 \text{ Tg ha}^{-1}$  en 1961 a  $104 \text{ Tg ha}^{-1}$  en 2006 por área cultivable (FAO, 2009). En 2007/2008 se usaron, aproximadamente, 128 millones de toneladas, de los cuales el 65% fue utilizado para la producción de cereales (FAO, 2006). La aplicación de fertilizantes nitrogenados al cultivo de los cereales asegura el incremento del rendimiento; sin embargo, su uso es generalmente muy ineficiente, ya que sólo el 33% del total de N aplicado es utilizado eficientemente por la planta (Raun y Johnson, 1999). Tal eficiencia se ha estimado en tan solo del 33 al 36% para la producción de cereales a nivel global (Ladha *et al.*, 2005).

El remanente del N es perdido por derrame en la superficie, por volatilización a la atmósfera, por la desnitrificación microbiana, y principalmente por lixiviación en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Una proporción muy importante del N aplicado al suelo es perdida por esta última causa. El  $\text{NO}_3^-$  es un compuesto altamente soluble en agua, es de 10 a 100 veces más móvil que el  $\text{NH}_4^+$ , y regularmente se encuentra en concentraciones por arriba de lo permitido ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ), según la Environmental Protection Agency, EPA (Malleville y Chambolle, 1990), lo cual ha provocado serios problemas de salud, ambientales y económicos.

De acuerdo con Estrada-Botello y colaboradores (2007), las pérdidas de N por lixiviación varían ampliamente, de 4 a  $138 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ , lo cual depende de la dosis de fertilizante aplicado y de la capacidad de drenaje que tenga el suelo. El  $\text{NO}_3^-$  lixiviado es incorporado a aguas subterráneas, o bien, arrastrado hacia los cauces y reservorios superficiales, donde pueden actuar como fertilizantes de la vegetación acuática, aunque si se concentran, puede originarse la eutrofización del medio. En un medio eutrofizado, se produce la proliferación de especies como algas y otras plantas verdes que cubren la superficie. Esto trae como consecuencia un elevado consumo de oxígeno y su reducción en el medio acuático, así mismo dificulta la incidencia de la radiación solar por debajo de la superficie. Estos dos fenómenos producen una disminución de la capacidad depuradora del medio y provocan una disminución en la capacidad fotosintética de los organismos acuáticos (CICEANA, 2009). Así mismo, los altos niveles de nitratos adicionados a los acuíferos subterráneos provocan problemas graves de salud si se consume agua rica en nitratos, debido a su transformación en nitritos por participación de bacterias existentes en el estómago y vejiga urinaria. A su vez los nitritos se transforman en compuestos carcinógenos (nitrosaminas), que afectan al estómago e hígado (Ward, 2009).

En el suelo, las tasas de mineralización del N se incrementan significativamente en suelos fertilizados comparados con aquellos no fertilizados, lo que indica un cambio sustancial en la composición de microorganismos heterótrofos del suelo (Mulvaney *et al.*, 2009), además el incremento de la deposición del N biológicamente disponible, modifica la composición de la comunidad de las plantas, reduce la diversidad de los ecosistemas, altera las tasas y las rutas del ciclo del N, y hace más vulnerables a las plantas a las enfermedades por insectos y fitopatógenos (Eatough Jones *et al.*, 2008).

### 1.4.3 Fertilizantes químicos fosfatados

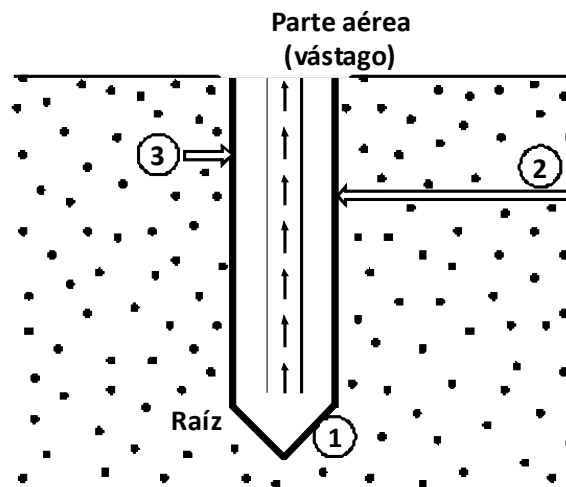
En muchos ecosistemas, los niveles de fósforo (P) disponible para las plantas están en condiciones limitantes para su desarrollo, debido a que más del 90% del P del suelo se encuentra fijado y no puede ser asimilado por las plantas, lo cual tiene un importante impacto en la agricultura, particularmente en las regiones donde se practica la agricultura intensiva (Vance *et al.*, 2003). Por tanto, ha sido necesario compensar el déficit de P en el suelo con grandes cantidades de fertilizantes fosfatados provenientes de rocas fosfóricas (fosforita en forma de apatitas,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  principalmente, un recurso limitante (Fassbender y Bornemisza, 1987; Maathuis, 2009). Sin embargo, los fertilizantes fosfatados solubles son rápidamente fijados al suelo, por lo que las dosis que se manejan para aplicar a los cultivos son excesivas, incrementando así el riesgo de acidificación y ensalitramiento del suelo (Arcand y Schneider, 2006).

## 1.5 Importancia del nitrógeno y fósforo en la nutrición vegetal

Las plantas, además de la luz, el agua y el  $\text{CO}_2$ , requieren de catorce elementos esenciales o nutrimentos. La raíz es el órgano de la planta responsable, entre otras funciones, de llevar a cabo la nutrición mineral, donde el xilema es la vía principal por la cual los nutrimentos son transportados hacia el vástago (parte aérea) de la planta. La cooperación entre xilema y floema son indispensables para asimilar los nutrimentos y cubrir las necesidades de la planta (Jeschke y Hartung, 2000).

El nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), fósforo (P) y azufre (S) están presentes en el tejido vegetal en relativamente grandes cantidades (>0.1% de biomasa) por lo que se les considera macronutrimentos (Marschner, 1995), y usualmente, están presentes en pequeñas concentraciones en el suelo, por lo que necesitan ser acumulados en contra de fuertes gradientes de concentración. En contraste, los micronutrimentos u oligoelementos: boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni) y zinc (Zn), son requeridos por las plantas en cantidades muy pequeñas que oscilan entre 0.01 a 0.5 ppm y generalmente se encuentran en bajas cantidades en el suelo (Ammann y Blatt, 2009; Maathuis, 2009). Los minerales son tomados por las raíces de las plantas a partir de la solución del suelo en formas iónicas con los metales  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{K}^{+}$  presentes como cationes libres, el P y el S como fosfato oxianiónico ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) y sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) y el N como nitrato aniónico ( $\text{NO}_3^{-}$ ) o el catión amonio ( $\text{NH}_4^{+}$ ) (Maathuis, 2009).

Los nutrientes se mueven a través de las partículas de suelo hacia la superficie de la raíz mediante tres fenómenos: a) **Intercepción de la raíz**: las raíces proliferan a través del suelo, moviéndose dentro de los espacios ocupados previamente por partículas de suelo, como las arcillas, que contienen los nutrientes disponibles; b) **Flujo de masa**: de agua y nutrientes disueltos hacia la superficie de la raíz, los cuales son impulsados por transpiración; y c) **Difusión**: se basa en los coeficientes de difusión efectiva de los nutrientes, calculada entre la absorción total por las plantas y la suma de las cantidades suministradas por la intercepción de la raíz junto con el de flujo de masa, y es el principal mecanismo por el cual el escaso P y K del suelo son absorbidos por las plantas (Figura 1.5) (Marschner, 1995).



**Figura 1.5** Representación esquemática del movimiento de elementos minerales hacia la superficie de la raíz de plantas crecidas en suelo. (1) Intercepción de la raíz: el volumen del suelo es reemplazado por el volumen de raíz; (2) Flujo de masa: transporte de la solución del suelo a lo largo del gradiente de potencial del agua (impulsados por transpiración); y (3) Difusión: el transporte de nutrientes a través de un gradiente de concentración. ● = Nutriente disponible (Tomado de Marschner, 1995).

### 1.5.1 Nitrógeno

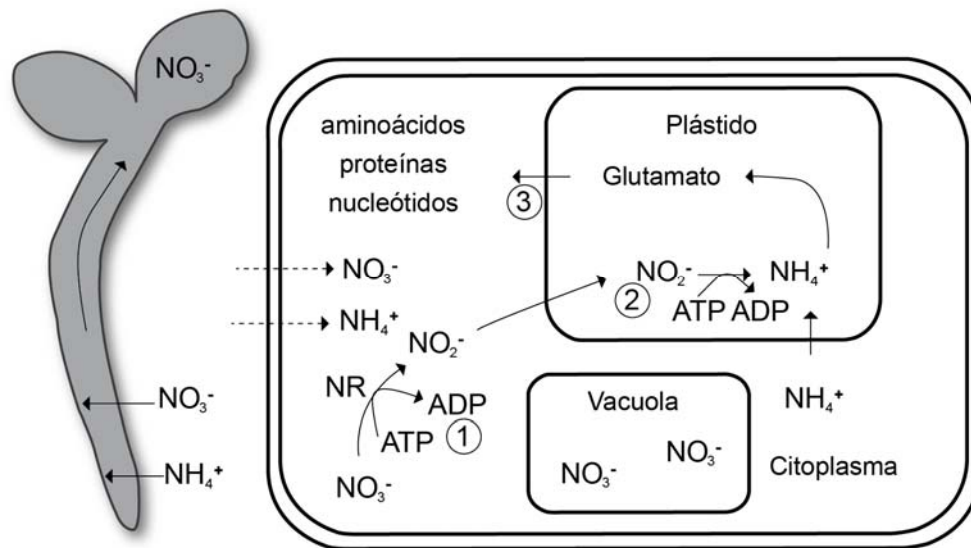
La cantidad de N en los suelos minerales es bastante pequeña, variando desde trazas hasta 0.5% en los suelos superficiales y disminuyendo con la profundidad. La cantidad de N depende también del tipo de suelo, de la temperatura y la precipitación pluvial. El clima juega un papel dominante en la determinación del estado de nitrógeno de los suelos. En regiones de condiciones de humedad uniforme y vegetación comparable, el contenido promedio de N y de materia orgánica del suelo decrece exponencialmente a medida que aumenta la temperatura anual (Fassbender y Bornemisza, 1987).

Las formas en las cuales el N es absorbido por las plantas dependen de las condiciones del suelo y de la planta (Marschner, 1995; Miller y Cramer, 2008). En general, las plantas adaptadas a pH ácidos y a condiciones reducidas del suelo absorben N en forma de  $\text{NH}_4^+$ . En suelos con pH alcalinos y en condiciones aeróbicas el N es absorbido como  $\text{NO}_3^-$ , el cual es muy móvil en el suelo, en contraste con los compuestos orgánicos de N, como los aminoácidos, que son muy poco móviles (Maathius, 2009).

#### *1.5.1.1 Asimilación y funciones biológicas*

El N es el elemento nutritivo más importante en la nutrición vegetal. Su función principal es proveer de grupos amino y de nucleótidos para la síntesis de aminoácidos y de ácidos nucleicos, respectivamente, los cuales son constituyentes indispensables de las estructuras celulares básicas de plantas y animales (Marschner, 1995; Taiz y Zeiger, 2002). Los nucleótidos además, tienen muchas funciones importantes: a nivel celular participan en la homeostasis energética, la señalización y regulación de proteínas. Por otro lado, el N es esencial en la bioquímica de muchos componentes no protéicos como las co-enzimas, pigmentos fotosintéticos, metabolitos secundarios y poliamidas (Marschner, 1995; Maathius, 2009).

El N es asimilado por la planta en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) principalmente, y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Las enzimas responsables para asegurar que el  $\text{NO}_3^-$  sea convertido a amonio son: la nitrato reductasa y la nitrito reductasa. La reducción del nitrato puede tomar lugar tanto en las raíces como en el vástago de las plantas, sin embargo a nivel celular la reducción se da espacialmente por separado: la reducción del nitrato se lleva a cabo en el citoplasma y la reducción del nitrito ocurre en los cloroplastos (Figura 1.5.1.1). Después que las plantas toman los nutrientes del suelo éstos son asimilados e incorporados inmediatamente en compuestos orgánicos o distribuidos dentro de la planta para almacenarlo en sus diferentes tejidos (Marschner, 1995; Maathius, 2009).



**Figura 1.5.1.1** El nitrógeno es absorbido por las plantas predominantemente en forma inorgánica ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ ). Los transportadores de  $\text{NO}_3^-$  y de  $\text{NH}_4^+$  son codificados por una serie de genes de las familias NRT y AMT, respectivamente. Mucho de la reducción y asimilación del  $\text{NO}_3^-$  ocurre en la parte aérea. El primer paso reductivo (1) ocurre en el citoplasma mediante la enzima nitrato reductasa (NR) y el  $\text{NO}_2^-$  es posteriormente reducido a  $\text{NH}_4^+$  dentro de los cloroplastos; (2) el N es asimilado en forma del aminoácido glutamato. El N excedente es almacenado típicamente en la vacuola central como  $\text{NO}_3^-$  (Tomado de Maathius, 2009).

### 1.5.1.2 Síntomas de deficiencia de N en plantas

La deficiencia de N en plantas inhibe rápidamente el desarrollo vegetal. Muchas especies muestran clorosis (amarillamiento de las hojas), especialmente en hojas viejas cercanas a la base de la planta. En severas condiciones de deficiencia de N, las hojas llegan a ser completamente amarillas, las cuales posteriormente llegan a caer. Inicialmente, las hojas jóvenes pueden no tener síntomas de deficiencia, debido a que el N puede ser mineralizado desde las hojas viejas. Cuando la deficiencia se desarrolla lentamente, las plantas pueden tener con frecuencia tallos con apariencia leñosa y marcadamente delgados. Esta consistencia puede deberse a una acumulación excesiva de carbohidratos, que no fueran usados en el metabolismo del N (síntesis de aminoácidos u otros compuestos nitrogenados) y los cuales pudieran ser utilizados en la síntesis de antocianinas, permitiendo así la acumulación de estos pigmentos. Esta condición se aprecia como una coloración púrpura en las hojas, peciols y tallos de algunas plantas deficientes de N, tal como ocurre con las plantas de jitomate y de maíz (Taiz y Zeiger, 2002; Urrestarazu, 2004).



### 1.5.2 Fósforo

El contenido total de P en los suelos es relativamente bajo. En suelos minerales de áreas templadas, el contenido de P total varía entre 0.02 y 0.08% (200 a 800 mg kg<sup>-1</sup>) y en promedio gira alrededor de 0.05% (500 mg kg<sup>-1</sup>) y disminuye con la profundidad del suelo. El P es relativamente estable en los suelos. Así como el N y el azufre, el P permanece en el suelo en su forma oxidada, como fosfatos (orgánicos e inorgánicos), los cuales presentan una gran estabilidad que resulta en una baja solubilidad, lo que a veces causa deficiencias en la disponibilidad de P para las plantas (Fassbender y Bornemisza, 1987).

#### 1.5.2.1 Asimilación y funciones biológicas

El P es uno de los mayores macronutrientes de todos los organismos, se emplea en múltiples funciones, es un elemento estructural clave en ácidos nucleicos, fosfolípidos y varias enzimas y coenzimas. Está involucrado en el metabolismo energético (formación de puentes de anhídrido éster en el ATP), en la activación de intermediarios metabólicos, en la cascada de señales de transducción y en la regulación de enzimas. Por tanto, es esencial para la vida tener una fuente segura de P para mantener la homeostasis celular (Marschner, 1995; Taiz y Zeiger, 2002; Urrestarazu, 2004).

Las plantas absorben el P en forma de ácido fosfórico; no obstante, éste se encuentra en cantidades muy pequeñas en la solución del suelo. De acuerdo con las constantes de disociación del ácido fosfórico, en la solución del suelo, el P se encuentra como ortofosfatos (iones H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>), entre pH de 2 y 7, y como iones HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, entre pH de 7 y 12, por lo que en la mayor parte de los suelos las plantas absorben el P de la solución del suelo en forma de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>; sin embargo, tanto los iones H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> como los HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> forman complejos (cristalinos o amorfos) con cationes, tales como fosfato monocálcico (Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), fosfato dicálcico (CaHPO<sub>4</sub>), fosfatos aluminicos (AlPO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O), y fosfatos férricos o ferrosos (Fe<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O, Fe<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O), los cuales los hacen no disponibles para las plantas, en un fenómeno llamado fijación del P. En moléculas orgánicas, el P se encuentra principalmente unido a grupos hidroxilo de azúcares y alcoholes, a través de una esterificación (Marschner, 1995); también como lecitina y fitato, éste último puede contar con más del 50% del P orgánico total del suelo (Fassbender y Bornemisza, 1987, Brinch-Pedersen *et al.*, 2002; Javot *et al.*, 2007; Maathuis, 2009).

Debido a lo anterior y a que las tasas de absorción del P para el desarrollo de la raíz son mucho más altas que las tasas de difusión en el suelo, se crea una zona de reducción de P a nivel del sistema radical que, consecuentemente, limita la disponibilidad de P para las plantas (Marschner, 1995; Smith y Read, 1997). Éstas han desarrollado estrategias que involucran varias modificaciones fisiológicas para contrarrestar la escasez de P: a) incrementar la interfase raíz-suelo para maximizar el acceso al Pi disponible. Varias especies de plantas forman las llamadas raíces protoideas, en el caso de la deficiencia de P, y se caracterizan por la formación de un grupo de raíces laterales muy finas, que no solo incrementan el volumen de suelo invadido sino que también b) producen fosfatasas y exudan grandes cantidades de sustancias quelantes en forma de ácidos orgánicos, tales como ácido málico y succínico, que compiten con complejos P-cación y disuelven así los fosfatos de calcio solubles, los cuales también se consideran como otra estrategia para incrementar la absorción de P del suelo, y finalmente, c) las plantas forman simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares (Javot *et al.*, 2007; Maathuis, 2009).

### 1.5.2.2 Síntomas de deficiencia de P en plantas

Para un desarrollo óptimo la planta requiere del P en un rango de 0.3 a 0.5 % de su peso seco total durante su estado vegetativo de desarrollo. En condiciones de deficiencia de P, se da una liberación de Pi de las vacuolas provocando un desarrollo retardado de las plantas, con cambio de color en las hojas (Marschner, 1995), que va de un verde oscuro apagado hasta un color rojizo o púrpura característicos, y posteriormente llegan a secarse. Además, el número de brotes disminuye, formando tallos finos y cortos con hojas pequeñas, presentan una disminución en el desarrollo radicular y menor floración y maduración de los frutos (Urrestarazu, 2004).

## Literatura citada

Adesemoye A.O. y Kloepper J.W. 2009. Plant interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1-12.

Adesemoye A.O., Torbert H.A. y Kloepper J.W. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol* 58: 921-929.

Alarcón A. 2007. Micorriza arbuscular. En: Ferrera-Cerrato y Alarcón A. *Microbiología Agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. pp. 90-119. Trillas S.A. de C.V. México, 568 pp.

Alarcón A., Davies F.T.Jr., Egilla J.N., Fox T.C., Estrada-Luna A.A. y Ferrera-Cerrato R. 2002. Short effects of *Glomus claroideum* and *Azospirillum brasilense* on growth and acid phosphatase activity of *Carica papaya* L. under phosphorus stress. *Rev. Latinoam Microbiol* 44: 31-37.

---

Alguacil M. del M., Kohler J., Caravaca F. y Roldán A. 2009. Differential effects of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* on lettuce plants physiological response and aquaporin PIP2 gene expression under elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and drought. *Microb Ecol* 58: 942-951.

Amtmann A. y Blatt M.R. 2009. Regulation of macronutrient transport. *New Phytol* 181: 35-52.

Arcand M.M. y Schneider K.D. 2006. Plant-and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 78: 791-807.

Arsac J.F., Lamonthé C., Mulard D. y Fages J. 1990. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacteria concentration. *Agronomie* 10: 640-654.

Artursson V., Finlay R.D. y Jansson J.K. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ Microbiol* 8: 1-10.

ASERCA. 1995. El jitomate mexicano: complemento del mercado estadounidense. *Claridades Agropecuarias*. pp. 3-21.

Bashan Y. 2008. Prólogo. En: Díaz-Franco A. y Mayek-Pérez N. (Coord.) *La biofertilización como tecnología sustentable*. pp. 17-23. Plaza y Valdés, S.A. de C.V., México.

Bashan Y., Bustillos J.J., Leyva L.A., Hernández J.P y Bacilio M. 2005. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biol Fertil Soils* 42: 279-285.

Bashan Y., Holguin G. y de-Bashan L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol* 50: 521-577.

Bashan, Y., H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* is a challenge for agriculture. *Can J Microbiol* 36: 591-608.

Bashan Y. 1989. Nonespecific responses in plant growth yield and root colonization of noncereal crops plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Can J Bot* 67: 1317-1324.

Bakker P.A.H.M., Raaijmakers J.M., Bloemberg G.V., Hofte M., Lemanceau P. y Cooke M. 2007. New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research. *Eur J Plant Pathol* 119: 241-242

Bhattarai T. y Hess D. 1998. Growth and yield responses of a Nepalese spring wheat cultivar to the inoculation with Nepalese *Azospirillum* spp at various levels of nitrogen fertilization. *Biol Fertil Soils* 26: 72-77.

Banchio E., Bogino P.C., Santoro M., Zygodlo J. y Giordano W. 2010. Systemic induction of monoterpene biosynthesis in *Origanum x majoricum* by soil bacteria. *J Agric Food Chem* 58: 650-654.

Barea J.M., Bonis A.F. y Olivares J. 1983. Interactions between *Azospirillum* and VA mycorrhiza and their effects on growth and nutrition of maize and ryegrass. *Soil Biol Biochem* 15: 705-709.

Berg G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Botechnol* 84: 11-18.

Bizzozzero F. 2006. Tecnologías Apropriadas. Biofertilizantes. CEUTA (Centro Uruguayo de Tecnologías Apropriadas). Montevideo, Uruguay, 50 pp.

Brinch-Pedersen H., Sorensen L.D. y Holm P.B. 2002. Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Tren. Plant Sci* 7: 118-125.

Cárdenas-Navarro R., Sánchez-Yañez J.M., Farías-Rodríguez R. y Peña-Cabriales J.J. 2004. Los aportes de nitrógeno en la agricultura. *Rev Chapingo Serie Horticultura* 10: 173-178.

CICEANA. Centro de Información y Comunicación Ambiental de Norte América, A.C. 2009. Eutrofización. <http://www.ciceana.org.mx>.

Del Gallo M. y Fabbri P. 1990. Inoculation of *Azospirillum brasilense* Cd on chickpea (*Cicer arietinum*) *Symbiosis* 9: 283-287.

Díaz-Franco A., Jacques-Hernández C. y Peña del Río M.A. 2008. Productividad en campo asociada con micorriza arbuscular y *Azospirillum brasilense*. *Universidad y Ciencia* 24: 229-237.

Eatough Jones M., Paine T.D. y Fenn M.E. 2008. The effect of nitrogen additions on oak foliage and herbivore communities at sites with high and low atmospheric pollution. *Environ Pollution* 151: 434-442.

Estrada-Botello M.A., Nikolskii-Gavrilov I., Mendoza-Palacios J.D., Cristobal-Acevedo D., de la Cruz Lázaro E., Brito-Manzano N.P., Gómez-Vázquez A. y Bakhlaeva-Egorova O. 2007. Lixiviación de nitrógeno inorgánico en un suelo agrícola bajo diferentes tipos de drenaje en el trópico húmedo. *Universidad y Ciencia* 23: 1-14.

Esquinas-Alcázar J. y Nuez V.F. 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. En: Nuez F. (Coord.). *El cultivo del tomate*. Mundi Prensa, España, pp. 15-42.

Esquivel-Cote R., Jiménez Flores F., Tsuzuki Reyes M.G. y Ramírez Gama R.M. 2004. Reducción de la fertilización química en jitomate mediante la biofertilización con *Azospirillum*. XXXII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. 8 al 10 de noviembre de 2004 León, Guanajuato, México

Esquivel-Cote 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. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Esquivel-Cote R. 1997. Efecto de la fertilización biológica con *Azospirillum* y la fertilización química simultánea sobre el desarrollo de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) bajo condiciones de invernadero. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México.

Fages J. y Arsac J.F. 1991. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Soil* 137: 87-90.

Fallik E. y Okon Y. 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italic* and *Zea mays*. *Soil Biol Biochem* 28: 123-126.

FAO 2010. FAOSTAT. <http://www.fao.org>. Revisado el 2 de Mayo de 2010.

- FAO. 2009. FAOSTAT. <http://www.fao.org>. Revisado el 2 de Mayo de 2010.
- FAO. 2006. FAOSTAT. <http://www.fao.org>. Revisado el 2 de Mayo de 2010.
- FAS/USDA. 2003. Horticultural and Tropical Products Division. Processed Tomato Products Outlook and Situation in Selected Countries, 7 pp.
- Fassbender H.W. y Bornemisza E. 1987. Química de suelos, con énfasis en suelos de América Latina. Ed. IICA, San José, Costa Rica, 420 pp.
- Faxsa. 2003. Tomate Mercado Fresco. <http://www.faxsa.com.mx/semhort1/c60tf001.htm>. Revisado el 13 de Abril de 2003.
- Ferrera-Cerrato R. y Alarcón A. 2008. Biotecnología de los hongos micorrízicos arbusculares. En: Díaz-Franco A. y Mayek-Pérez N. (Coord.). La Biofertilización como tecnología sustentable. 25-38 pp. Plaza y Valdés S.A. de C.V.
- Fravel D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* 43: 337-359.
- Fulchieri M. y Frioni L. 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. *Soil Biol Biochem* 26: 921-923.
- FUPRONAY 2008. [http://fupronay.org.mx/archivos/biblioteca/guias\\_tecnicas/jitomate.pdf](http://fupronay.org.mx/archivos/biblioteca/guias_tecnicas/jitomate.pdf) Revisado el 17 Julio de 2010.
- Gadagi R.S., Krishnaraj P.U., Kulkarni J.H. y Sa T. 2004. The effect of combined *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of the blanket flower *Gaillardia pulchella*. *Sci Hort* 100: 323-332.
- Gamo T. y Ahn S.B. 1991. Growth-promoting *Azospirillum* spp. isolated from the roots of several non-gramineous crops in Japan. *Soil Sci Plant Nutr* 37: 455-461.
- Glick B.R. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett* 251: 1-7.
- Glick B. R., Penrose D.M. y Li J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting pseudomonads. *Can J Microbiol* 41: 533-536.
- Glick B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41: 109-117.
- González-Salmerón D. 2001. Efecto de la inoculación de *Azospirillum* y Hongos Micorrízicos Arbusculares en el crecimiento de *Lycopersicon esculentum*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Guerra-Sierra B.E. 2008. Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología en Marcha* 21: 191-201.
- Hamaoui B., Abbadi J.M., Burdman S., Rashid A., Sarig S. y Okon Y. 2001. Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions. *Agronomie* 21: 553-560.

Harrier L.A y Watson C.A. 2004. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Manag Sci* 60: 149-157.

Hartmann A. y Bashan Y. 2009. Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth promoting bacteria (PGPB)-special issue. *Eur J Soil Biol* 45: 1.2.

Hill J.W. y Kolb D. 1999. Química para el nuevo milenio. 8a. ed. Prentice-Hall, México, 704 pp.

INIFAP-San Luis Potosí. 2010. Tecnologías de producción para cultivo de jitomate con ferti-irrigación en el altiplano de San Luis Potosí. <http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/tecnologiasdesc.php?id=2>. Revisado el 23 Junio de 2010.

INIFAP-Zacatecas. 2008. <http://www.inifapzac.sagarpa.gob.mx/PotAgric/JitomateR.pdf> Revisado el 17 Julio de 2010.

Javot, H., Penmetsa V.R., Terzaghi N., Cook D.R. y Harrison M.J. 2007. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1720-1725.

Jeschke W.D. y Hartung W. 2000. Root-shoot interactions in mineral nutrition. *Plant Soil* 226: 57-69.

Kapulnik Y., Kigel J., Okon Y., Nur I. y Henis Y. 1981. Effect of *Azospirillum* inoculums on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. *Plant Soil* 61: 65-67.

Ladha J.K., Pathak H., Krupnik T.J., Six J. y van Kessel C. 2005. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: Retrospects and prospects. *Adv Agron* 87: 85-156.

Leaungvutiviroj C., Ruangphisarm P., Hansanimitkul P., Shinkawa H., y Sasaki K. 2010. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N<sub>2</sub> fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 1098-1101.

Linderman R.G. 1992. Vesicular-Arbuscular micorrhizae and soil microbial interactions. En: Bethlenfalvay G.J. y Linderman R.G. (Ed.). *Mycorrhizae in sustainable agricultura*. pp 45-70. ASA, Special Publication no. 54. Madison, USA.

Lugtenberg B. y Kamilova F. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63: 541-546.

Lugtenberg B.J., Chin-A-Wong T.F., Bluemeberg G.V. 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Anton Leeuw* 81: 373-383.

Maathius F.J.M. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr Op Plant Biol* 12: 250-258.

Malleville J. y Chambolle T. 1990. Calidad del agua. *Mundo Científico*. 10: 768-778.

Marschner H. 1995. 2a. ed. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. San Diego, CA, USA, 889 pp.

- Matheus J. 2004. Evaluación agronómica del uso de compost de residuos de la industria azucarera (biofertilizante) en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Bioagro* 16: 219-224.
- Miller A.J., Cramer M.D. 2008. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* 274: 1-36.
- Morita N y Galván C.H. 1999. Uso del algribón en el control del “chino” del jitomate. 500 Tecnologías. Llave en mano. INIFAP, PRODUCE, SAGAR. pp. 91-92.
- Morrissey J.P., Dow J.M., Mark G.L. y O’Gara F. 2004. Are microbes at the root of a solution to world food production? Rational exploitation of interactions between microbes and plants can help to transform agriculture. *EMBO Reports* 5: 922-926.
- Mulvaney R. L., Khan S. A. y Ellsworth T. R. 2009. Synthetic nitrogen fertilizers deplete soil nitrogen: A global dilemma for sustainable cereal production. *J Environ Qual* 38:2295-2314.
- Murty M.G. y Ladha J.K. 1988. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant Soil* 108: 281-285.
- Okon Y. y Labandera-González C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide fields inoculation. *Soil Biol Biochem* 26: 1591-1601.
- Okon Y. y Hadar Y. 1987. Microbial inoculants as crop-yield enhancers. *CRC Crit Rev Biotechnol* 6: 61-85.
- Okon Y. y Kapulnik Y. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant Soil* 90: 3-16.
- Pepper L.I., Gerba C.P. y Brusseau M.L. 2006. Environmental and pollution science. 2a. ed. Academic Press. Elsevier. USA. pp.243-258.
- Pichardo-González B. 2006. La Revolución Verde en México. *AGRÁRIA, São Paulo*, Nº 4: 40-68.
- Pereira J.A.R., Cavalcante V.A, Baldani J.I. y Dobereiner J. 1988. Field inoculation sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil* 110: 269-274.
- Pereyra C.M., Ramella N.A., Pereyra M.A., Barassi C.A. y Creus C.M. 2010. Changes in cucumber hypocotyl cell wall dynamics caused by *Azospirillum brasilense* inoculation. *Plant Physiol Biochem* 1: 62-69.
- Pereyra M.A., Zalazar C.A. y Barasse C.A. 2006. Root phospholipids in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings exposed to water stress. *Plant Physiol Biochem* 11-12: 873-879.
- Planes-Leyva M., Utria-Borges E., Calderón-Agüero J.O., Terry-Lamothe A.O.; Figueroa-Santana I. y Lores A. 2004. La biofertilización como herramienta biotecnológica de la agricultura sostenible. *Rev Chapingo Serie Horticultura* 10: 5-10.
- Pretty J. 2008. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. *Phil Trans R Soc B* 363: 447-465.
- PRODUCE-Michoacán. 2009. Seminario “Manejo integrado de plagas de jitomate y chile”. Fundación Produce Michoacán, A.C. y la Universidad Autónoma Chapingo –Centro Regional Morelia. 3 y 4 de Julio de 2009.
- Puente M.E. y 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.

- Rashedul I.M., Madhaiyan M., Boruah H.P.D., Yim W., Lee G., Saravanan V.S., Fu Q., Hu H. y Sa T. 2009. Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. *J Microbiol Biotechnol* 19: 1213-1222.
- Ratti N., Kumar S., Verma H.N. y Gautam S.P. 2001. Improvement in bioavailability of tricalcium phosphate to *Cymbopogon martinii* var. *motia* by rhizobacteria, AMF and *Azospirillum* inoculation. *Microbiol Res* 156: 145-149.
- Raun W.R. y Johnson G.V. 1999. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agron J* 91: 357-363.
- Raverkar K.P. y Konde B.K. 1988. Effect of *Rhizobium* and *Azospirillum lipoferum* inoculation on the nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars. *Plant Soil* 106: 249-252.
- Reed L.M. y Glick B.R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Anton Leeuw* 86: 1-25.
- Restrepo R.J. 2001. Elaboración de abonos orgánicos fermentados y biofertilizantes foliares: experiencias con agricultores de Mesoamérica y Brasil. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Costa Rica. 157 pp.
- Rodelas B., González-López J., Salmerón V., Pozo C. y Martínez-Toledo M.V. 1996. Enhancement of nodulation, N<sub>2</sub>-fixation and growth of faba vean (*Vicia faba* L.) by combined inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae* and *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis* 21: 175-186.
- Rodríguez-Barrueco C., Cervantes E., Subbarao N.S. y Rodríguez-Cáceres E. 1991. Growth promoting effect of *Azospirillum brasilense* on *Casuarina cunninghamiana* Miq. seedlings. *Plant Soil* 135: 121-124.
- Rosenblueth M. y Martínez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant-Microbe Interact* 19: 827-837.
- Ribaudo C.M., Krumpholz E.M., Cassán F.D., Bottini R., Cantore M.L. y Curá J.A. 2006. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *J Plant Growth Regul* 24: 175-185.
- Sarig S., Blum A. y Okon Y. 1988. Improvement of the waste status and yield of field grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *J Agric Sci* 110: 271-277.
- SIAP. 2010. <http://www.siap.gob.mx>. Revisado el 23 Junio de 2010.
- Socolow R.H. 1999. Nitrogen management and the future of food: lessons from the management of energy and carbon. *Proc Natl Acad Sci USA* 25: 6001-6008.
- Smil V. 2001. Enriching the earth. Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production. MIT Press, Cambridge, MA, 338 pp.
- Smith S.E. y Read D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, San Diego, USA, 605 pp.
- Spooner D.M., peralta I.E. y Knapp S. 2011. AFLP phylogeny of wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. subsection *Lycopersicon*]. *Taxon* En prensa.



- Steenhoudt O. y Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol Rev 24: 487-506.
- Taiz L. y Zeiger E. 2002. Plant Physiology. 4a. ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Mass, USA, 565 pp.
- Terry E., Leyva A. y Hernández A. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Rev Colomb Biotecnol 7: 47-54.
- Terry E., Teran Z., Martínez-Viera R. y Pino M. 2002. Biofertilizantes, una alternativa promisorio para la producción hortícola en organopónicos. Cultivos Tropicales 23: 43-46.
- Torres D. y Capote T. 2004. Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. Ecosistemas 13: 2-6.
- Traxco. 2010. Disponible en <http://www.traxco.es/blog/noticias-agricolas/biofertilizantes>. Revisado el 22 de Febrero de 2011.
- Uribe V.G. y Dzib E.R. 2006 Micorriza arbuscular *Glomus intraradice*, *Azospirillum brasilense* y Brassinoesteroide en la producción de maíz en un suelo Cambisol (*Chac-lu'um*). III Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca. Mérida, Yucatán; 19 al 21 de enero.
- Urzúa H.M.C. 2001. Selección de la concentración óptima de *Azospirillum* y su combinación con diferentes dosis de fertilización en dos sistemas de cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Urzúa H.M.C. 1997. Evaluación del efecto de *Azospirillum* sobre el rendimiento de *Lycopersicon esculentum* (bajo condiciones controladas). Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Superiores, Iztacala, UNAM.
- Urrestarazu G.M. 2004. 3a. ed. Tratado de cultivos sin suelo. Mundi-Prensa, Barcelona, España, 915 pp.
- USDA, FAS. 2007. World markets and trade: tomato and tomato products. [http://www.fas.usda.gov/htp/2007tomatoarticle\\_08\\_24\\_07](http://www.fas.usda.gov/htp/2007tomatoarticle_08_24_07). Revisado el 30 de Octubre de 2010.
- Velasco V.J., Ferrera-Cerrato R. y Almaraz J.J.S. 2001. Vermicomposta, Micorriza Arbuscular y *Azospirillum brasilense* en tomate de cáscara. TERRA 19: 241-248.
- Vance C.P., Uhde-Stone C. y Allan D.L. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. New Phytologist 157: 423-447.
- Veeraswamy J., Padmavathi T. y Venkateswarlu K. 1992. Interaction effects of *Glomus intraradices* and *Azospirillum lipoferum* on sorghum. Indian J Microbiol 32: 305-308.
- Vessey, JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255: 571-586.
- Villarreal-Romero M. 1990. Efecto de la doble inoculación *Azospirillum* sp. endomicorriza (VA) en la producción de trigo (*Triticum aestivum*, L.). Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillos, Edo. de México, México.
- Wang Y.M. 2009. Sustainable agricultural practices: energy inputs and outputs, pesticide, fertilizer and greenhouse gas management. Asia Pac J Clin Nutr 18: 498-500.

Ward M.H. 2009. Too much of a good thing? Nitrate from nitrogen fertilizers and cancer. *Rev Environ Health* 24: 357-363.

Yasuda M., Isawa T., Shinozaki S., Minamisawa K. y Nakashita H. 2009. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. *Biosci Biotechnol Biochem* 12: 2595-2599.

Zambrano J.A. y Díaz L.A. 2008. Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus* sp. en *Gmelina arborea* durante su germinación y manejo en vivero. *Universitas Scientiarum* 13: 162-170. <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/499/49913207.pdf> Revisado el 14 de julio de 2010.

---

## CAPÍTULO II

# Importancia agro-ecológica de microorganismos promotores del crecimiento vegetal: rizobacterias que sintetizan la enzima ACC desaminasa y hongos micorrízicos arbusculares

### 2.1 Rizosfera

Lorenz Hiltner (1904), define por primera vez el término rizosfera, como el volumen de suelo influenciado directamente por las raíces de una planta viva (Kennedy, 1999), donde los microorganismos son beneficiados, ya que en la rizosfera se liberan y acumulan compuestos carbonados procedentes de los exudados ricos en nutrimentos, los cuales son usados como fuente de carbono y energía (Curl y Truelove, 1986). El carbono, es fijado por las plantas mediante la fotosíntesis, y posteriormente secretado principalmente en los exudados, y como producto de la respiración (Marschner, 1995).

La rizosfera es un sistema dinámico donde se detecta la máxima actividad microbiana, y en el cual las interacciones y la comunicación entre raíz y microorganismo juegan un papel muy importante tanto para el mantenimiento del crecimiento vegetal y su productividad, como para los microorganismos. El estudio de la rizosfera representa un campo muy importante en el área de la agro-biotecnología, que tiene como objetivo principal incrementar la producción de biomasa y rendimiento de las plantas con el uso mínimo de agua, fertilizantes y agroquímicos (Ortíz-Castro *et al.*, 2009).

#### 2.1.1 Exudados de la rizosfera

Los exudados pertenecen a tres clases principales de compuestos: a) de bajo peso molecular, b) de alto peso molecular y c) compuestos orgánicos volátiles (COVs). Los compuestos de bajo peso molecular representan la porción formada por azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, vitaminas y varios metabolitos secundarios; mientras que los de alto peso molecular son compuestos formados de mucigel y proteínas. El bióxido de carbono, ciertos metabolitos secundarios, alcoholes y aldehídos constituyen los COVs (Lynch y

Whipps, 1990; Schulz y Dickschat, 2007; Badri y Vivanco, 2009). Diferentes especies de plantas secretan muchos de estos compuestos, pero pueden variar en la cantidad y el tiempo de liberación por las raíces. Varios factores pueden influir en la naturaleza y la velocidad de exudación, tales como la temperatura, la humedad, la luz, la edad de la planta y el tipo de suelo (Schulz y Dickschat, 2007; Badri y Vivanco, 2009; Ortíz-Castro *et al.*, 2009). Más allá de su valor nutricional en la comunidad de la rizosfera, los exudados son estudiados por su función como:

- a) Quimioatrayentes, en la interacción planta-microorganismo, donde actúan como señales químicas para el inicio de la colonización de las raíces, donde los microorganismos son atraídos hacia la raíz. Al respecto una amplia variedad de compuestos exudados como proteínas y polisacáridos, han sido reconocidos como adherentes que varias bacterias utilizan para anclarse a las raíces de las plantas. En exudados de raíces de plantas de jitomate se ha identificado compuestos como: ácidos orgánicos (málico y cítrico), aminoácidos (1-leucina) y ácidos dicarboxílicos (Lugtenberg *et al.*, 1999; 2001), que actúan como quimiotrayentes para la bacteria *Pseudomonas fluorescens* WCS365 (De Weert *et al.*, 2002).
- b) Alelopáticos de plantas, donde las raíces liberan sustancias que modifican las propiedades químicas y físicas del suelo circundante y actúan de manera directa sobre el desarrollo de otras plantas, o bien, indirectamente al influir en las poblaciones de microorganismos del suelo (Anaya, 2003; Dakshini *et al.*, 1999).
- c) Inductores de la expresión de genes específicos, tanto en los microorganismos como en la raíz. Por ejemplo, los flavonoides secretados por las leguminosas activan los genes responsables de la nodulación en bacterias como *Rhizobium meliloti*, y participan también en la secreción de fitoalexinas, proteínas de defensa contra el ataque de microorganismos patógenos (Griffith *et al.*, 1999; Nardi *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2003).

La rizosfera es una zona abundante en bacterias principalmente, calculada en una concentración de 10 a 1000 veces más abundante que en el resto del suelo circundante (Curl y Truelove, 1986; Walter *et al.*, 2003). No obstante, es un lugar exuberante en otras especies microbianas como actinobacterias, hongos, protozoarios y algas, de las cuales, muchas especies influyen de manera directa en el crecimiento de las plantas. Esta influencia puede ser benéfica (promueve el crecimiento vegetal), perjudicial (provoca enfermedades) o neutra. (Zahir *et al.*, 2004). Para fines del presente trabajo nos referiremos a continuación al efecto benéfico de algunos microorganismos rizosféricos en el crecimiento de las plantas.

## 2.2 Microorganismos rizosféricos promotores del crecimiento vegetal

Uno de los grupos microbianos con efecto benéfico para las plantas mejor conocidos son: las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (por sus siglas en inglés, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (Davison, 1988; Kloepper *et al.*, 1989; Smith y Read, 1997; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007). Las PGPR pertenecen a un amplio número de especies de diversos géneros, entre los que destacan: *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Anahaena*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Gluconoacetobacter*, *Hydrogenonophaga*, *Kluyvera*, *Microcoleus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* y *Vibrio* (Somers *et al.* 2004; Bashan y de-Bashan, 2005).

### 2.2.1 *Azospirillum*: una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal

Bacterias del género *Azospirillum* aisladas de diferentes regiones geográficas del mundo (Bashan *et al.*, 2004; Karthikeyan *et al.*, 2008), abarcan ecosistemas costeros, tropicales, subtropicales, templados y áridos, tanto en condiciones no perturbadas como en suelos contaminados con petróleo (Ladha *et al.*, 1987; Gunarto *et al.*, 1999; Saleena *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2008). Así mismo, han sido aisladas a partir de una gran variedad de especies vegetales, y en algún caso se logró confirmar el aislamiento de *A. brasilense* y *A. amazonense* en semillas de pasto esterilizadas superficialmente (Sundaram *et al.*, 1988).

### 2.2.2 Características morfológicas y fisiológicas de bacterias del género *Azospirillum* sp.

El género *Azospirillum* pertenece al Phylum Proteobacteria, Clase alfaproteobacteria, Orden Rhodospirillales y Familia Rhodospirillaceae, siendo *A. lipoferum* la especie tipo (Tarrand *et al.*, 1978; NCBI, 2011). Para la identificación rutinaria de este género se deben tomar las siguientes características microscópicas: células vibroides, gramnegativas, presencia de pleomorfismo y movilidad en espiral (Döbereiner, 1992). Las células contienen hasta el 50% de su peso seco celular de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), las cuales se observan al microscopio como abundantes gránulos refringentes en células jóvenes (Okon *et al.*, 1976). En cultivos semisólidos y sólidos con más de 24 horas de incubación se presentan frecuentemente células refringentes con forma ovoide y de paredes gruesas similares a quistes (Lamm y Neyra, 1981). Las características fenotípicas usadas ampliamente como criterio para el reconocimiento tentativo del género *Azospirillum* son el desarrollo en diferentes medios de cultivo, y alternativamente, la identificación genotípica rutinaria se logra fácilmente y en forma reproducible amplificando mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los genes 16S rDNA (Lin *et al.*, 2011a).

Hasta el momento se han descrito 16 especies incluidas en el género *Azospirillum*, incluyendo las dos primeras especies descritas, *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Tarrand *et al.*, 1978), y las restantes referidas posteriormente: *A. amazonense* (Magalhaes *et al.*, 1983), *A. halopraeferens* (Reinhold *et al.*, 1987), *A. irakense* (Khammas *et al.*, 1989), *A. largimobile* (Sly y Stackebrandt, 1999), *A. doebereineriae* (Eckert *et al.*, 2001), *A. oryzae* (Xie y Yokota, 2005), *A. melinis* (Peng *et al.*, 2006), *A. canadense* (Mehnaz *et al.*, 2007a), *A. zea* (Mehnaz *et al.*, 2007b), *A. rugosum* (Young *et al.*, 2008), *A. palatum* (Zhou *et al.*, 2009), *A. picis* (Lin *et al.*, 2009), *A. thiophilum* (Lavrinenko *et al.*, 2010) y *A. formosense* (Lin *et al.*, 2011b).

### 2.2.3 Micorrizas: definición y características

El término micorriza proviene de las palabras griegas *myco* “hongo” y *rhiza* “raíz” y describe a diversas asociaciones raíz-hongo. Esta asociación se caracteriza por establecer una simbiosis biotrófica de tipo mutualista, de la cual el hongo depende enteramente para obtener carbono. La simbiosis se produce espontáneamente en la naturaleza y se presenta entre el 90 y el 95% de las especies vegetales (angiospermas, gimnospermas; pteridofitas y algunas briofitas), excepto en las familias: Cruciferae, Chenopodiaceae y Cyperaceae y juega un papel crucial en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas naturales de regiones tropicales, templadas y boreales del planeta (Read y Pérez-Moreno, 2003; Read *et al.*, 2004; Gianinazzi *et al.*, 2010). Actualmente se reconocen siete tipos de simbiosis micorrízica: arbuscular, ectomicorriza, ectendomicorriza, arbutoide, monotrofoide, ericoide y orquideoide (Smith y Read, 1997).

#### 2.2.3.1 Hongos Micorrízicos Arbusculares

La micorriza arbuscular se caracteriza porque las hifas de los HMA penetran en las células de la raíz, para establecer una simbiosis intracelular en la corteza de las raíces; forma estructuras que sólo son visibles microscópicamente, extrarradicales, responsables de la absorción de nutrimentos, dispersión de la asociación y la formación de esporas, e intrarradicales, que llevan a cabo el almacenamiento e intercambio de nutrientes (Smith y Read, 1997; Guadarrama *et al.*, 2004).

Los HMA como organismos obligados mutualistas, dependen de un organismo fotoautotrófico para completar su ciclo de vida y producir la nueva generación de esporas (Parniske 2008). Las esporas son estructuras que, en algunas especies son suficientemente grandes para observarse a simple vista, son multinucleadas, presentan un tamaño aproximado de 50 a 500  $\mu\text{m}$  de diámetro, mucho más grandes que las de otros hongos. Generalmente, las esporas son producidas en el suelo, aunque algunas especies del género *Glomus* tienen la capacidad de formarlas en el interior de la raíz. Las esporas se consideran como los principales

propágulos de reproducción y supervivencia cuando están expuestos a condiciones adversas. Las hifas son de tipo aseptadas (no están divididas en septos) y cenocíticas, con cientos de núcleos que comparten el mismo citoplasma. La reproducción de los HMA es de tipo asexual, y no se ha confirmado una etapa sexual dentro del ciclo de vida (Clapp *et al.*, 2001; Kuhn *et al.*, 2001; Ferrera-Cerrato y Alarcón 2007, Parniske 2008).

Los HMA forman parte del phylum Glomeromycota (Cuadro 2.2.3.1). Se tiene evidencia de que, este phylum se originó hace más de 450 millones de años, en el Devónico reciente, por lo que se le considera un fósil viviente (Bonfante y Genre, 2008).

**Cuadro 2.2.3.1** Ubicación taxonómica y géneros formadores de la micorriza arbuscular (Schübler *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2004; Oehl y Sieverding, 2004; Schübler y Walker, 2010).

Phylum	Clase	Orden	Familias	Géneros						
Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i>						
				<i>Funneliformis</i>						
				<i>Sclerocystis</i>						
				<i>Rhizophagus</i>						
						Claroideoglomeraceae	<i>Claroideoglomus</i>			
			Diversisporales			Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i>			
							<i>Scutellospora</i>			
							<i>Rococetra</i>			
									Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>
									Entrophosporaceae	<i>Entrophospora</i>
									Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
									Diversisporaceae	<i>Diversispora</i>
										<i>Otospora</i>
							<i>Redeckera</i>			
		Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>						
Archaeosporales			Geosiphonaceae	<i>Geosipho</i>						
			Ambisporaceae	<i>Ambispora</i>						
			Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i>						

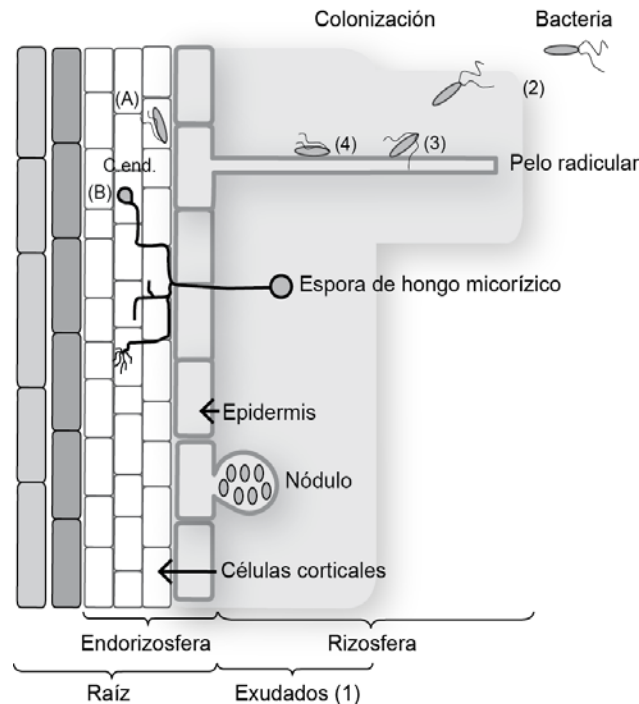
### 2.3 Colonización microbiana de la raíz

La colonización de las raíces por los microorganismos es un proceso complejo, en el cual están involucrados las células de la raíz, las células microbianas y sus respectivos genes, siendo un evento clave para llevar a cabo la interacción planta-microorganismo. La motilidad y la subsecuente quimiotaxis (fenómeno en el cual las bacterias dirigen sus movimientos de acuerdo a la presencia de ciertas sustancias químicas específicas exudadas por la planta) y electrotaxis favorecen el reconocimiento planta-microorganismo, y dan inicio a la colonización de la raíz mediante el acoplamiento (Somers *et al.*, 2004).

El acoplamiento se lleva a cabo cuando los microorganismos de la rizosfera se acumulan en los pelos radiculares y en las células no diferenciadas de la epidermis de la raíz, siguiendo diferentes patrones de colonización (exofítica o endofítica), dependiendo del tipo de microorganismo que se trate (Figura 2.3) (Sprend y de Faria, 1988). Sólo una pequeña parte de la superficie de la raíz es cubierta por los microorganismos (Rovira, 1956). Las zonas que generalmente colonizan son las uniones entre las células epidermales y en los primordios de las raíces laterales, donde los microorganismos son cubiertos, frecuentemente, por una capa de mucigel (Somers *et al.*, 2004).

En la colonización endofítica, los microorganismos residen dentro del tejido vegetal sin causar daño sustancial a su hospedero, y la estructura de su comunidad es afectada fuertemente por la especie vegetal hospedera, algunas son muy específicas y otras pueden colonizar varias especies vegetales. Por ejemplo, en el caso de bacterias, *Azospirillum* coloniza especies de gramíneas principalmente y algunas leguminosas; y cepas de *Rhizobium* colonizan sólo ciertas especies de leguminosas. En el caso de hongos endófitos como los HMA, colonizan casi el 90% de las especies vegetales existentes en el planeta (Smith y Read 1997). Lo anterior nos muestra que, para la aplicación de estos microorganismos promotores del crecimiento vegetal para la inoculación de plantas requiere de estudios preliminares que confirmen el sinergismo entre los microorganismos endófitos y las especies vegetales requeridas (Badri *et al.*, 2009).





**Figura 2.3** Colonización de raíces por microorganismos. La colonización de las raíces de las plantas se lleva a cabo en la rizosfera en cuatro procesos: 1) producción de exudados, 2) quimiotracción, 3) reconocimiento y 4) acoplamiento; y puede ser de tipo exógena (C.exo.) o endógena (C.end.). La colonización endofítica es característica de microorganismos como *Azospirillum* (A), hongos micorrízicos (B) y *Rhizobium* (C) (Diseñado por la autora para el presente trabajo).

### 2.3.1 Colonización radicular por *Azospirillum*

En el acoplamiento de células de *Azospirillum* participan proteínas y polisacáridos específicos, y se lleva a cabo en dos pasos (Bashan y Holguín, 1997):

- a) Proceso de adsorción. Este primer paso es rápido, débil (alcanza un máximo de 2 hrs de exposición de la bacteria a la raíz) y reversible donde intervienen polisacáridos, lecitinas y proteínas. Se ha documentado que los polisacáridos capsulares, los exopolisacáridos y polisacáridos O-específicos identificados en las cepas Sp7 y Sp245 de *A. brasilense* son responsables de la fuerte adhesión y agregación de bacterias a la pared celular de las raíces (Michielis *et al.*, 1991; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Matora *et al.*, 2001). Así mismo se ha reportado que algunas proteínas actúan como adhesinas favoreciendo la adsorción y la agregación bacteriana en la raíz (Burdman *et al.*, 2001). En la pared celular de *A. brasilense* y *A. lipoferum*, se han identificado lectinas que juegan un papel importante en la interacción planta-bacteria, como la lectina del trigo WGA (wheat germ agglutinin) que actúa como señal molecular para células de *A. brasilense* (Sp245) (Kamnev *et al.*, 2008).

- b) Proceso de anclaje. Este paso requiere de varias horas para llevarse a cabo, es irreversible, e intervienen polisacáridos extracelulares y biopolímeros secretados en la superficie de las bacterias (Skvortsov e Ignatov, 1998; Michielis *et al.*, 1991; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000), forman una red de material fibrilar y mucigel que conectan permanentemente la bacteria a la superficie de la raíz. Se ha reportado que el material de reserva como el poil- $\beta$ -hidroxibutirato de *A. brasilense* juega un papel muy importante en la colonización de la raíz de la planta hospedero (Kamnev *et al.*, 2008).

El número de células de *Azospirillum* que se anclan a la raíz incrementa con el aumento en la concentración del inóculo y el tiempo de contacto. Llegan a colonizar pequeñas raíces, y en particular, la zona de los pelos radicales, donde las bacterias son más numerosas y se localizan en las depresiones entre las células epidérmicas de la raíz. Se ha reportado que las bacterias de *Azospirillum* son capaces de deformar los pelos radicales de plántulas de trigo gracias a los lipopolisacáridos excretados de su membrana celular (Bashan *et al.*, 2004). Todas las especies de *Azospirillum* colonizan el exterior de la punta meristémica de las raíces en gran cantidad, pero no todas las cepas de *A. lipoferum* y *A. brasilense*, específicamente, son capaces de colonizar endofíticamente.

### 2.3.2 Colonización radicular por Hongos Micorrízicos Arbusculares: desarrollo de la simbiosis micorrízica

La simbiosis micorrízica se origina en el momento mismo cuando ocurre la colonización de plantas por HMA, donde existe previo al contacto físico, un marcado intercambio de señales químicas entre la planta y el hongo. La identidad de estas señales son desconocidas actualmente, sin embargo se sabe que son más abundantes en los exudados de la raíz de plantas desprovistas de fósforo (Harrison, 2005; Badri *et al.*, 2009).

#### 2.3.2.1 Señales producidas por la planta

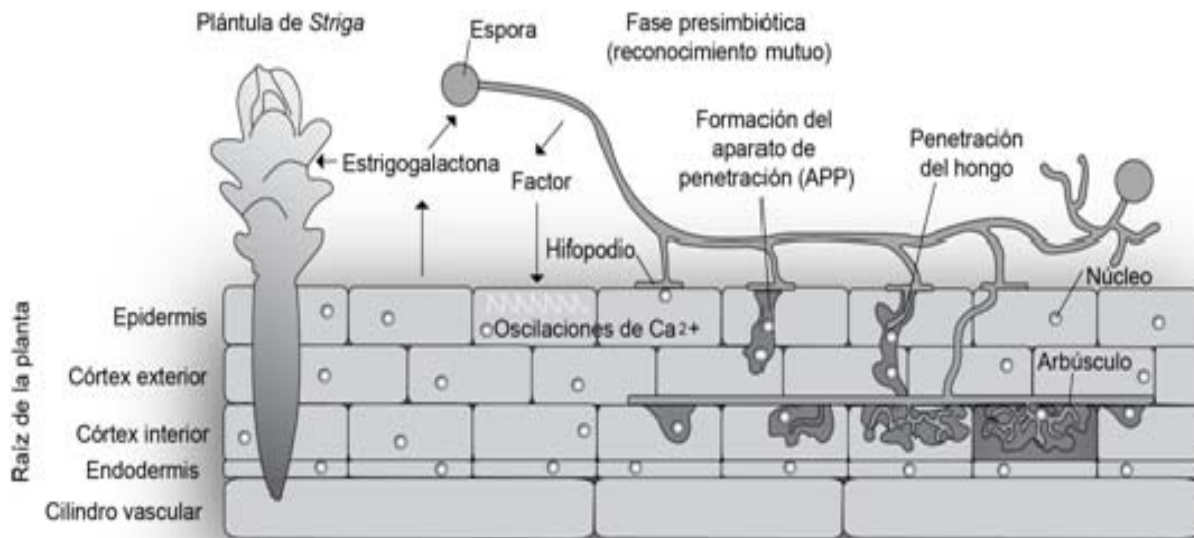
Las plantas, vía las raíces, producen exudados que actúan como señales químicas (factores difusibles) para estimular la germinación de esporas y la formación de hifas de HMA, tales como CO<sub>2</sub>, compuestos orgánicos volátiles, azúcares, aminoácidos, compuestos fenólicos, y fitohormonas (estrigolactonas). Los compuestos fenólicos, particularmente los flavonoides, son conocidos como señalizadores clave en muchas interacciones planta-microbio, y son muy abundantes en la rizosfera de plantas que crecen en suelos deficientes de fósforo (Bécard y Piché, 1989; Gianinazzi *et al.*, 1989; Van Rhijin *et al.*, 1997; Steinkellner *et al.*, 2007).

Las estrigolactonas, son compuestos de tipo apocarotenoide, recientemente clasificadas como una nueva clase de hormonas de las plantas con funciones endógenas y de señalización externa. Se han encontrado principalmente en diversas angiospermas, y son responsables de la ramificación del tallo de las plantas. Son sustancias de vida corta, muy lábiles en presencia del agua de la rizosfera, ya que se hidrolizan fácilmente. Estos compuestos efímeros forman un gradiente de concentración, decrecen a mayor distancia de la rizosfera, y son considerados los principales estimuladores de la germinación, tanto de algunas esporas de HMA, como de semillas de plantas parásitas (*Striga* sp. y *Orobancha* sp.), y de la formación y ramificación de hifas (Harrison, 2005; Parniske, 2008; Badri *et al.*, 2009; Alguacil-Martín, 2010; Akiyama *et al.*, 2010). Además de las estrigolactonas, algunos estudios han documentado que los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  actúan como mensajeros intracelulares durante la señalización micorrízica (Navazio *et al.*, 2007).

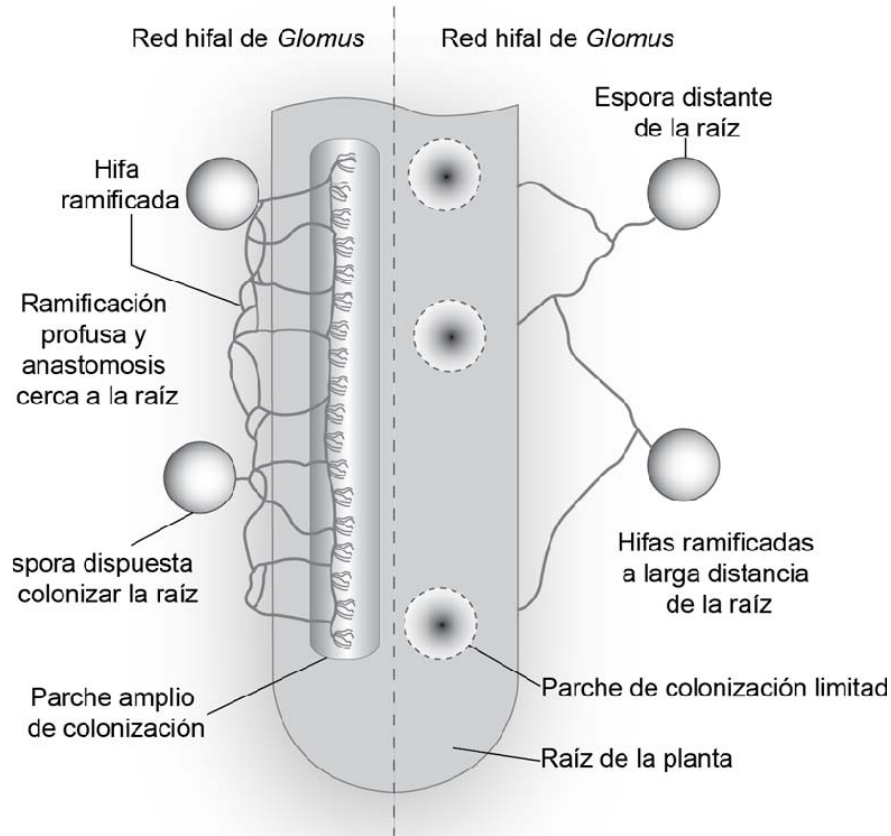
### 2.3.2.2 Etapa presimbiótica

La germinación de las esporas de los HMA se estimula por la acción de las estrigolactonas. A través del uso de triacilglicéridos y glicógeno de reserva, las esporas desarrollan un tubo o hifa germinal, el cual se extiende, a través del suelo, a pocos centímetros de la espора (hifas exploratorias) en busca de raíces de alguna planta hospedero (Bago *et al.*, 2000). En este momento es cuando se inicia la llamada etapa presimbiótica, la cual se caracteriza por el desarrollo de hifas exploratorias (micelio extrarradical), su ramificación y el incremento de la actividad fisiológica (Figura 2.3.2.2a) (Parniske, 2008).

A medida que se acercan a las células de la raíz, las hifas exploratorias tienden a ramificarse formando estructuras homólogas a los arbusculos, denominadas como estructuras ramificadas de absorción (Bago *et al.*, 1998 y 2000), lo que sugiere una detección química de las estrigolactonas exudadas por la raíz (Giovannetti *et al.*, 1993; Buee *et al.*, 2000). Los HMA presentan diferentes patrones de desarrollo de las hifas: mediante anastomosis (fusión de una hifa con el citoplasma de otra hifa) y por ramificación (Figura 2.3.2.2b). Estas diferencias probablemente reflejan diversas estrategias para ocupar un mayor número de nichos en el suelo.



**Figura 2.3.2.2a** Seguimiento del desarrollo de la micorriza arbuscular. Las raíces de las plantas exudan estrigolactanas, las cuales inducen la germinación de las esporas y la ramificación de las hifas incrementando la actividad fisiológica de ambas. Las estrigolactonas también inducen la germinación de semillas de plantas parásitas como *Striga*. Los hongos producen factores de la micorriza (Myc) que son operacionalmente definidos a través de su habilidad para inducir oscilaciones de calcio en las células de la epidermis de la raíz y activar los genes relacionados con la simbiosis en la planta. Los HMA forman un tipo especial de apresorio llamado hifopodio, el cual por definición se desarrolla a partir de la hifa madura y no a partir de los tubos de germinación. Como consecuencia de la estimulación química y mecánica las células vegetales producen un aparato de penetración (APP). Subsecuentemente una hifa fúngica se extiende a partir del hifopodio y entra al APP, el cual guía al hongo a través de las células del córtex de la raíz. Aquí el hongo deja la célula de la raíz y entra al apoplasto, donde se ramifica y crece lateralmente a lo largo del axis de la raíz. Esta hifa induce el desarrollo de estructuras parecidas al APP dentro de las células corticales, subsecuentemente entran a estas células y se ramifican para formar los arbuscúlos (Tomado de Parniske, 2008).



**Figura 2.3.2.2b** Crecimiento de diferentes hifas y sus estrategias de ramificación en los HMA. Los HMA tienen diferentes patrones de crecimiento de hifas, anastomosis y frecuencias de ramificación. Estas diferencias probablemente reflejan las diversas estrategias para ocupar varios nichos del suelo. Muchas especies de *Glomus* forman tasas altas de ramificación y redes de hifas que presentan anastomosis. Estas redes son más recalcitrantes para alterar el suelo que el micelio de las especies de *Scutellospora* o *Gigaspora*, la cual forma hifas muy largas, probablemente para poder explorar regiones más distantes del suelo (Tomado de Parniske, 2008).

### 2.3.2.3 Establecimiento de la simbiosis

Los hongos producen señales que inducen la simbiosis en la planta hospedero, tal como las moléculas llamadas factores Myc (Figura 2.3.2.2a), análogas a los factores Nod en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Son moléculas difusibles, perceptibles por la planta hospedero, que presentan la habilidad de inducir oscilaciones de  $\text{Ca}_2^+$  en las células epidérmicas de las raíces y de activar la acción transcripcional de los genes de las plantas relacionados con la simbiosis (Kosuta *et al.*, 2008; Bonfante y Anca, 2009; Mandal *et al.*, 2010). Aún se desconoce si la producción de factores Myc es también estimulada por las estrigolactanas.

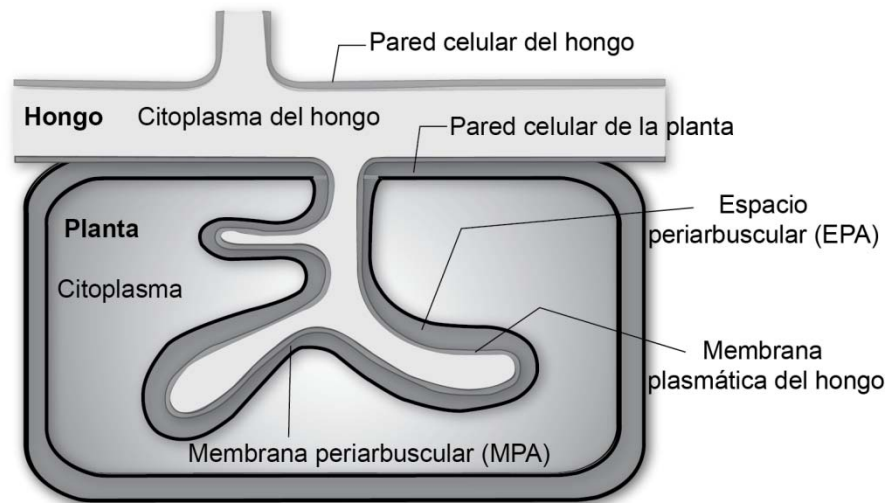
Recientemente, se estableció un nuevo paradigma que cambia la visión que se tenía de la interacción planta-microorganismo, el cual propone que, son las células de la plantas las que activamente preparan el ambiente intracelular para que se lleve a cabo la infección de las hifas de los HMA (Genre *et al.*, 2005). En este sentido, se ha reportado que varios de los ácidos fenólicos producidos por la planta activan en los HMA los genes GmGin1, responsables de inducir el establecimiento de la simbiosis micorrízica (Mandal *et al.*, 2010).

Una vez que el hongo y la raíz hacen contacto, la simbiosis se establece. El hongo forma un aparato de penetración (APP) sobre la superficie de la raíz que le permite colonizar las células de la raíz (Figura 2.3.2.2a). El APP es una estructura subcelular, que se origina después de 4 a 5 horas de la formación de un apresorio fúngico o hifopodium. El APP es un delgado puente citoplasmático que se forma a través de la vacuola de la célula de la planta, previo a la infección del hongo. Posteriormente, los núcleos de las células vegetales migran hacia delante del APP desarrollado y determinan la orientación del hongo a través de las células vegetales. El APP contiene microtúbulos citoesqueléticos y microfilamentos, los cuales, junto con el retículo endoplásmico denso forman un tubo hueco dentro del APP que conecta los núcleos delanteros con el sitio de contacto del apresorio (Genre *et al.*, 2005; 2008). Las señales que detonan la formación del APP aún son desconocidas.

#### 2.3.2.4 Formación de arbusculos

Los patrones de crecimiento dentro de la raíz, varían dependiendo de la especie fúngica que se trate. Existen dos tipos morfológicos: tipo *Paris* y tipo *Arum*, éste último caracteriza a la asociación que establecen los HMA. En la asociación tipo *Arum* el hongo se desarrolla intracelularmente a través del córtex externo, en ocasiones una hifa puede atravesar una célula directamente, y a veces llega a formar un rollo (serpentín) en la célula. Una vez dentro del córtex interior, el hongo forma hifas arborecentes dicotómicas, llamadas arbusculos (del latín *arbusculum* “pequeños árboles”). Los arbusculos son terminaciones diferenciadas y se desarrollan arborescentemente a lo largo de las hifas intercelularmente. Estas elaboradas estructuras se forman dentro de las células de las raíces de las plantas pero permanecen separadas del citoplasma celular vegetal mediante la membrana periarbuscular (MPA) que rodea al hongo, siguiendo el contorno de las hifas arborescentes (Figura 2.3.2.4) (Parniske, 2008).

La interfase apoplástica entre la membrana plasmática del hongo y la MPA de la planta es llamada espacio periarbuscular (EPA). Debido al potencial sintetizador de la pared celular tanto de la membrana del hongo como de MPA, la EPA comprende el material de la pared celular del hongo y de la planta (Parniske, 2008).



**Figura 2.3.2.4** Arbúsculo, estructura simbiótica característica de la micorriza arbuscular. Cada ramificación del HMA dentro de la célula vegetal es rodeado por la planta mediante una membrana periarbuscular (MPA) que se continúa con la membrana plasmática de la célula vegetal y excluye al hongo del citoplasma de la planta. La interfase apoplástica entre la membrana plasmáticas del hongo y la MPA derivada de la planta es llamada espacio periarbuscular (EPA) (Tomado de Parniske, 2008).

### 2.3.2.5 Bacterias que favorecen de la colonización micorrízica

En condiciones naturales, los HMA interactúan con diferentes clases de bacterias durante su ciclo de vida. Por ejemplo, durante su fase extraradical establecen interacciones con bacterias de la rizosfera, las cuales colonizan la superficie de las hifas extrarradicales, las raíces micorrizadas y los esporocarpos (Frey-Klett *et al.*, 2007; Bonfante y Anca, 2009; Berg, 2009), y así mismo, con bacterias endosimbióticas que viven en el citoplasma de algunos hongos, conocidas como endobacterias (Perotto y Bonfante, 1997; Bonfante *et al.*, 2001; Bonfante, 2003). Algunas de estas bacterias pueden favorecer la colonización, la ramificación de las hifas y las propiedades antifúngicas (Bonfante y Anca, 2009; Hartman *et al.*, 2009). Este grupo de bacterias que favorecen la colonización micorrízica son las llamadas *Mycorrhiza Helper Bacteria* (MHB), término que fue introducido y discutido por Garbaye en 1994; y dentro de los taxa de las bacterias asociadas a las micorrizas, son actualmente el grupo más investigado (Frey-Klett *et al.*, 2007; Bonfante y Anca, 2009).

Las MHB, generalmente se encuentran adheridas al micelio, pueden alimentarse de los exudados de la hifa y usar el micelio como un vehículo para la colonización de la rizosfera. De este modo, favorecen la simbiosis micorrízica, gracias a que estimulan el desarrollo del micelio extraradical y la actividad metabólica del hongo. Así mismo, algunas especies son responsables



de efectos ayudadores múltiples, debido a que influyen tanto a la planta como a su hongo (Bonfante y Anca, 2009). Recientemente, el efecto estimulador de las MHB ha sido evaluado bajo la exposición de la simbiosis micorrízica a una variedad de condiciones de estrés como la sequía (Vivas *et al.*, 2003b) y la contaminación por metales pesados como plomo, zinc y cadmio (Vivas *et al.*, 2003a; Vivas *et al.*, 2006; Kozdrój *et al.*, 2007).

Las cepas de MHB que han sido identificadas pertenecen a varios géneros, tales como bacterias Gram negativas Proteobacterias (*Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Rhizobium*), Gram positivas Firmicutes (*Bacillus*, *Brevibacillus*, y *Paenibacillus*) y actinomicetes gram positivos (*Rhodococcus*, *Streptomyces*, y *Arthrobacter*), la mayoría caracterizadas como fijadoras de N, solubilizadoras de P inorgánico, productores de fitohormonas y de sideróforos. El género *Glomus* ha sido reportado como el más estudiado de los HMA y el principal beneficiado por las MHB (Frey-Klett *et al.*, 2007).

## 2.4 Interacción planta-microorganismo promotor del crecimiento vegetal

La comunicación que existe entre las plantas y los microorganismos durante las diferentes etapas del desarrollo vegetal (embrionaria, germinación, juvenil, adulta) es muy extensa, en la cual las señales moleculares de ambos organismos, juegan un papel muy importante para determinar el resultado final que tendrá la interacción, pudiendo ser de tipo benéfico, patogénico o neutro. La interacción planta-microorganismo promotor del crecimiento vegetal induce cambios favorables en la modulación de la arquitectura vegetal, la que se traduce en un incremento en el desarrollo y la productividad de las plantas. En particular, el sistema de raíces experimenta una considerable plasticidad en respuesta a las señales endógenas, microbianas y ambientales (Ivanchenko *et al.*, 2008).

### 2.4.1 Plasticidad fenotípica

Debido a que las plantas están expuestas continuamente a variaciones ambientales pareciera lógico suponer que evolutivamente hayan generado mecanismos para adaptarse a éstas (Smith, 1990). Uno de los mecanismos con que cuentan las especies vegetales para afrontar las variaciones ambientales es la plasticidad, la cual es la habilidad de un genotipo para modificar su fenotipo, morfología, fisiología, o ambas, como respuesta a cambios en el ambiente (Schlichting, 1986; Sultan, 1987; West-Eberhard, 1989). La plasticidad le da cierto valor adaptativo a un individuo, ya que le confiere mayor capacidad para aclimatarse a las condiciones ambientales (Smith, 1990).



Las especies pueden diferir en su capacidad de respuesta a variaciones ambientales, lo que podría implicar que bajo un rango de diferentes ambientes la selección natural favorezca distintos fenotipos más que uno solo (Oyama, 1994, Huante, 1996).

## 2.5 Mecanismos de acción empleados por los microorganismos promotores del crecimiento vegetal

Los microorganismos promueven el crecimiento vegetal mediante dos tipos de mecanismos, los indirectos y los directos, o una combinación de ambos. Se ha reportado que una misma cepa bacteriana puede utilizar uno o varios de estos mecanismos de forma simultánea o en sucesión para promover el desarrollo vegetal, ya sea bajo condiciones ambientales óptimas o adversas (Bashan y Levanony, 1990).

Los mecanismos indirectos son aquellos que intervienen en la disminución o eliminación de microorganismos fitopatógenos presentes en la rizosfera, como hongos, bacterias y nemátodos; ya sea a través de la producción de sustancias antimicrobianas (antibióticos), de cianuro de hidrógeno (HCN), de sideróforos, de enzimas líticas, o una combinación de éstas. Así mismo, los microorganismos promotores del desarrollo vegetal (PGPR o HMA) pueden competir con los fitopatógenos por nutrientes o por espacio en el nicho ecológico. No obstante, cabe mencionar que la planta cuenta con una serie de mecanismos para evitar el ataque de patógenos y herbívoros, como:

- a) La resistencia sistémica inducida (RSI), la cual induce la resistencia en tejidos sistémicos y las protegen de una gran variedad de enfermedades, por ejemplo, mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles.
- b) La resistencia sistémica adquirida (RSA), que incrementa la resistencia contra subsecuentes ataques por un amplio rango de patógenos y herbívoros, mediante la producción de sustancias como el metil-salicilato, los jasmonatos, el ácido azaléico y terpenoides (Kloepper *et al.*, 1993; Glick, 1995; Siddiqui y Mahmood, 1999; Dobbelaere *et al.*, 2003; Shah, 2009; Yang *et al.*, 2009).

Los mecanismos directos favorecen el incremento en la disponibilidad de nutrimentos en la rizosfera afectando el metabolismo de las plantas y mejorando su nutrición (Glick, 1995; Bashan, 1998). Como mecanismos directos, se consideran a la fijación de nitrógeno, la síntesis de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas), de vitaminas y de enzimas, la solubilización de fósforo inorgánico y la mineralización de fosfato orgánico, la oxidación de sulfuros, el

incremento en la permeabilidad de la raíz, la producción de nitritos, la acumulación de nitratos, la reducción de la toxicidad por metales pesados y la disminución de la biosíntesis de etileno mediante la actividad de la enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Glick, 1995; Bashan y de-Bashan, 2005; Glick *et al.*, 2007).

De acuerdo con su efecto los microorganismos promotores del crecimiento vegetal se han clasificado como biofertilizantes (incrementan la disponibilidad de nutrimentos para las plantas), fitoestimulantes (promueven el desarrollo vegetal, usualmente a través del incremento en la producción de fitohormonas), rizoremediadores (degradan compuestos orgánicos contaminantes) y biopesticidas (controlan las enfermedades, principalmente por la producción de antibióticos o metabolitos antifúngicos) (Vessey, 2003; Lucy *et al.*, 2004; Somers *et al.*, 2004).

### 2.5.1 Mecanismos empleados por los HMA para promover el crecimiento vegetal

La simbiosis micorrízica arbuscular coloniza el sistema de la raíz de muchas especies de plantas y modula el crecimiento vegetal incrementando la disponibilidad de nutrimentos, principalmente fósforo y en algunos casos nitrógeno. Los HMA toman los nutrimentos minerales del suelo y los intercambia con las plantas por carbono fijado fotosintéticamente. Este intercambio contribuye significativamente al reciclamiento de nutrientes e influencia la productividad primaria en los ecosistemas terrestres, así como la ecología, la evolución y la fisiología de las plantas (Karandashov y Bucher, 2005; Govindarajulu *et al.*, 2005; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007; Javot *et al.*, 2007).

#### 2.5.1.1 Absorción de nutrientes y su transporte a través del micelio extrarradical

Las redes que forman las hifas extrarradicales de los HMA están posicionadas idealmente para tomar eficientemente los nutrientes y agua del suelo, pero solo pocos son los transportadores que están involucrados en este proceso, incluyendo aquellos que transportan fosfatos, amonio y zinc (Harrison y Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001; López-Pedrosa, 2006; González-Guerrero *et al.*, 2005). Debido a que la difusión es muy lenta, los nutrientes son movidos en forma de paquetes entre el micelio extrarradical e intrarradical (Figura 2.5.1.1).

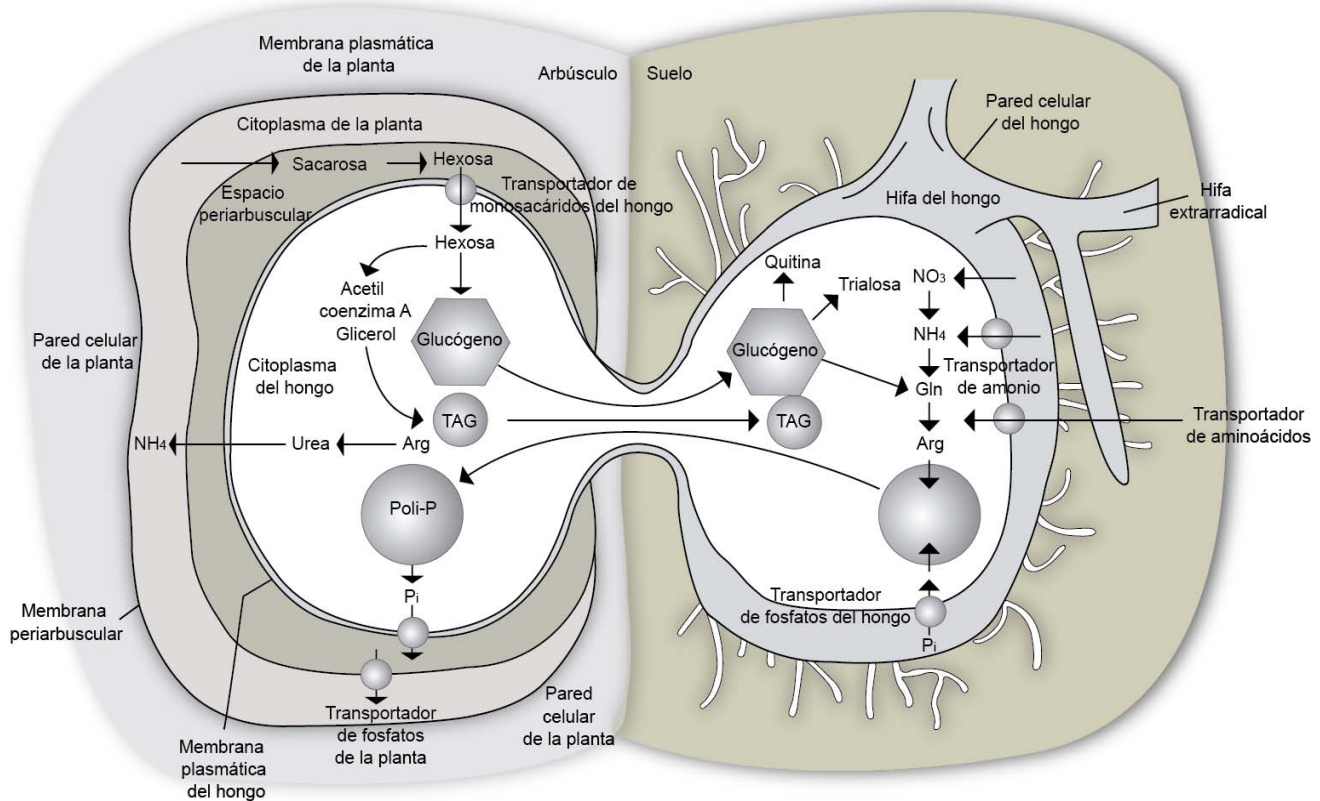
### 2.5.1.2 Carbono

La planta controla el flujo de sacarosa directamente a la raíz y hasta los hongos. El carbono (C) proveniente de la planta es transportado al hongo a través de las dos membranas de la interfase simbiótica (Figura 5.1.1). El C es liberado primeramente en el espacio periarbuscular (EP), probablemente en forma de sacarosa, posteriormente se desdobra en hexosas y así son tomadas por el hongo mediante transportadores de monosacáridos que se encuentran en la membrana plasmática del hongo. Dentro del citoplasma del hongo, las hexosas son convertidas en gránulos de glucógeno y gotas de lípidos de triacilglicerol (TAG), los cuales sirven como unidades eficaces que son transportadas a grandes distancias, a través de la red de hifas (Bago *et al.*, 2003; Bago *et al.*, 2002; Parniske, 2008).

### 2.5.1.3 Nitrógeno

A pesar de la importancia del nitrógeno (N) como nutriente, es muy poco lo que se conoce acerca de cómo los HMA lo toman y lo transfieren a toda la planta hospedero. Si bien, el papel del Pi en la simbiosis micorrízica ha sido un foco de atención primario, muchos experimentos sugieren que el N también puede jugar un papel muy importante en la interacción micorrízica. Se ha documentado que niveles significativos de N son transferidos del HMA a la raíz, aunque esto no cause cambios aparentes en el contenido de N total de la planta (Govindarajulu *et al.*, 2005; Javot *et al.*, 2006).

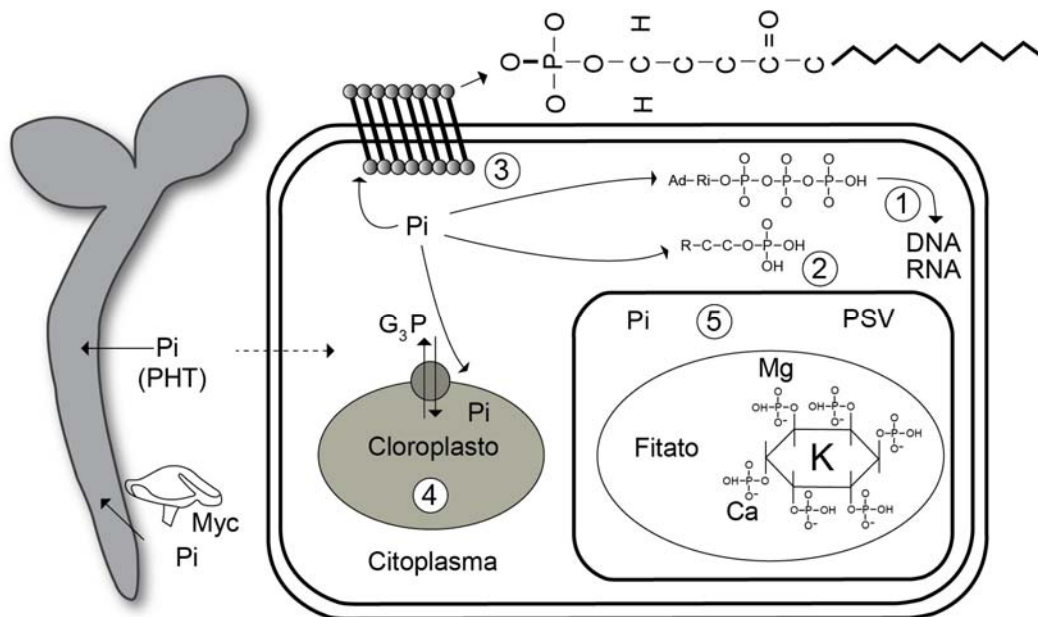
Las fuentes de N disponibles en el ambiente para el HMA son diversas, puede ser tomado en forma de amonio, nitrato y aminoácidos mediante transportadores localizados en la hifa extrarradical (Javot *et al.*, 2006). De hecho, ha sido bien identificada la alta afinidad de transportadores de amonio en hifas extra e intrarradicales de *Glomus intraradices* (Govindarajulu *et al.*, 2005; Lopez-Pedrosa *et al.*, 2006). En las hifas de los HMA el N es transportado principalmente como arginina, y una vez dentro de la hifa intrarradical, vía la vacuola, el N es transformado de arginina a urea y luego a amonio, y así es transportado directamente a toda la planta (Govindarajulu *et al.*, 2005) (figura 5.5.1). La importancia de la arginina en la transferencia de N esta dada porque este aminoácido representa alrededor del 70-90% del total de aminoácidos presentes en las hifas extrarradicales (Govindarajulu *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2005). Por otro lado, el HMA es capaz de acelerar la descomposición de la materia orgánica, para así incrementar la disponibilidad de nitrato para la planta (Hodge *et al.*, 2001).



**Figura 2.5.1.1** Flujo metabólico y transporte a larga distancia en la micorriza arbuscular (MA). El carbono que proviene de la planta es transportado al hongo a través de dos membranas de la interfase simbiótica. El carbono primero es liberado al espacio periarbuscular (EPA), probablemente en forma de sacarosa, para desdoblarse en hexosas y ser absorbido por la MA a través de transportadores que atraviesan la membrana plasmática del hongo. Dentro del citoplasma del hongo, las hexosas son convertidas a gránulos de glicógeno y gotas lipídicas de triacilglicerol (TAG), los cuales sirven como unidades apropiadas para transportar a través de largas distancias por la red hifal. Los nutrientes que son adquiridos por el hongo a partir del suelo y que son liberados hacia la célula vegetal tienen que atravesar la membrana plasmática del hongo, ser transportados largas distancias hacia la hifa intrarradical (HIR), incluyendo los arbusculos, y subsecuentemente alcanzar el citoplasma de la planta cruzando la membrana plasmática del hongo y la membrana periarbuscular de la planta (MPA). El fósforo es importado por los transportadores de fosfato que están presentes en la hifa extrarradical (HER). El fosfato es transportado hacia la raíz y la HIR en la forma de gránulos de polifosfato, los cuales residen en vesículas adjuntas a la membrana. La carga negativa de estos gránulos probablemente los hace vehículos transportadores para iones metálicos y arginina. El fosfato es liberado de gránulos de polifosfato dentro de la HIR. El nitrógeno es absorbido como amonio, nitrato o aminoácidos transportados en la HER. En las hifas de la MA, el nitrógeno es transportado principalmente como arginina. Dentro de la HIR, el nitrógeno es liberado a partir de la arginina como urea y transportado directamente a la planta o posteriormente desdoblado a amonio (Tomado de Parniske, 2008).

## 2.5.1.4 Fósforo

El intercambio de estos nutrientes entre los HMA y la planta es indispensable para que la simbiosis funcione. Por tanto, el intercambio de moléculas como fosfatos (Pi) y C, actúan como componentes reguladores de la simbiosis micorrízica (Smith y Read, 1997; Fitter, 2006). Las condiciones limitantes de P en el suelo permiten el desarrollo intrarradical de los hongos. Las hifas de los HMA, que son hasta 100 veces más largas que los pelos radiculares y que se extienden más allá de la zona de reducción, pueden proporcionar más del 80% del P total de las plantas (Marschner, 1995; Smith y Read, 1997; Harrison, 2005; Karandashov y Bucher, 2005; Javot *et al.*, 2007) (Figura 2.5.1.4).



**Figura 2.5.1.4** El P frecuentemente se encuentra en cantidades limitantes para el desarrollo vegetal, por tanto muchas plantas se asocian con HMA (Myc) que mejoran la nutrición con P que intercambia con la planta por C reducido. El P es tomado directamente como  $\text{PO}_4$  inorgánico (Pi), mediante transportadores de alta afinidad, como las  $\text{H}^+$ -ATPasas, y transportes pasivos. El Pi celular es esencial en la homeostasis energética desde sus formas sencillas como pirofosfatos de alta energía (1), y puentes de éster (2). Los grupos fosfato forman los componentes lipofílicos de muchas membranas lipídicas (3) y son, por tanto, esenciales en la composición e integridad de las membranas. El P de los cloroplastos es necesario para la síntesis de puentes de alta energía en la fotosíntesis (4) en el intercambio por gliceraldehído-3-fosfato ( $\text{G}_3\text{P}$ ). En la reserva de los tejidos (5), el P es secuestrado en las reservas de proteína en las vacuolas (PSV) como fitato junto con minerales (Tomado de Maathuis, 2009).

La expresión de la alta y baja afinidad de transportadores de Pi depende grandemente del aporte de P. La presencia de la simbiosis micorrízica también impacta la expresión de transportadores específicos (Paszkowski *et al.*, 2002). El P secuestrado en la vacuola es particularmente importante durante el desarrollo de las semillas cuando grandes cantidades de P y otros minerales son almacenados en complejos de sales de mioinositol tales como fitato. Estos están contenidos en inclusiones de reserva como cuerpos globoides de proteína dentro de las vacuolas (Maathuis, 2009).

### 2.5.2 Mecanismos empleados por *Azospirillum* para promover el crecimiento vegetal

El efecto promotor de *Azospirillum* en plantas, ha sido atribuido a varios mecanismos de acción que generalmente incrementan su rendimiento, y de los cuales se han reportado: la fijación de nitrógeno, emisión de señales moleculares, producción de nitritos, incremento en la absorción de agua y minerales, y la producción de importantes moléculas bioactivas (putrescina, espermina, espermidina y cadaverina, consideradas como moléculas potencialmente capaces de promover el crecimiento vegetal e incrementar el rendimiento en cultivos de interés agrícola); sin embargo, su principal mecanismo reportado como promotor del crecimiento vegetal sigue siendo la producción de fitohormonas como las auxinas (ácido indol-3-acético, AIA; ácido indol-3-butírico, AIB), el ácido abscísico, el ácido giberélico y las citocininas (zeatina) (Bashan y Holguin, 1997; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Dobbelaere *et al.*, 2001; Martínez-Morales *et al.*, 2003; Perrig *et al.*, 2007).

Se ha reportado que *Azospirillum* sintetiza AIA a partir del triptófano a través de diferentes rutas (Aguilar-Piedras *et al.*, 2008). Cuantitativamente es la fitohormona más abundante secretada por este microorganismo, por lo que se le ha atribuido como el principal mecanismo responsable de la estimulación del crecimiento de la raíz y promoción del crecimiento vegetal. Además, en cultivos puros de *Azospirillum* sp., se han identificado otros compuestos indólicos de interés, tales como el ácido indol-butírico (IBA) (Costacurta *et al.*, 1995), indol láctico (Crozier *et al.*, 1988), indol acetamida (Hartmann *et al.*, 1983), indol acetaldehído (Costacurta *et al.*, 1995), indol etanol e indol metanol (Crozier *et al.*, 1988), triptamina, antranilato y otros compuestos indólicos no caracterizados aún (Hartmann *et al.*, 1983). Recientemente, se reportó que especies de *A. lipoferum* presentaban el gen responsable de la síntesis de la enzima ACC desaminasa (Blaha *et al.*, 2006), sin que se confirmara su actividad biológica. El tema del mecanismo de acción de la ACC desaminasa lo abordaremos ampliamente más adelante (tema 2.7). Dichas cualidades le han conferido a *Azospirillum* un papel trascendental en aplicaciones tecnológicas importantes para la formulación de inoculantes (Perrig *et al.*, 2007).

## 2.6 Importancia de las fitohormonas

El mantenimiento de la forma y la función de un organismo multicelular no serían posibles sin una comunicación eficaz entre las células, los tejidos y los órganos. En las plantas superiores, la regulación y coordinación del metabolismo, el crecimiento y la morfogénesis suelen depender de señales. Estas señales son moléculas llamadas fitohormonas, que tienen efectos importantes en el desarrollo vegetal a concentraciones muy bajas (Taiz y Zeiger, 2002). A continuación, sólo mencionaremos brevemente, a tres de las fitohormonas que son relevantes en este estudio: auxinas, citocininas y etileno.

### 2.6.1 Auxinas

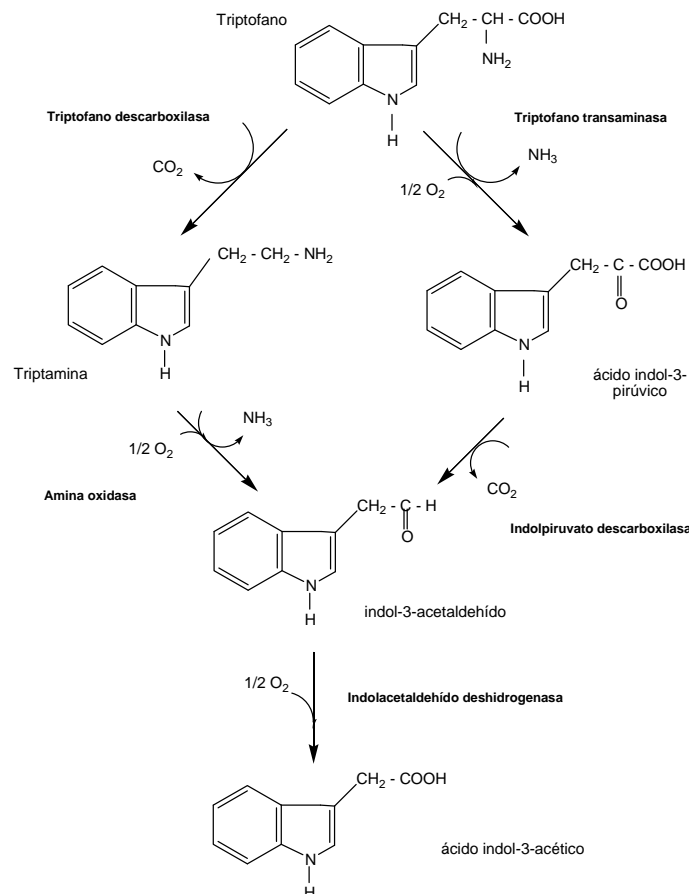
Las auxinas son clave para muchas etapas del crecimiento y desarrollo vegetal, desde la embriogénesis hasta la senescencia; por ejemplo, han sido vinculadas a procesos de orientación del crecimiento de tallos y raíces en respuesta a la luz y a la gravedad, diferenciación de tejidos vasculares, dominancia apical, estimulación de la división celular, elongación de tallos y raíces e iniciación de las raíces laterales y adventicias (Ross *et al.*, 2000), donde estimulan las células del periciclo para iniciar la elongación de raíces primarias y dan paso a la organogénesis *de novo*, principalmente en el establecimiento de nuevos meristemas de las raíces laterales (Ivanchenco *et al.*, 2008). Estos procesos son iniciados y mediados a través de la regulación de la expresión de genes. Dos tipos de familias de factores transcripcionales son requeridas para controlar la expresión de genes que codifican para la síntesis de auxinas: ARF (factores de respuesta) y AuxRESs (elementos de respuesta) (Guilfoyle y Hagen, 2007). La arquitectura de raíces es modificada por: a) la producción endógena de auxinas, grupo de compuestos químicos fitoreguladores que se caracterizan por su capacidad de inducir la elongación celular del tallo en la región subapical y que reproducen el efecto fisiológico del ácido indol-3-acético (AIA), y b) por la estimulación ambiental, como la disponibilidad de agua y de nutrientes minerales, entre otros (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

La actividad benéfica de las PGPR puede estar relacionada con la producción de auxinas o con la solubilización de nutrientes, los cuales afectan la iniciación o el desarrollo de raíces laterales, o ambos, lo que incrementa la capacidad exploratoria de las raíces (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Diversas especies de PGPR como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* producen auxinas como parte de su metabolismo, incluyendo el ácido indol acético (AIA), el ácido indol butírico (AIB) y sus precursores (Martínez-Morales *et al.*, 2003; Spaepen *et al.*, 2007).



### 2.6.1.1 Biosíntesis de las auxinas en plantas

El metabolismo de las auxinas incluye la síntesis, degradación y desactivación del ácido indol-3-acético (AIA). El AIA es sintetizado a partir del aminoácido triptófano mediante varias vías (Figura 2.6.1.1), las cuales involucran al ácido indol-3-pirúvico y a la triptamina para la formación del indol-3-acetaldehído (Taiz y Zeiger, 2002).



**Figura 2.6.1.1.** Biosíntesis de la auxina ácido indol acético en plantas (Adaptado de Taiz y Zeiger, 2002).

### 2.6.2 Citocininas

Las citocininas son un grupo de fitohormonas móviles producidas por plantas y microorganismos. La producción en las plantas asociadas a los microorganismos ha sido ampliamente documentada (Nieto y Frankenberger, 1990; Salamone *et al.*, 2001; Aloni *et al.*, 2006). Se ha reportado que la inoculación con bacterias capaces de producir citocininas puede incrementar los niveles de citocininas en el tejido de la raíz (Ortíz-Castro *et al.*, 2008).



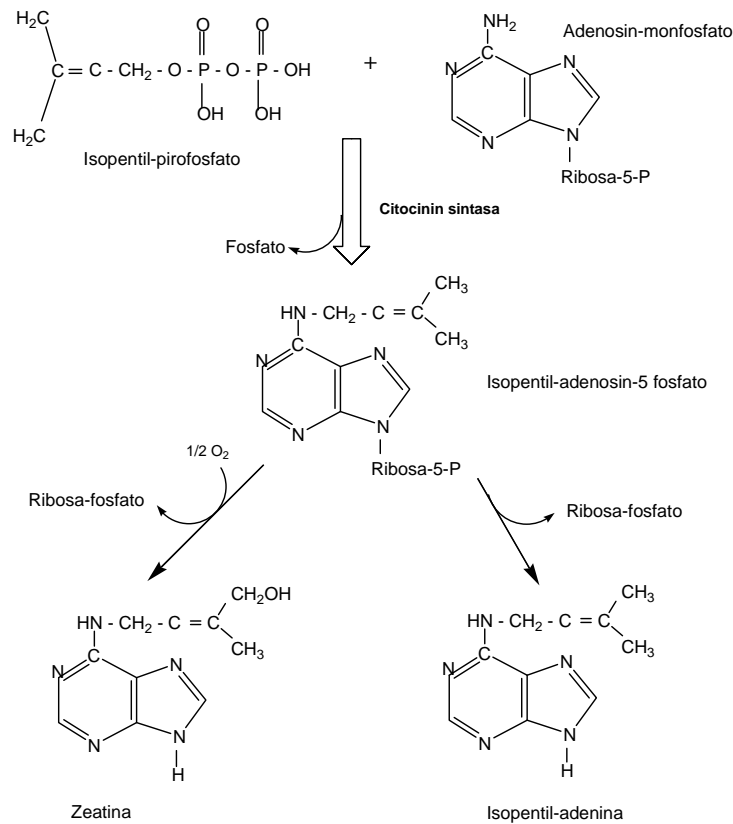
Las citocininas juegan un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo vegetal. Las fuentes de nitrógeno inorgánicas, tales como los nitratos, son el mayor regulador en la expresión de genes de la adenosina fosfato-isopentiltransferasa (IPT), una enzima clave en la biosíntesis de citocininas. La modulación del IPT y la expresión de genes involucrados en el transporte de nutrimentos en respuesta a los nitratos, sulfatos y fosfatos, juegan un papel crítico en el balance de la adquisición y distribución de macronutrientes (Hirose *et al.*, 2008). Las citocininas regulan la senescencia y expansión foliar, dominancia apical, proliferación de las células de la raíz, el crecimiento de raíces primarias y la formación de callos, la germinación de semillas, la acumulación de clorofila, filotaxis, competencia reproductiva y señalización nutrimental, además participan en el mantenimiento de las funciones del meristemo (Hirose *et al.*, 2008; Taiz y Zeiger, 2002). Estas fitohormonas son producidas por varios microorganismos como los siguientes géneros bacterianos: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Frankia*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Streptomyces* (Greene, 1980; Stevens *et al.*, 1988; Tien *et al.*, 1988; Cacciari *et al.*, 1989; Nieto y Frankenberger, 1990; Timmusk *et al.*, 1999; García de Salamone, 2001; Ortiz-Castro *et al.*, 2008).

#### 2.6.2.1 Biosíntesis de las citocininas en plantas

La enzima clave de la biosíntesis de las citocininas es la citocinina sintasa (EC 2.5.1.50), que cataliza la transferencia de un grupo isopentenil a partir de pirofosfato isopentenil a el nitrógeno N<sup>6</sup> de monofosfato de adenosina (AMP) (Figura 2.6.2.1). El producto, i<sup>6</sup>AdoAMP puede convertirse a la citocinina zeatina o i<sup>6</sup>Ade en muchos tejidos vegetales, las enzimas que catalizan estas reacciones aún no han sido caracterizadas (Taiz y Zeiger, 2002).

#### 2.6.3 Etileno

El etileno es una de las principales fitohormonas responsables de la regulación y la coordinación del metabolismo, desarrollo y morfogénesis vegetal. Regula la germinación de las semillas; la diferenciación de tejidos; la formación del parénquima de raíces y primordios en tallos y el desarrollo de yemas laterales (Smalle y Van Der Straeten, 1997). También juega un papel muy importante en la regulación de la polinización, en la iniciación de la floración, en la síntesis de antocianinas, en la producción de compuestos orgánicos volátiles (responsables del aroma de los frutos), en la hidrólisis de productos de almacén (almidón) y en la maduración de frutos (Taiz y Zeiger, 2002). Además, el etileno participa en las interacciones simbióticas planta-microorganismo, como ocurre entre *Rhizobium*-leguminosas, donde el etileno inhibe la colonización y la nodulación por *Rhizobium* (Lynch y Brown, 1997; Spaik, 1997).

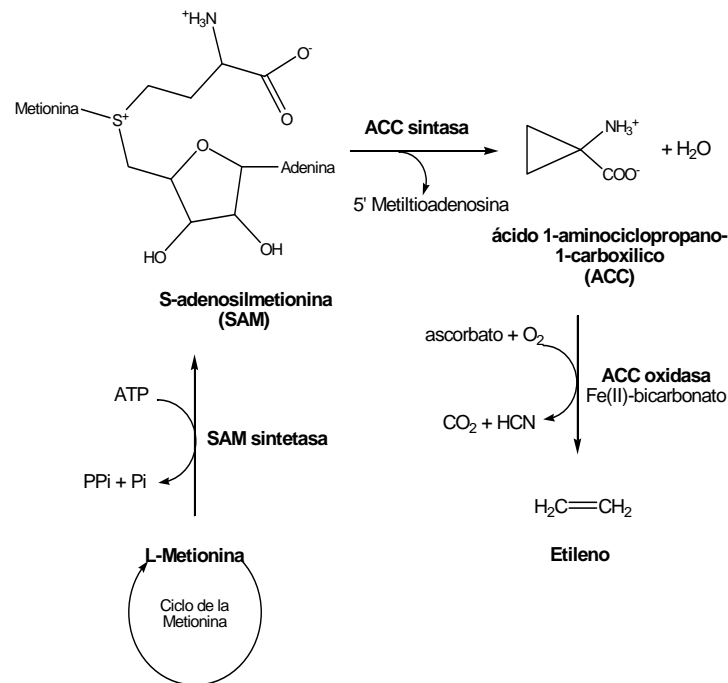


**Figura 2.6.2.1.** Biosíntesis de citocininas en plantas. Ver detalle en texto (Adaptado de Taiz y Zeiger, 2002).

El etileno es biológicamente activo a muy bajas concentraciones, menos de 1 ppm. Dependiendo de su concentración, de la naturaleza de los procesos fisiológicos y de la fase de desarrollo de la planta, puede promover o inhibir el desarrollo vegetal. Por ejemplo, un mecanismo de defensa de las plantas ante condiciones de estrés (sequía, anaerobiosis por inundación, calor, frío, ataque de fitopatógenos, toxicidad por metales pesados, acumulación excesiva de amonio y potasio o la deficiencia de nutrimentos como el nitrógeno, el fósforo, el calcio y el hierro), es incrementar la biosíntesis de etileno; sin embargo, esto provoca efectos adversos en la planta, como la inhibición de la elongación de la raíz e inducción la producción y elongación de raíces adventicias, acelerar la senescencia de flores, promover la abscisión de flores y frutos, y finalmente puede llegar a causar la muerte de la planta (Abeles *et al.*, 1992).

## 2.6.3.1 Biosíntesis del etileno en plantas

El sitio de síntesis y acción del etileno está localizado en cualquier tejido vegetal, de donde es liberado fácilmente y difundido a través de los espacios intercelulares y por fuera de ellos, dada su naturaleza gaseosa (Marschner, 1995). Su producción está regulada por un amplio número de factores, en los que se incluyen la temperatura, la luz, la gravedad, la nutrición y otras fitohormonas (Abeles *et al.*, 1992).



**Figura 2.6.3.1.** Biosíntesis del etileno en plantas y degradación del ACC. Ver detalle en el texto (Adaptado de Taiz y Zeiger, 2002).

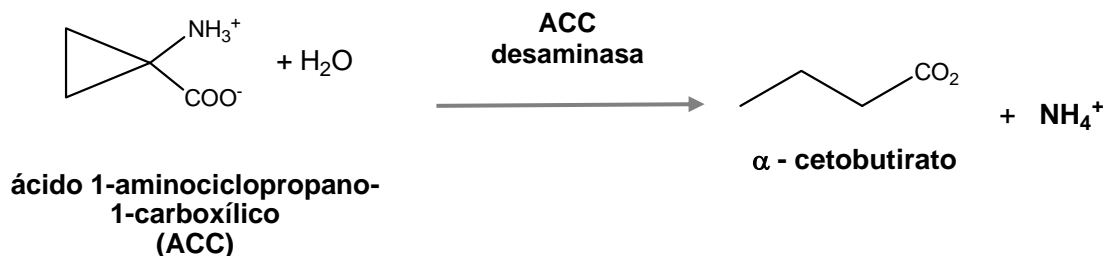
En plantas superiores, el etileno es sintetizado a partir del aminoácido L-metionina (figura 6.3.1), que se encuentra en los exudados de la raíz. La metionina es activada por el ATP para formar S-adenosilmetionina (SAM) (2) a través de la reacción catalizada por la enzima SAM sintetasa (EC 2.5.1.6) (1), la cual es inducida durante la senescencia o por condiciones de estrés ambiental. La SAM es convertida a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (4) mediante la enzima ACC sintasa (EC 4.4.1.14) (3) que utiliza piridoxal-5-fosfato como cofactor. Dicha enzima es estimulada por fitohormonas, tales como las auxinas (AIA), las citocininas (Z) y el propio etileno (Figura 2.1.5).

Finalmente, a partir del ACC el etileno es sintetizado por la enzima dependiente de fierro, ACC oxidasa (EC 1.14.17.4) (5), paso en el que además del etileno, también se producen  $\text{CO}_2$  y HCN (Ververidis y John, 1991). Esta reacción es dependiente del oxígeno y su síntesis se incrementa con el  $\text{CO}_2$ . El fierro ( $\text{Fe}^{++}$ ) actúa como cofactor y el ascorbato como cosustrato. La enzima ACC sintasa así como la ACC oxidasa tienen un tiempo de vida media corto y existen en bajas concentraciones en muchos de los tejidos vegetales (Hontzeas *et al.*, 2004). Las plantas pueden convertir también el ACC en N-malonil-ACC mediante la ACC N-malonil transferasa.

Se ha reportado que la emergencia e iniciación de primordios de raíces laterales es regulada por la interacción del etileno y las auxinas. Un estudio con *Arabidopsis thaliana* reveló que, cuando se aplican bajas concentraciones de ACC, existe un incremento en la síntesis de etileno y se promueve la iniciación de primordios de raíces laterales. Cuando se aplican dosis altas de ACC se inhibe fuertemente la habilidad de las plantas para iniciar la formación de primordios de raíces laterales, pero promueve la emergencia de los primordios de las raíces laterales ya existentes. Este efecto está correlacionado con la disminución en la longitud de las células del periciclo y el incremento en el grosor de las células de los primordios de las raíces laterales (Ivanchenko *et al.*, 2008).

## 2.7 La enzima ACC desaminasa

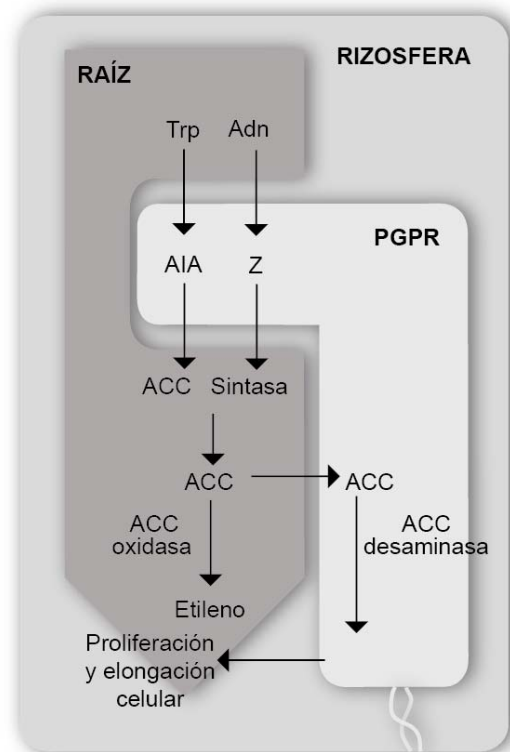
En 1998 se sugirió que algunas rizobacterias promueven el crecimiento vegetal mediante la disminución de los niveles de etileno en plantas, a través de la acción de una enzima que desamina al precursor inmediato del etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC): la enzima ACC desaminasa (EC 3.5.99.7) (Figura 2.7) (Glick *et al.*, 1998).



**Figura 2.7** Desaminación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor del etileno, por acción de la enzima ACC desaminasa (Tomado de Glick, 2005).

## 2.7.1 Intervención de la enzima ACC desaminasa en la biosíntesis del etileno en plantas

Las rizobacterias con actividad de la enzima ACC desaminasa promueven el crecimiento vegetal, no sólo por la disminución en el contenido de etileno, sino también por una generación de amonio producida en la rizosfera a partir del ACC (Figura 2.7.1) (Glick *et al.*, 1998; Glick *et al.*, 2007), lo cual provoca que tanto las plantas como los microorganismos de la rizosfera dispongan de una fuente extra de nitrógeno. Por tanto, este mecanismo se ha propuesto como un elemento clave en la asociación planta-microorganismo (Hontzeas *et al.*, 2004).



**Figura 2.7.1** Representación esquemática del modelo propuesto mediante el cual las PGPR disminuyen los niveles de etileno en plantas (mecanismo de la enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) o ACC desaminasa). El ácido indol-3-acético (AIA) y la zeatina (Z), producidas por las PGPR a partir del triptófano (Trp) y de la adenina (Adn), respectivamente, inducen la síntesis de la ACC sintasa para producir el ACC, el cual es transformado a etileno mediante la acción de la ACC oxidasa. Sin embargo, el ACC exudado por la planta es utilizado por las PGPR para hidrolizarlo hasta  $\alpha$ -cetobutirato ( $\alpha$ -CB) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a través de la ACC desaminasa. De esta forma se mantiene el equilibrio entre los niveles de ACC interno y externo, disminuyendo la biosíntesis de etileno en la planta. El amonio producido es utilizado por plantas y bacterias como una alternativa más de fuente de nitrógeno (Modificado de Glick *et al.*, 1998 y Madhaiyan *et al.*, 2006).

### 2.7.2 Perfil bioquímico de la enzima ACC desaminasa

La enzima ACC desaminasa es una enzima multimérica, posiblemente en forma de dímeros o trímeros con una masa molecular entre 68 y 112 kDa y una subunidad monomérica de 35 a 42 kDa. Es una enzima con un grupo sulfidrilo, que utiliza piridoxal-5-fosfato como cofactor esencial, el cual se une fuertemente a la enzima (una molécula por subunidad) (Glick, 2005). Es termodinámicamente estable, con una temperatura óptima de 30 a 35°C y un pH óptimo de 8.0 a 8.5. Se han reportado valores de  $K_m$  de la ACC desaminasa entre 1.5 y 9.2 mM para el ACC en diferentes microorganismos (Jacobson *et al.*, 1994; Hontzeas *et al.*, 2004).

La actividad enzimática de la ACC desaminasa es inducida por niveles bajos (100 nM) del ACC, si bien no presenta una alta afinidad por este sustrato. Lo anterior presenta dos grandes consecuencias: la primera es que la enzima ACC oxidasa (la cual cataliza la formación de etileno a partir del ACC) tiene mayor afinidad por el ACC que la enzima ACC desaminasa; por tanto, una forma para que ésta pueda competir efectivamente con la ACC oxidasa por el ACC es mediante un aumento en la cantidad de ACC desaminasa disponible. Para competir ventajosamente por el sustrato con la ACC oxidasa, la ACC debe estar en valores de 100 a 1000 veces mayores que los de la oxidasa. Dada la alta  $K_m$  de la desaminasa por el ACC, las concentraciones milimolares fisiológicas de su sustrato permiten una velocidad de la enzima proporcional a la magnitud de los cambios de concentración del ACC. Adicionalmente, la inducción de la síntesis de la enzima por bajas concentraciones de ACC, garantiza la utilización eficiente de este sustrato. Sin embargo, es importante considerar que los niveles de ACC desaminasa en diferentes microorganismos varían considerablemente, lo cual implica diversas formas de regulación de la actividad de la enzima, ya sea a nivel de la enzima misma o de la expresión de su gen (Glick, 2005).

### 2.7.3 Genética de la enzima ACC desaminasa

La enzima ACC desaminasa es codificada por el gen *acdS*, el cual ha sido identificado con una frecuencia relativamente alta en varios géneros bacterianos presentes en la rizosfera de diversos tipos de suelos de diferentes zonas geográficas. Su expresión es co-regulada por las proteínas *acdR* y *acdB* (Glick *et al.*, 1995; Belimov *et al.*, 2001; Blaha *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2008). Se ha documentado que la secuencia de nucleótidos que forman el gen *acdS* no es muy similar entre géneros bacterianos, ya que varía, incluso entre cepas del mismo género. De este modo, interesantemente se ha observado que, dentro de un género y especie en particular de un microorganismo, existen algunas cepas que presentan actividad de la enzima ACC desaminasa y otras no. Por ejemplo, mientras que cepas de *A. lipoferum* han sido recientemente reportadas por presentar el gen *acdS*, otras cepas de *A. brasilense* no lo

presentan (Holguín y Glick, 2001; Blaha *et al.*, 2006). Estas observaciones, y mediante un análisis filogenético de genes *acdS* conocidos llevado a cabo por Hontzeas y colaboradores (2005), sugieren que estos genes podrían ser adquiridos mediante transferencia horizontal, con evidencia de que los genes que codifican para la ACC desaminasa no permanezcan siempre en la parte integral del cromosoma del ADN del microorganismo, sino que se presente relativamente estable en plásmido (Glick *et al.*, 2007).

Algunos de los genes *acdS* identificados en bacterias, han sido aislados y usados para la transformación genética, tanto de plantas como de bacterias (Holguin y Glick, 2003). En bacterias, la transformación se ha realizado para aumentar el número de mecanismos promotores del crecimiento vegetal, lo que se ha logrado en cepas de *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium lotti* y *Azospirillum brasilense* (Holguín y Glick, 2001; Ma *et al.*, 2004; Nukui *et al.*, 2006). En el caso de plantas, el gen *acdS* fue utilizado para la transformación de a) jitomate (*Solanum lycopersicum*, Solanaceae), a fin de disminuir el proceso de maduración del fruto (Klee *et al.*, 1991; Klee, 1993); y b) canola (*Brassica napus*, Brassicaceae), para incrementar su tolerancia a metales pesados como cadmio, cobalto, cobre, níquel, plomo y zinc (Grichko *et al.*, 2000; Stearns *et al.*, 2005).

## 2.8 Bacterias que producen la enzima ACC desaminasa

La enzima ACC desaminasa fue identificada por primera vez por Honma y Shimomura en la levadura *Hansenula saturnus* (Honma y Shimomura, 1978); a partir de ello se ha logrado identificar en algunos hongos filamentosos como *Penicillium citrinum* (Jia *et al.*, 1999), y *Trichoderma asperellum* (Viterbo *et al.*, 2010), pero principalmente en bacterias nativas asociadas a plantas de varios tipos de suelos de diversos ambientes, e incluso en el intestino de larvas de lepidópteros (Jacobson *et al.*, 1994; Glick *et al.*, 1995; Belimov *et al.*, 2001; Indiragandhi *et al.*, 2008). Actualmente, se han reportado 38 géneros, distribuidos en 26 familias bacterianas con este mecanismo de acción (Cuadros 2.8.1 – 2.8.4). En estas bacterias, el gen *acdS* ha sido asociado con la presencia de la enzima ACC desaminasa (Glick *et al.* 1995; Belimov *et al.*, 2001; Penrose y Glick, 2001; Babalola *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003a; Mayak *et al.*, 2004a; Belimov *et al.*, 2005; Madhaiyan *et al.*, 2006).

**Cuadro 2.8.1** Géneros bacterianos reportados con actividad ACC desaminasa del Phylum Actinobacteria

Clase	Orden	Familia	Género y especie	Cepa	Actividad de la ACC desaminasa	Referencia
Actinobacteria	Actinomycetales	Gordoniaceae	<i>Gordonia</i> sp.	S2RP-17	n.d.	Hong <i>et al.</i> , 2010
		Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i> sp.	4N-4	10.5±0.2 μmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Belimov <i>et al.</i> , 2001, Belimov <i>et al.</i> , 2005
			<i>Rhodococcus</i> sp.	Fp2	833 nmol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Belimov <i>et al.</i> , 2001
		Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	Ps9	n.d.	Sgroy <i>et al.</i> , 2009
			<i>Brevibacterium epidermidis</i>	RS15	2.37±0.48 μmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Siddikee <i>et al.</i> , 2010
			<i>Brevibacterium iodinum</i>	RS16	4.13±1.05 μmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Siddikee <i>et al.</i> , 2010
		Dermabacteraceae	<i>Brachybacterium saurashtrense</i>	JG 06 T	0.22 μmol α-CB μg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Gontia <i>et al.</i> , 2011
		Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i> sp.	F10a	5.4±0.2 μmol α-CB L <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Sheng <i>et al.</i> , 2009
		Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i> sp.	NII-0909	n.d.	Dastager <i>et al.</i> , 2010
			<i>Micrococcus yunnanensis</i>	RS222	0.82±0.09 μmol α-CB μg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Siddikee <i>et al.</i> , 2010
		Streptomycetales	<i>Streptomyces albeovinaceus</i>	No. 41	296.26 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	El-Tarabily, 2008
			<i>Streptomyces atrovirens</i>	No. 26	176.44 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	El-Tarabily, 2008
			<i>Streptomyces filipinensis</i>	No. 15	388.57 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	El-Tarabily, 2008
			<i>Streptomyces</i> sp.	No. 61	354.94 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	El-Tarabily, 2008

α-CB: α-cetobutirato; n.d.=no determinado, la cepa fue transformada genéticamente o fue seleccionada por su desarrollo en medio mineral adicionado con el compuesto ACC como única fuente de nitrógeno.



**Cuadro 2.8.2** Géneros bacterianos reportados con actividad ACC desaminasa del Phylum Firmicutes

Clase	Orden	Familia	Género y especie	Cepa	Actividad de la ACC desaminasa	Referencia
Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus pumilus</i>	Fp1	760 nmol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Belimov <i>et al.</i> , 2001
			<i>Bacillus circulans</i>	DUC1	2.24×10 <sup>-9</sup> ±4.64 × 10 <sup>-11</sup> nkat mg <sup>-1</sup> proteína	Ghosh <i>et al.</i> , 2003
			<i>Bacillus firmus</i>	DUC2	2.30×10 <sup>-9</sup> ±5.57×10 <sup>-11</sup> nkat mg <sup>-1</sup> proteína	Ghosh <i>et al.</i> , 2003
			<i>Bacillus globisporus</i>	DUC3	2.28×10 <sup>-9</sup> ±5.10×10 <sup>-11</sup> nkat mg <sup>-1</sup>	Ghosh <i>et al.</i> , 2003
			<i>Bacillus stratosphericus</i>	RS233	1.93±0.54 μmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Siddikee <i>et al.</i> , 2010
			<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	Ps7	n.d.	Sgroy <i>et al.</i> , 2009
		Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i> sp.	RFNB4	130±1.25 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Islam <i>et al.</i> , 2009

α-CB: α-cetobutirato; n.d.=no determinado, la cepa fue transformada genéticamente o fue seleccionada por su desarrollo en medio mineral adicionado con el compuesto ACC como única fuente de nitrógeno.

**Cuadro 2.8.3a** Géneros bacterianos reportados con actividad ACC desaminasa del Phylum Proteobacteria

Clase	Orden	Familia	Género y especie	Cepa	Actividad de la ACC desaminasa	Referencia	
Alfa-proteobacteria	Caulobacteriales	Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i> sp.	RFNB32	68.9±0.46 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Islam <i>et al.</i> , 2009	
			<i>Brevundimonas</i> sp.	RFNB15	126±0.75 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Islam <i>et al.</i> , 2010	
	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae		<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	USDA110	n. d.	Wei <i>et al.</i> , 2008
				Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium oryzae</i>	CBMB20	94.48±6.83 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>
				<i>Methylobacterium</i> sp	CBMB110	24.74±4.12 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2006
		Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium lotti</i>	MAFF303099	n. d.	Nukui <i>et al.</i> , 2006	
		Rhizobiaceae		<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Rm1021	n. d.	Ma <i>et al.</i> , 2004
				<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	CBCEN26	75.5±3.18 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína min <sup>-1</sup>	Yim <i>et al.</i> , 2009
				<i>Rhizobium gallicum</i>	PB2	82 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Duan <i>et al.</i> , 2009
				<i>Rhizobium leguminosarum</i>	128C53K	1.06±0.17 μmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Ma <i>et al.</i> , 2003a; Ma <i>et al.</i> , 2003b
		Xanthobacteraceae	<i>Azorhizobium</i> sp.	RFNB31	186.8±2.77 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Islam <i>et al.</i> , 2009	
		Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	<i>Azospirillum lipoferum</i>	CRT1	n. d.	Blaha <i>et al.</i> , 2006
	<i>Azospirillum lipoferum</i>			4B	n. d.	Blaha <i>et al.</i> , 2006	
	<i>Azospirillum lipoferum</i>			CN1	n. d.	Blaha <i>et al.</i> , 2006	
	<i>Azospirillum lipoferum</i>			N4	n. d.	Blaha <i>et al.</i> , 2006	
	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i> sp.	RFNB22	220.6±1.18 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Islam <i>et al.</i> , 2009	

α-CB: α-cetobutirato; n.d.=no determinado, la cepa fue transformada genéticamente o fue seleccionada por su desarrollo en medio mineral adicionado con el compuesto ACC como única fuente de nitrógeno.

**Cuadro 2.8.3b** Géneros bacterianos reportados con actividad ACC desaminasa del Phylum Proteobacteria

Clase	Orden	Familia	Género y especie	Cepa	Actividad de la ACC desaminasa	Referencia
Beta-proteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Achromobacter piechaudii</i>	ARV8	n. d.	Mayak <i>et al.</i> , 2004a; 2004b
			<i>Achromobacter</i> sp.	GKA1	3.89±0.25 $\mu\text{mol } \alpha\text{-CB mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$	Govindasamy <i>et al.</i> , 2008
		Burkholderiaceae	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Cm3	555 nmol $\text{NH}_4^+ \text{ mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$	Belimov <i>et al.</i> , 2001
			<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Cm4	151 nmol $\text{NH}_4^+ \text{ mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$	Belimov <i>et al.</i> , 2001
			<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Ep3	305 nmol $\text{NH}_4^+ \text{ mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$	Belimov <i>et al.</i> , 2001
			<i>Alcaligenes</i> sp.	Cm1	1172 nmol $\text{NH}_4^+ \text{ mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$	Belimov <i>et al.</i> , 2001
			<i>Burkholderia</i> sp	MSSP	0.45 IU $\text{ml}^{-1}$ después de 72 h	Pandey <i>et al.</i> , 2005
			<i>Burkholderia phytotfirmans</i>	PsJN	4032±108 nmol $\text{NH}_4^+ \text{ mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$	Sun <i>et al.</i> , 2009
		Comamonadaceae	<i>Acidovorax facilis</i>	AY197008	0.7±0.1 $\mu\text{mol } \alpha\text{-CB mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$	Belimov <i>et al.</i> , 2005
			<i>Variovorax paradoxus</i>	2C-1	6.20±0.10 $\mu\text{mol } \alpha\text{-CB mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$	Belimov <i>et al.</i> , 2001; Belimov <i>et al.</i> , 2005
	<i>Variovorax paradoxus</i>		2P-1	6.40±0.10 $\mu\text{mol } \alpha\text{-CB mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$	Belimov <i>et al.</i> , 2005	
	<i>Variovorax paradoxus</i>		3C-3	9.40±0.80 $\mu\text{mol } \alpha\text{-CB mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$	Belimov <i>et al.</i> , 2005	
	<i>Variovorax paradoxus</i>		Bm2	209 nmol $\text{NH}_4^+ \text{ mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$	Belimov <i>et al.</i> , 2001	
	Methylophiliales	Oxalobacteraceae	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	GSF30(T)	n. d.	Rothballer <i>et al.</i> , 2008
		Methylophilaceae	<i>Methylophilus rhizosphaerae</i>	CBMB127(T), CBMB145	n.d.	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2009
<i>Methylophilus methylotrophus</i>			CBMB147	n.d.	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2009	

$\alpha\text{-CB}$ :  $\alpha\text{-cetobutirato}$ ; n.d.=no determinado, la cepa fue transformada genéticamente o fue seleccionada por su desarrollo en medio mineral adicionado con el compuesto ACC como única fuente de nitrógeno.

**Cuadro 2.8.3c** Géneros bacterianos reportados con actividad ACC desaminasa del Phylum Proteobacteria

Clase	Orden	Familia	Género y especie	Cepa	Actividad de la ACC desaminasa	Referencia	
Gamma-proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cloacae</i>	CAL2	4.13±0.08 µmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Shah <i>et al.</i> , 1998	
			<i>Enterobacter cloacae</i>	UW4	2.43±0.04 µmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Holguin y Glick, 2001; Li <i>et al.</i> , 2001	
			<i>Escherichia coli</i>	pRKACC	1.74±0.06 µmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Holguin y Glick, 2001	
			<i>Klebsiella oxytoca</i>	10MKR7	n. d.	Babalola <i>et al.</i> , 2003	
			<i>Kluyvera ascorbata</i>	SUD165	26 nmol NH <sub>3</sub> g <sup>-1</sup> biomasa h <sup>-1</sup> , 31.4 nmol α-KB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Burd <i>et al.</i> , 1998; 2000	
			<i>Rahnella aquatilis</i>	NBRI K3	7.5±0.5 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Kumar <i>et al.</i> , 2009	
			<i>Serratia proteamaculans</i>	M35	276±16 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Zahir <i>et al.</i> , 2009	
			Moraxellaceae	<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i>	BIHB 723	n. d.	Gulati <i>et al.</i> , 2009
				<i>Psychrobacter</i> sp.	SN9	19±2 Mmol α-CB mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Ma <i>et al.</i> , 2009
			Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	Am3	1073 nmol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
	<i>Pseudomonas entomophila</i>	PS-PJH			23.8±0.4 µmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Kamala-Kannan <i>et al.</i> , 2010	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	TDK1			n.d.	Saravanakumar y Samiyappan, 2007	
	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Dp1			890 nmol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Belimov <i>et al.</i> , 2001	
	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	Ep4			537 nmol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Belimov <i>et al.</i> , 2001	
	<i>Pseudomonas putida</i>	UW4			544 nmol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Belimov <i>et al.</i> , 2001	
	<i>Pseudomonas putida</i>	Am2			380 nmol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Belimov <i>et al.</i> , 2001	
	<i>Pseudomonas putida</i>	Bm3			972 nmol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Belimov <i>et al.</i> , 2001	
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Ep2	n.d.	Belimov <i>et al.</i> , 2001			
	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Xanthomonas</i> sp.	RFNB24	118.8±0.69 nmol α-CB mg <sup>-1</sup> proteína h <sup>-1</sup>	Islam <i>et al.</i> , 2009	

α-CB: α-cetobutirato; n.d.=no determinado, la cepa fue transformada genéticamente o fue seleccionada por su desarrollo en medio mineral adicionado con el compuesto ACC como única fuente de nitrógeno.

**Cuadro 2.8.4** Géneros bacterianos reportados con actividad ACC desaminasa del Phylum Bacteroidetes

Clase	Orden	Familia	Género y especie	Cepa	Actividad de la ACC desaminasa	Referencia
Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium aquaticum</i>	PUPC1	n.d.	Gandhi-Pragash <i>et al.</i> , 2009

$\alpha$ -CB:  $\alpha$ -cetobutirato; n.d.=no determinado, la cepa fue transformada genéticamente o fue seleccionada por su desarrollo en medio mineral adicionado con el compuesto ACC como única fuente de nitrógeno.

A pesar de que el compuesto ACC ha sido identificado dentro de los exudados de la raíz, la enzima ACC desaminasa no había sido identificada en plantas; sin embargo, en 2009, se reportó la presencia de ésta en extractos de plantas de *Arabidopsis* y de jitomate (McDonnell *et al.*, 2009; Plett *et al.*, 2009). Lo anterior sugiere que existe una transferencia de genes *acdS* entre plantas y bacteria, sean éstas últimas de efecto promotor del crecimiento o patogénico para la planta (Blaha *et al.*, 2006).

### 2.8.1 Importancia de la inoculación de plantas con bacterias productoras de la ACC desaminasa

Las bacterias del suelo que contienen a la enzima ACC desaminasa juegan un papel muy importante en el desarrollo de plantas expuestas a factores de estrés biótico y abiótico, ya que facilitan la absorción de nutrimentos y agua, incrementando así la biomasa y el rendimiento de los cultivos. Su efecto depende significativamente de varios factores, por ejemplo el estatus nutrimental de la planta y el abuso de las prácticas agrícolas (Morgan y Drew, 1997; Belimov *et al.*, 2002; Castro-Sowinski *et al.*, 2007). A continuación se mencionan algunos efectos benéficos de la inoculación en plantas con algunas cepas PGPR-ACC desaminasa nativas o transformadas.

#### 2.8.1.1 Estrés hídrico por salinidad

La bacteria *Pseudomonas fluorescens* TDK1, proporciona resistencia al estrés salino en plantas de cacahuate (*Arachis hypogea*, Fabaceae), incrementando la producción del cultivo (Saravanakumar y Samiyappa, 2007).

La bacteria *Achromobacter piechaudii* ARV8 favorece la eficiencia del uso del agua, ya que reduce la producción de etileno e incrementa significativamente el peso fresco y seco de plantas de jitomate y de pimiento (*Capsicum annuum*, Solanaceae) en presencia de altas concentraciones de NaCl. En un ambiente con escasez de agua, *A. piechaudii* mejora significativamente la recuperación de las plantas de jitomate cuando el riego es restablecido (Mayak *et al.*, 2004a; Mayak *et al.*, 2004b).

#### 2.8.1.2 Estrés anaeróbico

Las cepas *Enterobacter cloacae* UW4, *E. cloacae* CAL2, y *Pseudomonas putida* ATCC17399/pRKACC (genéticamente transformada), protegen eficazmente a plantas de jitomate contra el estrés por inundación o anaeróbico; promueven significativamente el desarrollo vegetal, aumentan la cantidad de clorofila en las hojas y decrecen sustancialmente la producción foliar de etileno (Grichko y Glick, 2001a; Grichko y Glick, 2001b).

### 2.8.1.3 Ataque de plantas por fitopatógenos

La reducción de la biosíntesis del etileno en plantas de jitomate transformadas con el gen de la enzima ACC desaminasa de la bacteria *Enterobacter cloacae* UW4 disminuye los síntomas de la enfermedad causada por el hongo fitopatógeno *Verticillium* (Robison *et al.*, 2001).

La bacteria *Pseudomonas brassicacearum* Am3, puede mostrar tanto propiedades patogénicas como de PGPR en su interacción con plantas de jitomate (Belimov *et al.*, 2007).

### 2.8.1.4 Contaminación del suelo por metales pesados e hidrocarburos

Se ha reportado que las plantas de canola y jitomate inoculadas con *Kluyvera ascorbata* SUD165, crecen en altas concentraciones de cloruro de níquel, disminuyendo los niveles de etileno producidos por el estrés inducido por la presencia del metal (Burd *et al.*, 1998). Las plantas transgénicas de canola que expresan el gen que codifica para la enzima ACC desaminasa de la bacteria *Enterobacter cloacae* UW4, presentan la capacidad de crecer en altas concentraciones de arsenato y de níquel en el suelo, además de acumular este metal en el tejido vegetal. La bacteria *Enterobacter cloacae* CAL2, facilita la promoción del desarrollo de plantas de canola transformadas y no transformadas, en presencia de arsenato (Nie *et al.*, 2002). En tanto que, cuando son inoculadas con *Pseudomonas putida* HS-2, aislada de suelos contaminados con níquel, incrementan significativamente su biomasa y favorecen la absorción de níquel en raíces y follaje. De hecho, estos resultados han catalogado a la cepa HS-2 como una candidata potencial para ser usada tanto en protocolos para biorremediación como para promover el desarrollo vegetal (Rodríguez *et al.*, 2008).

La bacteria *Pseudomonas asplenii* AC, genéticamente transformada, incrementa la germinación y el desarrollo vegetal de plantas de carrizo (*Phragmites australis*, Poaceae) en presencia de cobre e hidrocarburos aromáticos como la creosota, un hecho muy importante para el área de la fitorremediación porque el carrizo es una planta tradicionalmente usada para depurar aguas residuales, ya que es tolerante a metales pesados (Reed *et al.*, 2005).

Plantas transgénicas de jitomate que expresan la enzima ACC desaminasa (controladas por el promotor PRB-1b), acumulan una gran cantidad de metal dentro del tejido vegetal y disminuyen el efecto deletéreo de metales pesados como Cd, Co, Cu, Mg, Ni, Pb o Zn en el desarrollo de la planta, en comparación con las plantas no transgénicas (Grichko *et al.*, 2000).

Especies como *Alcaligenes xylosoxidans*, *Alcaligenes* sp., *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp. y *Variovorax paradoxus*, estimulan la germinación de plántulas de mostaza parda (*Brassica juncea*, Brassicaceae) y canola. Además, son tolerantes a la toxicidad de cadmio y estimulan la elongación de la raíz en plántulas de canola (Belimov *et al.*, 2001). Bacterias modificadas genéticamente para expresar la actividad ACC desaminasa mejoran la degradación de tolueno en plantas (Glick, 2004).

#### 2.8.1.5 Deficiencia nutrimental y aplicación de fertilizantes

Algunas PGPR que tienen la capacidad de sintetizar la enzima ACC desaminasa favorecen la sobrevivencia de plántulas, protegiéndolas contra los efectos inhibitorios provocados por altas o bajas concentraciones de nutrimentos (Abeles *et al.*, 1992; Lynch y Brown, 1997; Belimov *et al.*, 2002; Shaharoon *et al.*, 2008).

La bacteria *Pseudomonas fluorescens* biotipo G (N<sub>3</sub>) mejora el desarrollo y rendimiento de plantas de maíz (*Zea mays*, Poaceae) en presencia de fertilizante nitrogenado aplicado en dosis óptimas (Shaharoon *et al.*, 2006).

Ha sido documentado que, en presencia de dosis óptimas o apropiadas de fertilizantes nitrogenados, la inoculación con PGPR capaces de sintetizar la enzima ACC desaminasa mejora el desarrollo y rendimiento de las plantas inoculadas (Tahir *et al.*, 2006; Shaharoon *et al.*, 2006; Shaharoon *et al.*, 2008). Un importante efecto de la inoculación con PGPR-ACC desaminasa es la reducción en la aplicación de nitrógeno inorgánico que requieren los sistemas agrícolas.

#### 2.8.2 Inoculación de plantas con bacterias productoras de ACC desaminasa y HMA

El efecto producido por la inoculación conjunta de bacterias ACC desaminasa y HMA ha sido estudiado muy poco. Se ha reportado que la inoculación de plantas de pepino (*Cucumis sativus*, Cucurbitaceae) con *Pseudomonas putida* UW4 y el HMA *Gigaspora rosea* BEG9 inducen efectos sinérgicos en la biomasa vegetal, la longitud de la raíz, el área foliar y la actividad fotosintética; además se demostró que *Pseudomonas putida* UW4 incrementa la colonización de *Gigaspora rosea* BEG9 en raíces (Gamalero *et al.*, 2008). Este mismo efecto se observó al someter a las plantas al estrés hídrico por salinidad (Gamalero *et al.*, 2010). Lo anterior sugiere que existe un papel muy importante de la enzima ACC desaminasa en el establecimiento y desarrollo de la simbiosis micorrízica.



---

**Literatura citada**

Abeles F.B., Morgan P.W. y Saltveit M.E.Jr. 1992. Ethylene in plant biology. Academia Press, San Diego, CA, USA, 414 pp.

Aguilar-Piedras J.J., Xiqui-Vázquez M.L., García-García S. y Baca B.E. 2008. Producción de lindol-3-acético en *Azospirillum*. Rev Lat Microbiol 50: 29-37.

Akiyama K., Ogasawara S., Ito S. y Hayashi H. 2010. Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. Plant Cell Physiol 51: 1104-1117.

Alarcón A. 2007. Micorriza arbuscular. En: Ferrera-Cerrato y Alarcón A. Microbiología Agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. pp. 90-119. Trillas S.A. de C.V. México.

Alguacil-Martín S. 2010. Estrigolactonas: nuevas hormonas vegetales. Servicio de Divulgación Científica de la EEZ-CSIC. <http://www.eez.csic.es/files/NOTA%20DE%20PRENSA23-04-2010.pdf> Revisado el 15 de junio de 2010.

Aloni R., Aloni E., Laghans M. y Ullrich Cl. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. Ann Bot 97: 883-93.

Anaya, A.L. 2003. Ecología Química. Plaza y Valdés. México DF., 349 pp.

Babalola O.O., Osir E.O., Sanni A.I., Odhiambo G.D. y Bulimo W.D. 2003. Amplification of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic (ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in *Striga*-infested soil. Afr J Biotechnol 2: 157-160.

Badri D.V. y Vivanco J.M. 2009. Regulation and function of root exudates. Plant Cell Environ 32: 666-681.

Badri D.V., Weir T.L., Van der Lelie D. y Vivanco J.M. 2009. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. Curr Opin Biotechnol 20: 642-650.

Bago B., Pfeffer P.E., Abubaker J., Jun J., Allen J.W., Brouillette J., Douds D.D., Lammers P.J. y Shachar-Hill Y. 2003. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrates as well as lipid. Plant Physiol 131: 1496-1507.

Bago B., Zipfel W., Williams R.M., Jun J., Arreola R., Lammers P.J., Pfeffer P.E. y Shachar-Hill Y. 2002. Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Plant Physiol 128: 108-124.

Bago B., Pfeffer P.E. y Shachar-Hill Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. Plant Physiol 124: 949-957.

Bago B., Azcón-Aguilar C. y Piché Y. 1998. Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growth under monoxenic conditions. Mycologia 90: 52-62.

Bashan Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnol Adv 16: 729-770.

Bashan Y. y de-Bashan L.E. 2005. Bacteria Plant Growth-Promoting. In: Encyclopedia of soil in the environment. D. Hillel, Elsevier, Oxford, U.K. 1: 103-115.

Bashan Y., Holguín G. y de-Bashan L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can J Microbiol 50: 521-577.

Bashan Y. y Holguín G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Can J Microbiol 43: 103-121.

Bashan Y. y Levanony H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* is a challenge for agriculture. Can J Microbiol 36: 591-608.

Belimov A.A., Safronova V.I., Sergeyeva T.A., Egorova T.N., Matveyeva V.A., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Kluge C., Preisfeld A., Dietz K.J. y Stepanok V.V. 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Can J Microbiol 47: 642-652.

Belimov A.A., Safronova V.I. y Mimura T. 2002. Response of spring rape (*Brassica napus* var. *oleifera* L.) to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase depends on nutrient status of the plant. Can J Microbiol 48: 189-199.

Belimov A.A., Hontzeas N., Safronova V.I., Demchinskaya S.V., Piluzza G., Bullitta S. y Glick BR. 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). Soil Biol Biochem 37: 241-250.

Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Hontzeas N. y Davies W.J. 2007. *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. J Exp Bot 58: 1485-1496.

Bécard G. y Piché Y. 1989. Fungal growth stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Appl Environ Microbiol 55: 2320-2325.

Berg G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Appl Microbiol Biotechnol 84: 11-18.

Blaha D., Prigent-Combaret C., Sajjad M.M. y Moënne-Loccoz Y. 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. FEMS Microbiol Ecol 56: 455-470.

Bonfante P. y Anca I.A. 2009. Plants, mycorrhizal fungi and bacteria: a network of interactions. Annu Rev Microbiol 63: 363-383.

Bonfante P. y Genre A. 2008. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. Trends Plant Sci 13: 492-498.

Bonfante P. 2003. Plants, mycorrhizal fungi and endobacteria: a dialog among cells and genomes. *Biol Bull* 204: 215-220.

Bonfante P., Biaciotto V., Ruíz-Lozano J.M., Minerdi D., Lumini E. y Perotto S. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi and their endobacteria. pp 323-337. En: *Symbiosis*. Seckbach J. (ed.) Kluwer, Dordrecht.

Buee M., Rossignol M., Jauneau A., Ranjeva R. y Becard G. 2000. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 693-698.

Burd G.I., Dixon D.G. y Glick B.R. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol* 46: 237-245.

Burd G.I., Dixon D.G. y Glick B.R. 1998. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl Environ Microbiol* 64: 3663-3668.

Burdman S., Dulguerova G., Okon Y. y Jurkevitch E. 2001. Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 555-561.

Cacciari I., Lippi D. y Pietrosanti T. 1989. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum spp.* and *Arthrobacter*. *Plant Soil* 115: 151-153.

Castro-Sowinski S., Herschkovitz Y., Okon Y. y Jurkevitch E. 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 276: 1-11.

Cheng Z., Duncker B.P., McConkey B.J. y Glick B.R. 2008. Transcriptional regulation of ACC deaminase gene expression in *Pseudomonas putida* UW4. *Can J Microbiol* 54: 128-136.

Clapp J.P., Rodríguez A. y Dodd J.C. 2001. Inter- and intra- isolated rRNA large sub-unit variation in spores of *Glomus coronatum*. *New Phytol* 149: 539-554.

Costacurta A. y Vanderleyden J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol* 21: 1-18.

Crozier A., Arruda P., Jasmim J.M., Monteiro A.M. y Sandberg G. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol* 54: 2833-2837.

Curl E.A. y Truelove B. 1986. *The Rhizosphere*. Springer-Verlag, Berlin, 288 pp.

Dastager S.G., Deepa C.K. y Pandey A. 2010. Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp. NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiol Biochem* 48: 987-992.

Davison J. 1988. Plant beneficial bacteria. *BioTech* 6: 282-286.

- Dakshini K.M.M., Foy C.L. y Inderjit. 1999. Allelopathy: one component in a multifaceted approach to ecology. En: Principles and procedures in plant ecology: Allelochemical Interactions (Eds., Inderjit, K.M.M. Dakshini y C.L. Foy). pp. 3-14. CRC Press, New York.
- DeWeert S., Vermeiren H., Mulders I.H., Kuiper I., Hendrickx N., Bloemberg G.V., Vanderleydden J., De Mot R. y Lugtenberg B.J. 2002. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 1173-80.
- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera-González C., Caballero-Mellado J., Aguirre J.F., Kapulnik Y., Brener S., Burdman S., Kadouri D., Sarig S. y Okon Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust J Plant Physiol* 28: 871-879.
- Dobbelaere S., Vanderleyden J. y Okon Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* 22: 107-149.
- Döbereiner J. 1992. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. En: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W. y Schleifer K.H. (Eds.). The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. pp. 2236-2253. Springer-Verlag. New York, USA.
- Duan J., Müller K.M., Charles T.C., Vesely S. y Glick B.R. 2009. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from southern Saskatchewan. *Microbiol Ecol* 57: 423-436.
- Eckert B., Weber O.B., Kirchhof G., Halbritter A., Stoffels M. y Hartmann A. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 17-26.
- El-Tarabily K.A. 2008. Promotion of tomato (*Lycopersion esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant Soil* 308: 161-174.
- Esquivel-Cote R., Ramírez-Gama R.M., Tsuzuki-Reyes G., Orozco-Segovia A., Huante P. 2010. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. *Plant Soil* 337: 65-75.
- Ferrera-Cerrato R. y Alarcón A. 2007. Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta organismo. Trillas, México, México. 568pp.
- Fitter A.H. 2006. What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function. *New Phytologist* 172: 3-6.
- Frey-Klett P., Garbaye J. y Tarkka M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol* 176: 22-36.
- Gamalero E., Berta G., Massa N., Glick B.R. y Lingua G. 2010. Interactions between *Pseudomonas putida* UW4 and *Gigaspora rosea* BEG9 and their consequences for the growth of cucumber under salt-stress conditions. *J Appl Microbiol* 108: 236-245.

Gamalero E., Berta G., Massa N., Glick B.R. y Lingua G. 2008. Synergistic interactions between the ACC deaminase-producing bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and the AM fungus *Gigaspora rosea* positively affect cucumber plant growth. *FEMS Microbiol Ecol* 64: 459-467.

Gandhi-Pragash M., Narayanan K.B., Naik P.R. y Sakthivel N. 2009. Characterization of *Cryseobacterium aquaticum* strain PUPC1 producing a novel antifungal protease from rice rhizosphere soil. *J Microbiol Biotechnol* 19: 99-107.

Garbaye J. 1994. Helper bacteria: a new dimensión to mycorrhizal simbiosis. *New Phytol* 128:197-210.

García de Salamone I.E., Hynes R.K. y Nelson L.M. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J Microbiol* 47: 404-411.

Genre A., Chabaud M., Timmers T., Bonfante P. y Barker D.G. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* 17: 3489-3499.

Genre A., Chabaud M., Faccio A., Barker D.G. y Bonfante P. 2008. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* 20: 1407-1420.

Ghosh S., Penterman J.N., Little R.D., Chávez R. y Glick B.R. 2003. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. *Plant Physiol Biochem* 41: 277-281.

Gianinazzi S., Gollotte A., Binet M.N., van Tuinen D., Redecker D. y Wipf D. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystems services. *Mycorrhiza* 20: 519-530.

Gianinazzi-Pearson V., Branzanti B. y Gianinazzi S. 1989. In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7: 243-255.

Giovannetti M., Sbrana C., Avio L., Citernesi A.S. y Logi C. 1993. Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytol* 125: 587-593.

Glick B.R., Todorovic B., Czarny J., Cheng Z., Duan J. y McConkey B. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit Rev Plant Sci* 26: 227-242.

Glick B.R. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett* 251: 1-7.

Glick B.R. 2004. Teamwork in phytoremediation. Genetically modified (GM) bacteria improve the degradation of toluene in plants. *Nature Biotechnol* 22: 526-527.

Glick B.R., Penrose D.M. y Li J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor Biol* 190: 63-68.

Glick B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41: 109-117.

Glick B.R., Karaturovic D.M. y Newell P.C. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Can J Microbiol* 41: 533-536.

González-Guerrero M., Azcón-Aguilar C., Mooney M., Valderas A., MacDiarmid C.W., Eide D.J. y Ferrol N. 2005. Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genet Biol* 42: 130-140.

Gontia I., Kavita K., Schmid M., Hartmann A. y Jha B. 2011. *Brachybacterium saurashtrense* sp. nov., a halotolerant root-associated bacterium with plant growth promoting potential. *Int J Syst Evol Microbiol* En prensa.

Govindarajulu M., Pfeffer P.E., Jin H., Abubaker J., Douds D.D., Allen J.W., Bücking H., Lammers P.J. y Shachar-Hill Y. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435: 819-823.

Govindasamy V., Senthilkumar M., Gaikwad K. y Annapurna K. 2008. Isolation and characterization of ACC deaminase gene from two plant growth-promoting rhizobacteria. *Curr Microbiol* 57: 312-317.

Greene E.M. 1980. Cytokinin production by microorganisms. *Bot Rev* 46: 25-74.

Grichko V.P., Filby B. y Glick B.R. 2000. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *J Biotechnol* 81: 45-53.

Grichko V.P. y Glick B.R. 2001a. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol Biochem* 39: 11-17.

Grichko V.P y Glick B.R. 2001b. Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiol Biochem* 39: 1-9.

Griffith B.S., Ritz K., Ebbelwhite N. y Dobson G. 1999. Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol Biochem* 39: 11-17.

Guadarrama P., Álvarez-Sánchez J. y Estrada-Torres A. 2004. Phosphorus dependence in seedlings of a tropical pioneer tree: the role of arbuscular mycorrhizae. *J Plant Nutr* 27: 2159-2174.

Guilfoyle T.J. y Hagen G. 2007. Auxin response factors. *Curr. Opin. Plant Biol* 10: 453-460.

Gulati A., Vyas P., Rahi P. y Kasana R.C. 2009. Plant growth-promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. *Curr Microbiol* 58: 371-377.

Gunarto L., Adachi K. y Senboku T. 1999. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. from a subtropical island, and effect of inoculation on growth of low land rice under several levels of N application. *Biol Fertil Soils* 28: 129-135.

Harrison M.J. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol* 59: 19-42.

Harrison M. y van Buuren M. 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626-629.

- Hartmann A., Schmid M., van Tuinen D. y Berg G. 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321: 235-257.
- Hartmann A., Singh M. y Klingmüller W. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indolacetic acid. *Can J Microbiol* 29: 916-923.
- Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada, Hayashi H. y Sakakibara H. 2008. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* 59: 75-83.
- Hodge A., Campbell C.D. y Fitter A.H. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413: 297-299.
- Holguín G. y Glick B.R. 2001. Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb Ecol* 41: 281-288.
- Holguín Z.G. y Glick B.R. 2003. Transformation of *Azospirillum brasilense* Cd with an ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 fused to the Tetr gene promoter improves its fitness and plant growth promoting ability. *Microb Ecol* 46: 122-133.
- Hong S.H., Ryu H., Kim J. y Cho K.S. 2010. Rhizoremediation of diesel-contaminated soil using the plant growth-promoting rhizobacterium *Gordonia* sp. S2RP-17. *Biodegradation* 22: 593-601.
- Honma M. y Shimomura T. 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric Biol Chem* 42: 1825-1831.
- Hontzeas N., Richardson A.O., Belimov A.A., Safranova V.I., Abu-Omar M M. y Glick B.R. 2005. Evidence for horizontal gene transfer (HGT) of ACC deaminase genes. *Appl Environ Microbiol* 71: 7556-7558.
- Hontzeas N., Zoidakis J., Glick B.R. y Abu-Omar M.M. 2004. Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. *Biochim Biophys Acta* 1703: 11-19.
- Huante P.P. 1996. Plasticidad, disponibilidad de recursos y crecimiento en plántulas de la selva baja caducifolia de Chamela, Jalisco: un enfoque experimental. Tesis de doctorado (Doctorado en Ecología). Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Islam M.R., Madhaiyan M., Deka Boruah H.P., Yim W., Lee G., Saravanan V.S., Fu Q., Hu H. y Sa T. 2009. Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. *J Microbiol Biotechnol* 19: 1213-1222.
- Ivanchenko M.G., Muday G.K. y Dubrovsky J.G. 2008. Ethylene–auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 55: 335-347.
- Jacobson C.B., Pasternak J.J. y Glick B.R. 1994. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can J Microbiol* 40: 1019-1025.

- Jia Y.J., Kakuta Y., Sugawara M., Igarashi T., Oki N., Kisaki M., Shoji T., Kanetuna Y., Horita T., Matsui H. y Honma M. 1999. Synthesis and degradation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid *Penicillium citrinum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 542-549.
- Jin H., Pfeffer P.E., Douds D.D., Piotrowski E., Lammers P.J. y Shachar-Hill Y. 2005. The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 168: 687-696.
- Javot, H., Penmetsa V.R., Terzaghi N., Cook D.R. y Harrison M.J. 2007. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1720-1725.
- Kamala-Kannan S., Lee K.J., Park S.M., Chae J.C., Yun B.S., Lee Y.H., Park Y.J. y Oh B.T. 2010. Characterization of ACC deaminase gene in *Pseudomonas entomophila* strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil. *J Basic Microbiol* 50: 200-205.
- Kamnev A.A., Sadovnikova J.N., Tarantilis P.A., Polissiou M.G. y Antonyuk L.P. 2008. Responses of *Azospirillum brasilense* to nitrogen deficiency and to wheat lectin: a diffuse reflectance infrared fourier transform (DRIFT) spectroscopic study. *Microb Ecol* 56: 615-624.
- Karandashov V. y Bucher M. 2005. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci* 10: 22-29.
- Karthikeyan B., Abdul Jaleel C., Lakshmanan G.M.A. y Deiveekasundaram M. 2008. Studies on rhizosphere microbial diversity of some commercially important medicinal plants. *Colloids Surf B Biointerfaces* 62: 143-145.
- Kennedy A.C. 1999. The rhizosphere and spermosphere. In: Principles and applications of soil microbiology. Sylvia D.M., Fuhrmann J.J., Hartel P.G. y Zuberer D.A. (Eds.). pp. 389-407. Prentice Hall. Upper Saddle River. New Jersey 07458.
- Khammas K.M., Ageron E., Grimont P.A. y Kaiser P. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soils. *Res Microbiol* 140: 679-693.
- Klee H.J., Hayford M.B., Kretzmer K.A., Barry G.F. y Kishore G.M. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell* 3: 1187-1193.
- Klee H.J. 1993. Ripening physiology of fruit from transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants with reduced ethylene synthesis. *Plant Physiol* 102: 911-916.
- Kloepper J.W., Lifshitz R. y Zablotowicz R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7: 39-43.
- Kloepper J.W., Tuzun S., Liu L. y Wei G. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic disease resistance. En: Pest Management: Biological Based Technologies. Lumsden R.D. y Vaughn J.L. (Eds.), pp. 156-165. Washington DC: American Chemical Society Books.
- Kosuta S., Hazledine S., Sun J., Miwa H., Morris R.J., Downie J.A. y Oldroyd G.E.D. 2008. Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9823-9828.



Kozdrój J., Piotrowska-Seget Z. y Kupra P. 2007. Mycorrhizal fungi and ectomycorrhiza associated bacteria isolated from and industrial desert soil protect pine seedlings against Cd(II) impact. *Ecotoxicology* 6: 449-456.

Kuhn G., Hijiri M. y Sanders I.R. 2001. Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414: 745-748.

Kumar K.V., Srivastava S., Singh N. y Behl H.M. 2009. Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*. *J Hazard Mater* 170: 51-57.

Ladha J.K., So R.B. y Watanabe I. 1987. Composition of *Azospirillum* species associated with wetland rice plants grown in different soils. *Plant Soil* 102: 127-129.

Lamm R.B. y Neyra C.A. 1981. Characterization and cyst production of azospirilla isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. *Can J Microbiol* 27: 1320-1325.

Levrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V., Kuever J., Lysenko A. y Grabovich M. 2010. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2832-2837.

Li J., Shah S., Moffatt B.A. y Glick B.R. 2001. Isolation and characterization of an unusual 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4. *Anton Leew* 80: 255-261.

Lin S.Y., Shen F.T. y Young C.C. 2011a. Rapid detection and identification of the free-living nitrogen fixing genus *Azospirillum* by 16S rRNA-gene-targeted genus specific primers. *Anton Leew* 99: 837-844.

Lin S.Y., Shen F.T., Young L.S., Zhu Z.L., Chen W.M. y Young C.C. 2011b. *Azospirillum formosense* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from agricultural soil. *Int J Syst Evol Microbiol* En prensa.

Lin S.Y., Young C.C., Hupfer H., Siering C., Arun A.B., Chen W.M., Lai W.A., Shen F.T., Rekha P.D. y Yassin A.F. 2009. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 761-765.

López-Pedrosa A., González-Guerrero M., Valderas A., Azcón-Aguilar C. y Ferrol N. 2006. *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genet Biol* 43: 102-110.

Lucy M., Reed E. y Glick B.R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Anton Leeuw* 86: 1-25.

Lugtenberg B.J. y Kamilova F. 2009. Plant Growth-Promoting-Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63: 541-556.

Lugtenberg B.J., Dekkers L.C. y Bloemberg G.V. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu Rev Phytopathol* 39: 461-90.

Lugtenberg B.J., Kravchenko L.V. y Simons M. 1999. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ Microbiol* 1: 439-46.

- Lynch J.M. y Whipps J.M. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129: 1-10.
- Lynch J.M. y Brown K.M. 1997. Ethylene and plant responses to nutritional stress. *Physiol Plant* 100: 613-619.
- Ma Y., Rajkumar M. y Freitas H. 2009. Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. *Chemosphere* 75: 719-725.
- Ma W., Charles T.C. y Glick B.R. 2004. Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. *Appl. Environ Microbiol* 70: 5891-5897.
- Ma W., Sebastianova S., Sebastian J., Burd G.I., Guinel F. y Glick B.R. 2003a. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobia* spp. *Anton Leew* 83: 285-291.
- Ma W., Guinel F.C. y Glick B.R. 2003b. *Rhizobium leguminosarum* Biovar viciae 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants. *Appl Environ Microbiol* 69: 4396-4402.
- Maathius F.J.M. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr Op Plant Biol* 12: 250-258.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., Kwon S.W. y Sa T.M. 2009. *Methylobacterium phyllosphaerae* sp. nov., a pink-pigmented, facultative methylotroph from the phyllosphere of rice. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 22-27.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., Ryu J. y Sa T.M. 2006. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Planta* 224: 268-278.
- Magalhaes M., Baldani I., Sovro S.M., Kuykendal R. y Döbereine R. 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *Annals Academy Brasil Genc* 55: 417-430.
- Maldonado-Mendoza E.G., Dewbre G.R. y Harrison M.J. 2001. A phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 1140-1148.
- Mandal S.M., Chakraborty D. y Dey S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signal Behav* 5: 359-368.
- Marschner H. 1995. 2a. ed. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. San Diego, CA, USA, 889 pp.
- Martínez-Morales L.J., Soto-Urzuía L. Baca B.E. y Sánchez-Ahédo J.A. 2003. Indole-3-butyric acid (IBA) production in cultura médium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 228:167-173.
- Matora L.Y., Serebrennikova O.B. y Shchyogoley S.Y. 2001. Structural effects of the *Azospirillum* lipopolysaccharides in cell suspensions. *Biomacromolecules* 2: 402-406.
- Mayak S., Tirosh T. y Glick B.R. 2004a. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and pepper. *Plant Sci* 166: 525-530.

---

Mayak S., Tirosch T. y Glick B.R. 2004b. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol Biochem* 42: 565-572.

McDonnell L., Plett J.M., Andersson-Gunneras S., Kozela C., Dugardeyn J., Van Der Straeten D., Glick B.R., Sundberg B. y Regan S. 2009. Ethylene levels are regulated by a plant encoded 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase. *Physiol Plant* 136: 94-109.

Mehnaz S., Weselowski B. y Lazarovits G. 2007a. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 620-624.

Mehnaz S., Weselowski B. y Lazarovits G. 2007b. *Azospirillum zea* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2805-2809.

Michielis K.M., Croes C.L. y Vanderleyden J. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J Gen Microbiol* 137: 2241-2246.

Morgan P.W. y Drew M.C. 1997. Ethylene and plant responses to stress. *Physiol Plant* 100: 620-630.

Nardi S., Conchero G., Pizzeghello D., Sturaro A., Rella R. y Parvoli G. 2000. Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere* 5: 653-658.

Navazio L., Moscatiello R., Genre A., Novero M., Baldan B., Bonfante P. y Mariani P. 2007. A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. *Plant Physiol* 144: 673-681.

Nie L., Shah S., Rashid A., Burd G.I., Dixon D.G. y Glick B.R. 2002. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiol Biochem* 40: 355-361.

Nieto K.F. y Frankenberger W.T. 1990. Microbial production of cytokinins. *Soil Biol Biochem* 6: 191-248.

Nukui N., Minamisawa K., Ayabe S.I. y Aoki T. 2006. Expresión of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase gene requires symbiotic nitrogen-fixing regulador gene *nifA2* in *Mesorhizobium loti* MAFF303099. *Appl Environ Microbiol* 72: 4964-4969.

Oehl F. y Sieverding E. 2004. Pacispora, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the Glomeromycetes. *J Appl Bot* 78: 72-82.

Okon Y., Albrecht S.L. y Burris R.H. 1976. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. *J Bacteriol* 128: 592-597.

Ortíz-Castro R., Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L. y López-Bucio J. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav* 4: 701: 712.

- Ortiz-Castro R., Valencia-Cantero E. y Lopez-Bucio J. 2008. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signal Behav* 3: 263-265.
- Oyama K. 1994. Differentiation in phenotypic plasticity among populations of *Arabis serrate* Fr. & Sav. (Brassicaceae). *Biol J Linn Soc* 51: 417-432.
- Pandey P., Kang S.C. y Maheshwari D.K. 2005. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Curr Sci* 89: 177-180.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* 6: 763-775.
- Paszkowski U., Kroken S., Roux C. y Briggs S.P. 2002. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13324-13329.
- Penrose D.M. y Glick B.R. 2001. Levels of ACC and related compounds in exudates and extracts of canola seeds treated with ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Can J Microbiol* 47: 368-372.
- Peng G., Wang H., Zhang G., Hou W., Liu Y., Wang E.T. y Tan Z. 2006. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1263-1271.
- Perotto S. y Bonfante P. 1997. Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. *Trends Microbiol* 5: 496-503.
- Perrig D., Boiero M.L., Masciarelli O.A., Penna C., Ruiz O.A., Cassán F.D. y Luna M.V. 2007. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 1143-1150.
- Plett J.M., McDonnell L. y Regan S. 2009. Plant encoded 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity implicated in different aspects of plant development. *Plant Signal Behav* 14: 1186-1189.
- Read D.J., Leake J.R. y Pérez-Moreno J. 2004. Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystems processes in heathland and boreal forest biomes. *Can J Bot* 82: 1243-1263.
- Read D.J. y Pérez-Moreno J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey toward relevance? *New Phytol* 157: 475-492.
- Reed M.L.E., Warner B.G. y Glick B.R. 2005. Plant growth-promoting bacteria facilitate the growth of the common reed *Phragmites australis* in the presence of copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr Microbiol* 51: 425-429.
- Reinhold B., Hurek T., Fendrik I., Pot B., Gillis M., Kersters K., Thielemans S. y de Ley J. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov. a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int J Syst Bacteriol* 37: 43-51.
- Rodríguez H., Vessely S., Shah S. y Glick B.R. 2008. Effect of a nickel-tolerant ACC deaminase-producing *Pseudomonas* strain on growth of nontransformed and transgenic canola plants. *Curr Microbiol* 57: 170-174.

Robison M.M., Shah S., Tamot B., Pauls K.P., Moffatt B.A. y Glick B.R. 2001. Reduced symptoms of *Verticillium* wilt in transgenic tomato expressing a bacterial ACC deaminase. *Mol Plant Phytol* 2: 135-145.

Ross J., O'Neill D., Smith J., Kerckhoffs y Elliot R. 2000. Evidence that auxin promotes the gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J* 21: 547-552.

Rothballer M., Eckert B., Schmid M., Fekete A., Schloter M., Lehner A., Pollmann S. y Hartmann A. 2008. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisiengense*. *FEMS Microbiol Ecol* 66: 85-95.

Rovira A.D. 1956. A study of the development of the root surface microflora during the initial stages of plant growth. *J Appl Bacteriol* 19: 72-79.

Salamone G.I.E., Hynes R.K. y Nelson L.M. 2001. Cytookinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J Microbiol* 47: 404-411.

Saleena L.M., Rangarajan S. y Nair S. 2002. Diversity of *Azospirillum* strains isolated from rice plants grown in saline and nonsaline sites of coastal agricultural ecosystem. *Microb Ecol* 44: 271-277.

Saravanakumar D. y Samiyappan R. 2007. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *J Appl Microbiol* 102: 1283-1292.

Schlichting C.D. 1986. The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Ann Rev Ecol System* 17: 667-693.

Schübler A. y Walker C. 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Effectively Published in Gloucester, England. 50 pp.

Schübler A., Schwarzott D. y Walker C. 2001. A new fungal phylum the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Res* 105: 1414-1421.

Schulz S. y Dickschat J.S. 2007. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep* 24: 814-842.

Sgroy V., Cassán F., Masciarelli O., Del Papa M.F., Lagares A. y Luna V. 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 371-381.

Shah J. 2009. Plants under attack: systemic signals in defence. *Curr Opin Plant Biol* 12: 459-464.

Shah S., Li J., Moffatt B.A. y Glick B.R. 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol* 44: 833-843.

Shaharoona B., Naveed M., Arshad M. y Zahir Z.A. 2008. Fertilizer-dependent efficiency of pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 147-155.

Shaharoona B., Arshad M., Zahir Z.A. y Khalid A. 2006. Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biol Biochem* 38: 2971-2975.

Sheng X.F., He L.Y., Zhou L. y Shen Y.Y. 2009. Characterization of *Microbacterium* sp. F10a and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon removal in low-temperature soil. *Can J Microbiol* 55: 529-535.

Siddikee M.A., Chauhan P.S., Anandham R., Han G.H. y Sa T. 2010. Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coast soil. *J Microbiol Biotechnol* 20: 1577-1584.

Siddiqui Z.A y Mahmood I. 1999. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review. *Biores Technol* 69: 167-179.

Skvortsov I.M. e Ignatov V.V. 1988. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots. *FEMS Microbiol Lett* 165: 223-229.

Sly L.I. y Stackebrandt E. 1999. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. *Int J Syst Bacteriol* 49: 541-544.

Smalle J. y Van der Straeten D. 1997. Ethylene and vegetative development. *Physiol Plant* 100: 593-605.

Smith S.E. y Read D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, San Diego, USA, 605 pp.

Smith H. 1990. Signal perception, differential expression within multigene families and the molecular basis of phenotypic plasticity. *Plant Cell Environ* 13: 585-594.

Somers E., Vanderleyden J. y Srinivasan M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol* 30: 205-240.

Spaepen S., Vanderleyden J. y Remans R. 2007. Indole-3-acetic in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31: 425-448.

Spaink H.P. 1997. Ethylene as a regulator of *Rhizobium* infection. *Trends Plant Sci* 2: 203-204.

Sprent J.I. y de Faria S.M. 1988. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant Soil* 110: 157-165.

Stearns J.C., Shah S., Greenberg B.M., Dixon D.G. y Glick B.R. 2005. Tolerance of transgenic canola expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase to growth inhibition by nickel. *Plant Physiol Biochem* 43: 701-708.

Steenhoudt O. y Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev* 24: 487-506.

Steinkellner S., Lenzemo V., Langer I., Schweiger P., Khaosaad T., Toussaint J-P. y Vierheilig H. 2007. Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant–fungus interactions. *Molecules* 12: 1290-1306.

Stevens G.A., Jr. y Berry A.M. 1988. Cytokinin secretion by *Frankia* sp. HFPAr13 in defined medium. *Plant Physiol* 87: 15-16.

Sun Y., Cheng Z. y Glick B.R. 2009. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *FEMS Microbiol Lett* 296: 131-136.

Sundaram S., Arunakumari A. y Klucas R.V. 1988. Characterization of azospirilla isolated from seeds and roots of turf grass. *Can J Microbiol* 34: 212-217.

Sultan S.E. 1987. Evolutionary implications of phenotypic plasticity in plants. *Evol Biol* 21: 127-178.

Tahir M., Arshad M., Naveed M., Zahir Z.A., Shaharoona B. y Ahmad R. 2006. Enrichment of recycled organic waste with N fertilizer and PGPR containing ACC-deaminase for improving growth and yield of tomato. *Soil Environ* 25: 105-112.

Taiz L. y Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*. 4a. ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Mass, USA, 565 pp.

Tarrand J., R. Krieg y J. Döbereoner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can J Microbiol* 24: 967-980.

Tien T.M., Gaskin M.H. y Hubbel D.H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl Environ Microbiol* 37: 1016-1024.

Timmusk S., Nicander B., Granhall U y Tillberg E. 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem* 31: 1847-1852.

Van Rhijin P., Fang Y., Galili S., Shaul O., Atzmon N., Winer S., Eshed Y., Lum M., Li Y. y To V. 1997. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5467-5472.

Ververidis P. y John P. 1991. Complete recovery in vitro of ethylene-forming enzyme. *Phytochem* 30: 725-727.

Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.

Viterbo A., Landau U., Kim S., Chernin L. y Chet I. 2010. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett* 305: 42-48.

Vivas A., Barea J.M., Biró B. y Azcón R. 2006. Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on *Trifolium* growth, symbiotic development and soil enzymatic activities in Zn contaminated soil. *J Appl Microbiol* 100: 587-598.

- Vivas A., Azcón R., Biró B., Barea J.M. y Ruíz-Lozano J.M. 2003a. Influence of bacterial strains isolated from lead-polluted soil and their interactions with arbuscular mycorrhizae on the growth of *Trifolium pratense* L. under lead toxicity. *Can J Microbiol* 49: 577-588.
- Vivas A., Marulanda A., Ruíz-Lozano J.M., Barea J.M. y Azcón R. 2003b. Influence of a *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress. *Mycorrhiza* 13: 249-256.
- Walker C. y Schübler A. 2004. Nomenclatural clarifications and new taxa in the *Glomeromycota*. *Mycol Res* 108: 979-982.
- Walker C., Blaszkowski J., Schwartzott S. y Schübler A. 2004. *Gerdemannia* gen. nov., a genus separated from *Glomus*, and Gerdemanniaceae fam. nov., a new family in the *Glomeromycota*. *Mycol Res* 108: 707-718.
- Walter T.S., Bais H.P., Grotewold E. y Vivanco J.M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol* 132: 44-51.
- Wei M., Yokoyama T., Minamisawa K., Mitsui H., Itakura M., Kaneko T., Tabata S., Saeki K., Omori H., Tajima S., Uchiumi T., Abe M. y Ohwada T. 2008. Soybean seed extracts preferentially express genomic loci of *Bradyrhizobium japonicum* in the initial interaction with soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *DNA Res* 15: 201-214.
- West-Eberhard M.J. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annu Rev Ecol Syst* 20: 249-278.
- Xie C.H. y Yokota A. 2005. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1435-1438.
- Yang J., Kloepper J.W. y Ryu C.M. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci* 14: 1-4.
- Yim W.J., Poonguzhali S., Madhaiyan M., Palaniappan P., Siddiquee M.A. y Sa T. 2009. Characterization of plant-growth promoting diazotrophic bacteria isolated from field growth Chinese cabbage under different fertilization conditions. *J Microbiol* 47: 147-155.
- Young C.C., Hupfer H., Siering C., Ho M.J., Arun A.B., Lai W.A., Rekha P.D., Shen F.T., Hung M.H., Chen W.M. y Yassin A.F. 2008. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 959-963.
- Zahir Z.A., Ghami U., Naveed M., Nadeem S.M. y Asghar H.N. 2009. Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. *Arch Microbiol* 191: 415-424.
- Zahir Z.A., Arshad M. y Frankenberger Jr.W.T. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Adv Agron* 81: 97-168.
- Zhou Y., Wei W., Wang X., Xu. y Lai R. 2009. *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China. *J Gen Appl Microbiol* 55: 1-7.



### JUSTIFICACIÓN

Dentro de los mecanismos que los microorganismos benéficos utilizan para promover el crecimiento vegetal, algunos como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo, la producción de la auxina ácido indol acético, la de sideróforos y la de sustancias antimicrobianas han sido de las más estudiadas. No obstante, existen aún muchas interrogantes acerca de cómo estos microorganismos (rizobacterias u hongos micorrízicos) benefician el crecimiento de las plantas. A este respecto, el estudio de la enzima ACC desaminasa ha sido muy relevante en los últimos años, ya que es el mecanismo mediante el cual las rizobacterias disminuyen la concentración de etileno generado en plantas cultivadas en condiciones ambientales desfavorables (salinidad, sequía, heladas, inundación, contaminación). El etileno, es una fitohormona producida naturalmente por las plantas para su óptimo desarrollo, sin embargo, su sobreproducción provoca cambios tan importantes en su fisiología que pueden llegar a causar la muerte de la planta.

*Azospirillum*, es uno de los género mejor caracterizados como promotor del crecimiento vegetal, y en el cual se han identificado varios de los mecanismos para promover tal crecimiento; sin embargo, no se sabe con certeza si presenta actividad de la enzima ACC desaminasa. A este respecto, Blaha y su grupo de colaboradores (2006) publicaron la presencia del gen *acdS*, que codifica para la enzima ACC desaminasa, en cepas de *A. lipoferum*, aisladas de suelos de Israel; pero en esos estudios no se demostró la actividad biológica de la enzima.

Por otro lado, en las últimas décadas, el uso constante y excesivo de los fertilizantes químicos en campo para favorecer el crecimiento vegetal y producción de los cultivos, ha generado severos problemas ambientales y económicos, en México y en otras partes del mundo.

En este contexto, este trabajo de tesis se propuso evaluar la capacidad de *A. lipoferum* para sintetizar la enzima ACC desaminasa. Para ello se identificará el gen *acdS*, y se evaluará la actividad enzimática en el crecimiento de plantas cultivadas en sustratos fertilizados con dosis reducidas de fertilizante nitrogenado, teniendo al respecto como único antecedente inmediato el trabajo de Blaha y colaboradores (2006). Así mismo, se evaluará el efecto sinérgico de *A. lipoferum* (AZm5) con los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el crecimiento de plantas de jitomate.

De acuerdo a lo anterior en este estudio se generó la siguiente hipótesis, y se propuso el siguiente objetivo:

### HIPÓTESIS

- La inoculación de plantas de jitomate inoculadas con *Azospirillum*, incrementarán su crecimiento y producción, en condiciones reducidas de nitrógeno. Los mecanismos que empleará *Azospirillum* para promover tal efecto serán la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas y la actividad de la enzima ACC desaminasa. Así mismo el efecto en el crecimiento de las plantas será incrementado por la co-inoculación de *Azospirillum* y de HMA.

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de *Azospirillum* y HMA en el crecimiento y la producción de jitomate y su mecanismo de acción.

### METAS

- Aportar información acerca de los principales mecanismos de acción que *Azospirillum* utiliza para favorecen el crecimiento vegetal y su acción conjunta con los HMA.
- Contribuir a la producción sostenible de frutos de jitomate, con la sustitución parcial del uso de fertilizantes químicos por el de inoculantes microbianos, a base de *Azospirillum* y HMA.

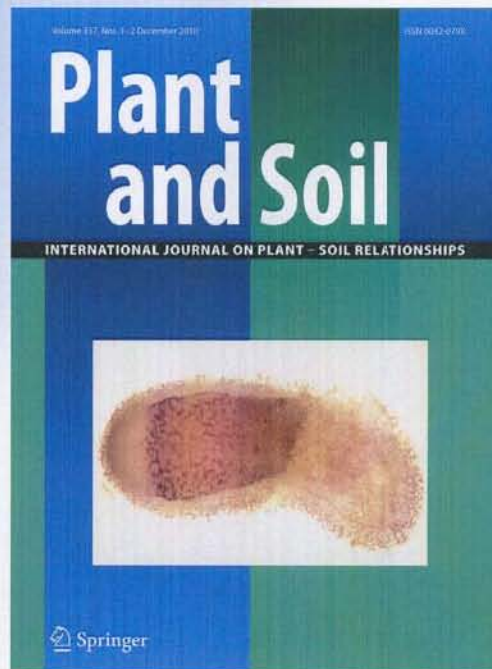
## CAPÍTULO III

*Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency

**Plant and Soil**  
An International Journal on  
Plant-Soil Relationships

ISSN 0032-079X  
Volume 337  
Combined 1-2

Plant Soil (2010) 337:65-75  
DOI 10.1007/  
s11104-010-0499-7



 Springer

## *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency

Rosalba Esquivel-Cote · Rosa María Ramírez-Gama ·  
 Guadalupe Tsuzuki-Reyes · Alma Orozco-Segovia · Pilar Huante

Received: 31 March 2010 / Accepted: 16 July 2010 / Published online: 9 September 2010  
 © Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** In this study we evaluated the ability of two wild strains of *Azospirillum*, *A. lipoferum* AZm5 and *A. brasilense* VS9, to produce ACC deaminase. We tested the effects of a deficiency and medium doses of nitrogenous fertilizers on the growth and physiology of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. ACE VF55) inoculated with both *Azospirillum* strains independently. Tomato plants were evaluated by root elongation assay and grown in pot soil culture with different nitrogen levels (0 kg N ha<sup>-1</sup> and 170 kg N ha<sup>-1</sup>). The root:shoot ratio (R:S) and some ecophysiological traits were determined after 42 days of plant growth. Results showed very different physiological characteristics in both strains. We found three relevant aspects related to the AZm5 strain: it produces high amounts of cytokinins, it contains the gene *acdS*,

which encodes ACC deaminase, and it promotes plant growth. We conclude that AZm5 maybe useful to increase N uptake in N-deficient soil by production of cytokinins and the promotion of ACC deaminase activity, which favored leaf expansion and higher leaf N investment. Therefore, for tomato culture, a simultaneous biofertilization with AZm5 and a relatively low fertilization with N (170 kg N ha<sup>-1</sup>) to promote AZm5 activity could be advantageous.

**Keywords** ACC deaminase · *Azospirillum* · Nitrogen · Tomato

### Introduction

*Azospirillum* is one of the best-known plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) genera (Steenhoudt and Vanderleyden 2000). Suitable for use as a biofertilizer, this PGPR is capable of influencing the growth and yield of numerous plants species, many of which have agronomic and ecological significance (Bashan et al. 2004; Hartmann and Bashan 2009). The stimulatory effect of *Azospirillum* has been attributed to several mechanisms that eventually increase plant yield, including its ability to produce various phytohormones (indole-3-acetic acid, zeatin, gibberellic acid, abscisic acid, ethylene) and important bioactive molecules (putrescine, spermine, spermidine, cadaverine), to fix biological nitrogen, and to enhance

Responsible Editor: Peter A.H. Bakker.

R. Esquivel-Cote (✉) · A. Orozco-Segovia · P. Huante  
 Departamento de Ecología Funcional, Laboratorio  
 de Ecofisiología Vegetal, Instituto de Ecología,  
 Universidad Nacional Autónoma de México,  
 México, DF 04510, Mexico  
 e-mail: resqcote@servidor.unam.mx

R. M. Ramírez-Gama · G. Tsuzuki-Reyes  
 Departamento de Biología, Laboratorio de Microbiología  
 Experimental, Facultad de Química, Universidad Nacional  
 Autónoma de México,  
 México, DF 04510, Mexico



water and mineral uptake by plants (Dobbelaere et al. 2001; Perrig et al. 2007). *Azospirillum* inoculation improves plant growth in the presence of optimum and medium doses of nitrogenous fertilizers (Kapulnik et al. 1981; Bhattarai and Hess 1998; Gadagi et al. 2004). In tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants inoculated with *Azospirillum*, increases in length, volume and biomass of root, number of leaves, stem diameter, shoot height and plant biomass have been documented (Bashan 1989; Terry et al. 2005; Ribauda et al. 2006). However, the mechanisms of *Azospirillum* contribution to plant growth promotion are still poorly understood.

In 1998 it was suggested that PGPR promote the growth of plants and lower ethylene levels by the action of the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase enzyme, which can cleave ACC, the immediate precursor of ethylene (Glick et al. 1998). Ethylene is important for normal development in plants as well as for their response to stress, for example, extreme temperatures, high salinity, drought, amelioration and pathogen infection (Glick et al. 2007). Also, PGPR containing ACC deaminase may enhance seedling survival, protecting plants against the inhibitory effects of high or low concentrations of nutrients (Abeles et al. 1992; Lynch and Brown 1997; Shaharoona et al. 2008).

PGPR that contain ACC deaminase play a significant role in phytoremediation of contaminated soils (Glick 2003). It has also been documented that, even in the presence of optimum or appropriate doses of nitrogenous fertilizers, inoculation with PGPR containing ACC deaminase improves the growth and yield of inoculated plants (Tahir et al. 2006; Shaharoona et al. 2006, 2008). An important effect of PGPR inoculation is a reduction in inorganic N application needed in agricultural systems.

The enzyme ACC deaminase has been found in a wide range of PGPR, such as the genera *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, and *Variovorax*. In these bacteria, the *acdS* gene has been associated with the presence of the enzyme ACC deaminase (Glick et al. 1995; Belimov et al. 2001; Penrose and Glick 2001; Babalola et al. 2003; Ma et al. 2003; Mayak et al. 2004; Belimov et al. 2005; Madhaiyan et al. 2006). It has been previously documented that some members of *Azospirillum* sp. do not produce ACC deaminase gene (Kende 1993; Holguin and Glick 2001). However, Blaha et al. (2006)

reported the presence of the ACC deaminase gene (*acdS*) in wild strains of *A. lipoferum* isolated from soil in Pakistan. In addition, our studies with soil of crops from the Mezquital Valley in Mexico detected ACC deaminase activity in *A. lipoferum* strains isolated from the rhizosphere (Esquivel-Cote 2002); however, presence of the *acdS* gene was not evaluated.

In this study we evaluated the presence of the ACC deaminase gene (*acdS*) in a wild strain of *A. lipoferum*, AZm5, isolated from a N-enriched crop soil, and we tested the ability of this strain to produce ACC deaminase. We also tested the effects of a deficiency of and medium doses of nitrogenous fertilizers on plant growth and physiology in tomato plants inoculated with *A. lipoferum* AZm5.

We hypothesized that *A. lipoferum* AZm5 containing ACC deaminase activity would improve the growth and physiology of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants under a deficiency of and medium doses of nitrogenous fertilizers. This improvement is relevant for the production of tomato, which is one of the most popular and widely grown vegetables in the world (USDA 2008) and one of the most economically important horticultural vegetables in Mexico (SIAP 2009). Tomato plants require the addition of high doses of nitrogenous fertilizers (150–450 kg ha<sup>-1</sup>), which may have toxic effects in soil and water.

## Material and methods

### Bacterial strains

Some of the *Azospirillum* strains were initially isolated from the rhizosphere of several crops growing under different environmental conditions in Mexico. The *A. lipoferum* strain AZm5 was isolated from maize (*Zea mays* L.) plants cultivated in soils contaminated by irrigation with wastewater enriched with N fertilizers in Valle del Mezquital, State of Hidalgo. The *A. brasilense* strain VS9 was isolated from sorghum (*Sorghum* sp.) plants cultivated in non-contaminated soils in Valle de Santiago, State of Guanajuato (Esquivel-Cote 2002). After isolation, the bacteria were grown in 100 ml NFB liquid medium (Döbereiner et al. 1976) supplemented with NH<sub>4</sub>Cl (1 g l<sup>-1</sup>). The flasks were incubated on a rotary shaker at 150 rpm at 34±2°C for 48 h.



#### Physiological characteristics of *Azospirillum* strains

Production of indole acetic acid (IAA), indole butyric acid (IBA), gibberellic acid (GA), *trans*-zeatin (*t*-Z) and *trans*-zeatin riboside (*t*-ZR) was determined after bacteria were incubated for 48 h, according to the protocol described by Tien et al. (1979). IAA, IBA, GA, *t*-Z and *t*-ZR production was determined by HPLC as follows: IAA, IBA, GA, *t*-Z and *t*-ZR were separated on a Zorbax 300 C<sub>18</sub> reverse phase column of 4.6 mm×15 cm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a liquid chromatograph (Waters 600E system, Milford, MA, USA). Samples were analyzed under isocratic conditions using methanol:formic acid (35:65 v/v) as separation solvent, at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. Eluates were detected by spectrophotometry at 274 nm (Waters 996, Milford, MA, USA). IAA, IBA, GA, *t*-Z and *t*-ZR were quantified by reference to the peak area obtained for the IAA standard (100 µg ml<sup>-1</sup>) (Sigma, St. Louis, MO, USA), IBA standard (100 µg ml<sup>-1</sup>; Sigma), GA standard (100 µg ml<sup>-1</sup>; Sigma), *t*-Z standard (40 µg ml<sup>-1</sup>; Sigma) and *t*-ZR standard (40 µg ml<sup>-1</sup>; Sigma), respectively. All standards were dissolved in methanol (HPLC grade). Nitrogenase activity was quantified using the acetylene-reduction assay. The bacterial suspension was inoculated into 5 ml of semisolid NFB medium contained in 10-ml sterile glass vials. Control vials were maintained without bacterial samples. Once visible growth was observed as a film on the surface of the medium, the cotton plugs, which allowed air exchange, were replaced with rubber stoppers. From these bottles, 10% of the gaseous phase was removed with an insulin syringe, and the same volume of acetylene gas was injected. After 12 h of incubation, the concentration of ethylene produced was analyzed by gas chromatography (3300 Varian, Inc, Palo Alto, CA, USA) with a flame ionizing detector. A stainless steel column containing Porapak-T column 3 and 3.1-mm (80–100 mesh; Waters and Associates, Inc., Milford, MA, USA) was used at an ignition temperature of 105°C. Each strain was analyzed in triplicate.

Bacterial ethylene production was determined as described by Arshad and Frankenberger (1989). One milliliter of bacterial suspension grown in NFB liquid medium supplemented with L-methionine (1 g l<sup>-1</sup>) as a sole source of nitrogen was inoculated into each of three sterile glass vials (50 ml) containing 20 ml of

the same medium, covered with septum rubber and incubated on a rotary shaker at 150 rpm at 34±2°C for 48 h. Control vials were maintained without the addition of bacteria. After incubation, the ethylene concentration was determined by gas chromatograph (see above).

The ACC deaminase activity was determined in cell-free extracts by estimating the production of α keto-butyrate generated by the enzymatic hydrolysis of ACC following the method of Honma and Shimomura (1978). The protein concentration in cell suspensions and in cells labeled by toluene (5% v/v) was determined by the method described by Bradford (1976).

#### Inoculum

Bacteria were incubated in a nutritive broth medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) on a rotary shaker at 150 rpm at 34±2°C for 24 h. Cultures were harvested, and cell pellets were washed twice with a sterile isotonic saline solution (0.85% NaCl). Cell pellets were resuspended in NFB liquid medium supplemented with 3.0 mM ACC (Calbiochem-Novobiochem Corp., La Jolla, CA, USA) or 3.0 mM NH<sub>4</sub>Cl, pH 6.8. Bacteria cells were incubated on a rotary shaker at 150 rpm at 34±2°C for 20 h. Produced bacterial cells were used to determine ACC deaminase activity, gnotobiotic root elongation and pot experiment with soil culture (see below).

#### PCR amplification of *acdS* (encoding ACC deaminase) genes

DNA was extracted following the manufacturer's instructions (AquaPure Genomic DNA Kit BIO-RAD®) from cells cultured on nutritive agar medium. Polymerase chain reaction (PCR) was carried out (95°C 5 min; 35 cycles of 95°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 1 min; and 72°C 5 min) using the primers F1937(F) / F1938(R) (Blaaha et al. 2006). PCR products were electrophoresed in 1% agarose containing TBE buffer in 10 µg ml<sup>-1</sup> ethidium bromide. The correct-size band was purified with the High Pure Plasmid Isolation Kit® (Roche Applied Science 2004).

The gel-purified PCR products were cloned into the vector pCR2.1 3.9 kb (TA Cloning® Kit Invitrogen Ver. V 2004). *Escherichia coli* DH5α cells were transformed with the ligation mixture and cultured on solid medium



containing isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) and 5-bromo-4-chloro-3-indole- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal). Plasmid was isolated from white colonies and then digested with *Nco*I and *Sal*I to release the insert. The *acdS* gene sequences were determined at Centro de Ciencias Genómicas (CCG), UNAM (Mexico) and compared with similar sequences in the databases using the BLAST analysis at NCBI.

The tree topology was inferred by the neighbor-joining method, and distance matrix analyses were performed according to Jukes and Cantor, using the program MEGA Ver. 4 (Kumar et al. 2008). The *acdS* gene sequences of the AZm5 strain have been submitted to the GenBank databases under the accession number GU727865.

#### Root elongation assay on tomato plants

The root elongation assay was conducted using a modification of the method described by Penrose and Glick (2003). The ACC utilizing bacterial cell pellet (see above) was resuspended in 0.5 ml of sterile 300 mM MgSO<sub>4</sub> and placed on ice. A 0.5 ml sample was removed from the cell suspension and diluted in 300 mM MgSO<sub>4</sub>. The bacterial suspension of *A. brasilense* VS9 (the non-ACC-utilizing strain) was cultivated on salt medium with NH<sub>4</sub>Cl (1 g l<sup>-1</sup>) as sole nitrogen source. Tomato seeds (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. ACE VF55 from Westar Seeds International Inc., CA, USA) were sterilized by soaking for 3 min in 70% ethanol and 5 min in 3% sodium hypochlorite and then rinsed thoroughly with sterile distilled water. The disinfected seeds were incubated for 1 h at room temperature, either in a bacterial suspension in 300 mM MgSO<sub>4</sub>, approximately 10<sup>8</sup> colony forming units (cfu) per ml, or in sterile 300 mM MgSO<sub>4</sub> as a control. Seed germination and seedling growth were conducted in seed-pack growth pouches (15 × 20 cm, Mega International CYG, MN, USA). The pouches were arranged upright in a plastic tray and filled with a sufficient amount of water to cover the bottom and maintain the humidity. The trays were covered with transparent Saran Wrap®.

In one gnotobiotic experiment, the effect of *Azospirillum* strains on the elongation of tomato roots was evaluated. Twelve tomato seeds were placed in one growth pouch (previously autoclaved at 121°C for 20 min) and then moistened with 10 ml of distilled

water and incubated at 25°C for 6 days. There were six replicates (pouches) per treatment with three treatments, for a total of 18 pouches. In another gnotobiotic experiment, the effect of the *Azospirillum* strains on the elongation of tomato root and shoot under different nitrogen levels was assessed. Each of eight tomato seeds was placed in a previously autoclaved seed-pack growth pouch and moistened with 10 ml of the nutrient solution recommended by Hazera Seeds, Inc. (FL, USA). Seeds were incubated for 10 days. Three treatments with different levels of nitrogen in the nutrient solution were applied (0 kg N ha<sup>-1</sup>, 170 kg N ha<sup>-1</sup> and 340 kg N ha<sup>-1</sup>). The experiment contained six replicates (pouches) per treatment with three treatments and three levels of nitrogen, for a total of 54 pouches incubated in a growth chamber (Conviron E15, Winnipeg, Canada with Sylvania F72T12/CW/VHO/LT fluorescent lamps) a 12-h photoperiod, a photon flux of 1.2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in the first experiment and 450  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in the second experiment, and a 25:20°C light/dark temperature cycle. Following incubation, the pouches were opened and seedling root and shoot length were measured.

#### Pot experiment with soil culture under different levels of nitrogen

A pot experiment was performed to test the effect of ACC deaminase on plant growth under two nitrogen levels. Plants were grown in plastic bags (one seedling per bag; seven bags per treatment) containing 320 g of non-sterile soil:agrolite mixture (1:5 v/v). The soil had the following characteristics: pH 6.5; organic matter 6.27%; cation exchange capacity 21.2 cmol kg<sup>-1</sup>. The following nutrients (in mg kg<sup>-1</sup> per soil): total N (2900); available P (1.62); Ca (1447.33). Bags filled with non-sterile soil:agrolite mixture were moistened up to 60% of the field capacity through the addition of 90 ml nutrient solution. Two treatments with different levels of nitrogen in the nutrient solution were applied (0 kg N ha<sup>-1</sup> and 170 kg N ha<sup>-1</sup>).

Seeds were surface sterilized and inoculated as described above, sown in pots with previously washed, dried, and autoclaved (121°C for 60 min) quartz sand. After 5 days, the germinated seeds were inoculated with 1 ml of bacterial suspension (approximately 10<sup>8</sup> cfu ml<sup>-1</sup>). Control seeds were treated with



sterile 300 mM MgSO<sub>4</sub>. Ten days after inoculation, plants of uniform size were transplanted and placed in bags (one plant per bag). Bags were incubated for 27 days in a growth chamber (Convion E15, Winnipeg, Canada with Sylvania F72T12/CW/VHO/ LT fluorescent lamps) a 12-h photoperiod, a photon flux of 450 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and a 25:20°C light/dark temperature cycle. Plants were harvested two times (t) when seedlings were 15 days old (1, at transplanting moment) and 42 days old (2, after transplanting). There were six replicates (pots) per treatment with three treatments and two levels of nitrogen, for a total of 36 pots.

At each harvest time, the shoot was separated into leaves and stem. Leaf area was measured using a Delta-T Area Meter videocamera (Delta-T Devices Ltd., Cambridge, England) with a JVC (TK5310EG). Seedlings were dried at 60°C in an oven. The dry weight (DW) of the different parts of the seedlings (leaves, stem and roots) was determined to calculate total biomass, root:shoot (R:S) ratio, leaf:mass ratio (LMR = leaf DW / total DW), stem:mass ratio (SMR = stem DW / total DW), root:mass ratio (RMR = root DW / total DW), specific leaf area (SLA = leaf area / leaf mass), leaf:mass ratio (LMR = leaf mass / total mass), leaf area ratio (LAR = SLA × LMR), net assimilation rate (NAR = (DW2 - DW1) / (t2 - t1) (lnLA2 - lnLA1 / LA2 - LA1)), and relative growth rate (RGR = LAR × NAR). The percentage of nitrogen in the leaves (LN%) was determined using an elemental analyser (NA 2500, Thermo Quest S.P.A., Rosanoo, Milan, Italy). The equipment was calibrated with a

standard curve obtained with sulphanilamide (C, 41.84%; H, 4.68%; N, 16.27%; O, 18.58% and S, 18.62%) (CE Elantech, Inc., Lakewood, N.J., USA). There were three replicates per analysis and per species.

#### Statistical analysis

Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA/MANOVA) using the statistical analysis software StatGraphics Centurion XV (2006, Statpoint Technologies Inc., VA, USA). Means were compared using the Fisher's least significant difference (LSD) procedure. Significance levels were within confidence limits of 0.05.

## Results

### Physiological characteristics

There were no significant differences in nitrogenase activity between AZm5 and VS9 and the control ( $F_{1,4}=4.33$ ;  $P=0.1058$ ). AZm5 induced significant differences in other physiological traits (Table 1). *A. lipoferum* strain, AZm5, showed ACC deaminase enzyme activity, produced a higher amount of zeatin than the VS9 strain ( $F_{1,4}=788.91$ ;  $P=0.00001$ ), and did not synthesize IAA in presence of 10 mg L-tryptophan 100 ml<sup>-1</sup> in NFB liquid medium. In contrast, *A. brasilense*, VS9, produced high amounts of the phytohormones IAA ( $F_{1,4}=226.99$ ;  $P=0.0001$ )

**Table 1** Physiological characteristics of *Azospirillum* strains used. Letters indicate a statistically significant difference between inoculated samples and uninoculated control, according

to Fisher's least significant difference (LSD) procedure ( $P<0.05$ ). Data are presented as mean±standard error of three replicates

Strain	Nitrogenase activity <sup>a</sup>	IAA <sup>b</sup>	IBA	GA	<i>t</i> -Z	<i>t</i> -ZR	Ethylene <sup>c</sup> production	ACC deaminase activity <sup>d</sup>
<i>A. lipoferum</i> AZm5	114.49 a (6.58)	0 b	0	0.002 b (0.0)	149 a (3.06)	0	0	2.68 a (0.013)
<i>A. brasilense</i> VS9	175.75 a (15.6)	44.36 a (1.69)	0	28.77 a (1.47)	0 b	0	0	0 b

<sup>a</sup> Nitrogenase activity measured in nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> per hour

<sup>b</sup> Phytohormones (indole acetic acid (IAA), indole butyric acid (IBA), gibberellic acid (GA), *trans*-zeatin (*t*-Z), *trans*-zeatin riboside (*t*-ZR)) measured in μg ml<sup>-1</sup> of culture

<sup>c</sup> Ethylene production measured in μg C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> ml<sup>-1</sup>

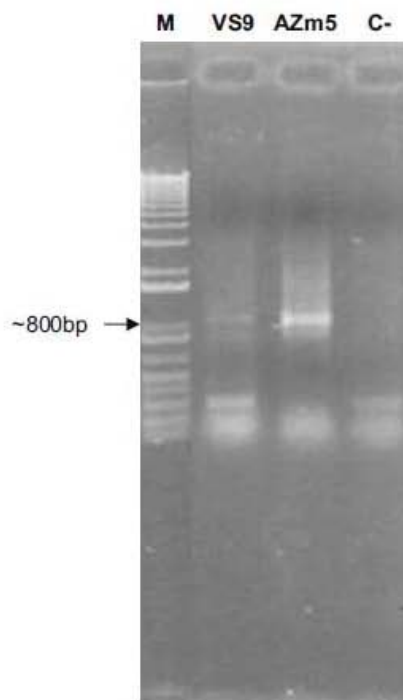
<sup>d</sup> 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase activity measured in μmol α keto-butyrate per milligram protein per hour



and GA ( $F_{1,4}=126.09$ ;  $P=0.00036$ ), but it did not synthesize cytokinins (neither zeatin nor zeatin riboside). Neither strain produced ethylene from L-methionine.

PCR amplification of *acdS* (encoding ACC deaminase) genes

Amplification of the ACC deaminase (*acdS*) gene was performed using a set of degenerative primers (F1937 (F) / F1938(R)); the 780-bp DNA product was cloned and sequenced (Fig. 1). The BLASTN search performed for the nucleotide sequence showed a 639-bp fragment with 100% homology to the complete sequence ACC-deaminase (*acdS*) gene of *A. lipoferum* strain 4B (DQ125242) (Blaha et al. 2006; Prigent-Combaret et al. 2008).



**Fig. 1** Agarose gel of genomic DNA of wild type *Azospirillum* strain AZm5 and VS9 was probed with the *acdS* gene using the primer 1937(F)/1938(R) (Blaha et al. 2006). Lane M, molecular weight marker (1 kb); Lane 2, Strain VS9 *Azospirillum brasilense*; Lane 3, Strain AZm5 *Azospirillum lipoferum*; Lane 4, negative control (C-)

Root elongation assay on tomato plants

In the first gnotobiotic assay, *A. lipoferum* AZm5 significantly promoted the root elongation of 6-day-old tomato cv. ACE VF55 seedlings grown in absence N and under  $1.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of photon flux. Root length increased 38.77% more than the control and 55.61% more than seedlings inoculated with *A. brasilense* VS9 ( $F_{2, 60}=31.229$ ;  $P=0.0001$ ; Fig. 2).

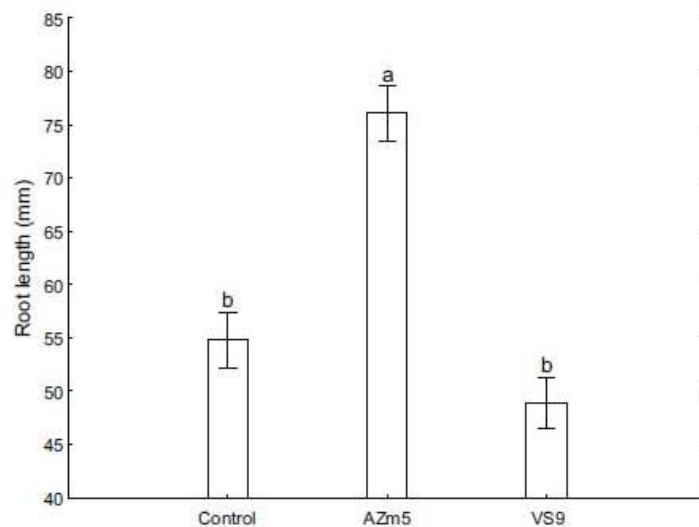
In the second gnotobiotic assay, inoculation with *Azospirillum* by itself did not produce significant differences in the root:shoot ratio in 10-day-old tomato cv. ACE VF55 seedlings (Table 2). The addition of N significantly reduced the root:shoot ratio. In the control, and in interaction with *A. brasilense* VS9,  $340 \text{ kg N ha}^{-1}$  showed the lowest root:shoot ratio.

Effect of different levels of nitrogen on seedlings growing in pots

After transplantation to pots, in 42-day-old seedlings  $170 \text{ kg N ha}^{-1}$  reduced the root:shoot ratio only in the control treatment (Table 3). The addition of  $170 \text{ kg N ha}^{-1}$  also resulted in significant differences in all other evaluated variables, except specific leaf area and net assimilation rate, and the interaction between factors, except in leaf:mass ratio, where the interaction was marginal. In the control treatments, the addition of N led an increase in leaf:mass ratio, stem:mass ratio, leaf:area ratio, relative growth rate and LN%; no effect on specific leaf area and net assimilation ratio; and a significant reduction in root:mass ratio. In the seedlings inoculated with *A. lipoferum* AZm5, the addition of  $170 \text{ kg N ha}^{-1}$  produced an increase in leaf:mass ratio, relative growth rate and LN%, but it had no effect on any other evaluated traits. Inoculation with *A. brasilense* VS9 increased specific leaf area, leaf area ratio, relative growth rate and LN%, decreased net assimilation rate NAR and had no significant effect on any other traits.

Comparing all treatments, control plants fertilized with N had the highest stem:mass ratio and non fertilized plants the lowest LN% values. In similar way, the inoculation of tomato seedlings with *A. lipoferum* AZm5 and without nitrogen presented the highest relative growth rate, specific leaf area and leaf:area ratio values but resulted in the lowest net assimilation rate value. In contrast, inoculation with

**Fig. 2** Root length of tomato cv. ACE VF55 seedlings (6 days-old) inoculated with *Azospirillum* strains in absence N and exposed to light intensity of  $1.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (the average data of three experiments performed on gnotobiotic culture). Vertical lines denote standard errors. Letters indicate a statistically significant difference between inoculated samples and uninoculated control, according to Fisher's least significant difference (LSD) procedure ( $P \leq 0.05$ )



*A. brasilense* VS9 resulted in the highest leaf:mass ratio and net assimilation rate values; however, inoculation with *A. brasilense* VS9 resulted in the lowest values for specific leaf area and leaf:area ratio.

## Discussion

In this work we found three relevant characteristics of the strain AZm5: it produces high amounts of

**Table 2** Root:Shoot (R:S) ratio of tomato cv. ACE VF55 seedlings (10 days-old) inoculated with *Azospirillum* strains (experiments performed on gnotobiotic culture). Letters indicate a statistically significant difference between inoculated samples and uninoculated control, according to Fisher's least significant difference (LSD) procedure ( $P \leq 0.05$ ). Data are presented as mean±standard error of three replicates

Treatment	kg N ha <sup>-1</sup>	R:S ratio
Control	0	1.3566 (0.0377) a
	170	0.8308 (0.0377) de
	340	0.7804 (0.0384) fe
<i>A. lipoferum</i> AZm5	0	1.1802 (0.0371) b
	170	0.8742 (0.0390) de
	340	0.9059 (0.0390) d
<i>A. brasilense</i> VS9	0	1.2339 (0.0398) ab
	170	1.0382 (0.0384) c
	340	0.6954 (0.0390) f

cytokinins, it contains the gene *acdS*, which encodes ACC deaminase, and it promotes plant growth. *Azospirillum* species are known for their ability to produce plant hormones, mainly IAA, and gibberellins, which play a major role in the promotion of plant growth (Bashan et al. 2004). In comparison with *A. brasilense* VS9, *A. lipoferum* AZm5 produced a high level of cytokinins, but it did not produce IAA. The production of cytokinins by *A. brasilense* and other PGPRs is common (Tien et al. 1979; Greene 1980; Horemans et al. 1986; Cacciari et al. 1989; Taller and Wong 1989; Timmusk et al. 1999; García de Salamone et al. 2001) and this phenomenon is less frequently reported for *A. lipoferum* (Bashan et al. 2004). However, although we tested for it twice, we did not observe the production of cytokinins in VS9. On the other hand, *A. lipoferum* AZm5 is capable of producing others substances like AIA (Esquivel-Cote 2002) but it did not produce specifically AIA and IBA. Therefore, the production of indole pyruvic acid, indole lactic acid, indole acetamide, indole acetaldehyde, indole ethanol and indole methanol, which are similar to IAA (Crozier et al. 1988), needs to be tested.

AZm5 produced high concentrations of ACC deaminase  $2.68 \pm 0.16$  (in  $\mu\text{mol } \alpha \text{ keto-butyrate mg protein per h}$ ), in relation to those produced by *Enterobacter cloacae* UW4 ( $2.43 \pm 0.04$ ), *Escherichia coli* pRKACC ( $1.74 \pm 0.06$ ), *Rhizobium leguminosarum* 128C53K Biovar viciae ( $1.06 \pm 0.17$ ) and *Acidovorax facilis*



**Table 3** Growth of tomato cv. ACE VF55 seedlings (42 days-old) inoculated with *Azospirillum* strains (experiments performed on soil culture). Root:Shoot (R:S) ratio; LMR (leaf mass ratio); SMR (stem mass ratio); RMR (root mass ratio); SLA (specific leaf area); LAR (leaf area ratio); NAR (net assimilation rate); RGR (relative growth rate); LN% (content leaves nitrogen). Letters indicate a statistically significant difference between inoculated samples and uninoculated control, according to Fisher's least significant difference (LSD) procedure ( $P \leq 0.05$ ). Data are presented as mean  $\pm$  standard error of three replicates

Treatment	kg N ha <sup>-1</sup>	Total biomass (g)	R:S ratio	LMR (g g <sup>-1</sup> )	SMR (g g <sup>-1</sup> )	RMR (g g <sup>-1</sup> )	SLA (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	LAR (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )	NAR (g m <sup>-2</sup> day <sup>-1</sup> )	RGR (mg g <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )	LN%
Control	0	0.314 c (0.057)	0.604 a (0.024)	0.349 b (0.009)	0.291 b (0.008)	0.366 ab (0.012)	654.75 c (62.73)	218.40 b (21.38)	0.0007 c (0.00005)	0.151 d (0.002)	2.387 d (0.099)
	170	1.031 b (0.057)	0.387 d (0.024)	0.397 a (0.009)	0.316 a (0.008)	0.278 c (0.012)	775.05 bc (62.73)	314.51 a (21.38)	0.0007 c (0.00005)	0.209 a (0.002)	3.735 b (0.099)
<i>A. lipoferrum</i> AZm5	0	0.355 d (0.057)	0.587 ab (0.024)	0.335 b (0.009)	0.268 c (0.008)	0.381 a (0.012)	1132.09 a (62.73)	383.58 a (21.38)	0.0005 d (0.00005)	0.174 c (0.002)	2.366 d (0.099)
	170	1.093 b (0.057)	0.548 abc (0.024)	0.377 a (0.009)	0.270 bc (0.008)	0.354 ab (0.012)	956.69 ab (62.73)	363.33 a (21.38)	0.0006 cd (0.00005)	0.214 a (0.002)	4.549 a (0.099)
<i>A. brasilense</i> VS9	0	0.428 c (0.063)	0.509 c (0.027)	0.381 a (0.010)	0.290 bc (0.009)	0.336 b (0.013)	296.62 e (68.71)	111.91 c (23.42)	0.0013 a (0.00005)	0.138 e (0.002)	2.380 d (0.099)
	170	1.409 a (0.063)	0.527 bc (0.027)	0.383 a (0.010)	0.265 c (0.009)	0.352 ab (0.013)	483.48 d (68.71)	183.10 b (23.42)	0.0011 b (0.00005)	0.195 b (0.002)	3.275 c (0.099)

AY197008 ( $0.7 \pm 0.1$ ) (Holguin and Glick 2001; Ma et al. 2003, Belimov et al. 2005). This finding coincides with the presence of the *acdS* gene, which encodes ACC deaminase, in AZm5 and also with the root elongation observed in tomato seedlings grown under  $1.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of light; root elongation is promoted by the interruption of ethylene synthesis from ACC (Glick et al. 1998). It was previously reported that tomato seedling root elongation is promoted by ACC deaminase (Grichko and Glick 2001). We also found a 639-bp DNA fragment in AZm5 which corresponds to the *acdS* gene. Has been proposed that more than one type of ACC deaminase gene may exist (Shah et al. 1998), based on the fact that nonspecific *acdS* bands whose nucleotide sequences did not match with the sequences found for other *acdS*-positive isolates have been reported (Shah et al. 1998; Blaha et al. 2006; Govindasamy et al. 2008).

This results, clearly confirmed the presence of ACC deaminase enzyme in bacteria from, soils polluted with sewage sludge in the Mezquital Valley, Mexico, at least as result of the presence of *A. lipoferrum* AZm5. The presence of PGPR containing ACC deaminase has also been reported in bacteria from soils long-standing sewage sludge contaminated with heavy metals in Russia (Belimov et al. 2001), and other areas with similar contamination (Arshad et al. 2007; Rodríguez et al. 2008; Sheng et al. 2008), which suggests the presence of bacteria with a similar activity to AZm5.

It is known that biofertilization with *Azospirillum* strains promotes plant growth (Dobbelaere et al. 2001). However, the effect of this treatment on the variables of plant growth may suggest its functional effect on plants, has not been reported. In tomato plants grown in low N concentrations, AZm5 promoted RGR and an increase in specific leaf area and leaf:area ratio, which resulted in an increase in photosynthetic surface. However, net assimilation rate did not increase, indicating a relatively low photosynthetic efficiency due to the low LN% found in these plants, as occurs in other plants (Lambers et al. 1998); this result did not occur when soil inoculated with AZm5 was also fertilized with nitrates and ammonium (N 170). The effect of this combination match with the increasing the investment of N in leaves found in the tomato seedlings. In contrast, treatment with VS9 had a positive effect on net assimilation ratio in fertilized and unfertilized soils, but in N-fertilized soils, biofertilization with AZm5 was more advantageous for LN%



than using VS9, which coincide with previous investigations where the following were reported: 1) the combination of *Azospirillum* strains and medium fertilizer N dose improved N uptake by plants (Bhattarai and Hess 1998; Gadagi et al. 2004) and 2) under low fertilizer application, the ACC deaminase activity of PGPR improved the effectiveness of nitrogen organic fertilization in tomato plants (Tahir et al. 2006; Shaharoon et al. 2008).

According to the hypothetical model proposed by Van der Werf and Nagel (1996), low availability of nitrogen induces low root cytokinin production; a reduction in the production of cytokinins leads to a reduction in their translocation to leaves, thereby diminishing the photosynthetic capacity and rate of leaf expansion. The high production of cytokinins by AZm5 may explain the increase in leaf expansion in inoculated plants compared with controls or VS9-inoculated plants.

In conclusion, our results suggest that AZm5 may be useful to increase N uptake by the production of cytokinins and promotion of ACC deaminase activity; both favored leaf expansion and leaf N investment, which might promote NAR in the subsequent steps of growth under AZm5 inoculation and low N fertilization (170 kg N ha<sup>-1</sup>). Inoculation with AZm5 alone or in combination did not modify the root:shoot ratio, suggesting that seedlings only increased photosynthetic surface to increase the capture of resources. These results indicate the plasticity of tomato plants in capturing nutrients by their roots. In consequence, to increase crop yield, simultaneous biofertilization with AZm5 and a relatively low concentration of N in comparison to the concentrations recommended for tomato culture (150–400 kg ha<sup>-1</sup>, SAGARPA-INIFAP 2009) may be recommended.

**Acknowledgements** Our special thanks to Dr. E. Martínez, Dr. J. Caballero-Mellado and Dr. A. Rogel (CCG-UNAM) for technical assistance, and Diana Soriano and Irma Acosta for technical support. We also thanks to Dr. A. Gamboa deBuen for the critical review of the manuscript. R. Esquivel-Cote thanks to Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-181624) for scholarship. This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-UNAM IN232802-3.

## References

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME Jr (1992) Ethylene in plant biology. Academic, New York
- Arshad M, Frankenberger WT Jr (1989) Biosynthesis of ethylene by *Acremonium falciforme*. Soil Biol Biochem 21:633–638
- Arshad M, Saleem M, Hussain S (2007) Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. Trends Biotechnol 25:356–362. doi:10.1016/j.tibtech.2007.05.005
- Babalola OO, Osir EO, Sanni AI, Odhiambo GD, Bulimo WD (2003) Amplification of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic (ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in *Striga*-infested soil. Afri J Biotechnol 2:157–160
- Bashan Y (1989) Nonspecific responses in plant growth yield and root colonization of noncereal crops plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. Can J Bot 67:1317–1324
- Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE (2004) *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). Can J Microbiol 50:521–577. doi:10.1139/W04-035
- Belimov AA, Safronova VI, Sergeeva TA, Ergorova TN, Matveyeva VA, Tsyganov VE, Borisov AY, Tikhonovich IA, Kluge C, Preisfeld A, Dietz KJ, Stepanok VV (2001) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase. Can J Microbiol 47:642–652. doi:10.1139/cjm-47-7-642
- Belimov AA, Hontzeas N, Safronova VI, Demchinskaya SV, Piluzza G, Bullitta S, Glick BR (2005) Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). Soil Biol Biochem 37:241–250. doi:10.1016/j.soilbio.2004.07.033
- Bhattarai T, Hess D (1998) Growth and yield responses of a Nepalese spring wheat cultivar to the inoculation with Nepalese *Azospirillum* spp at various levels of nitrogen fertilization. Biol Fertil Soils 26:72–77
- Blaha D, Prigent-Combaret C, Sajjad MM, Moëgne-Loccoz Y (2006) Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. FEMS Microbiol Ecol 56:455–470. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00082.x
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. Anal Biochem 72:248–254
- Cacciari I, Lippi D, Pietrosanti T (1989) Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* pp. and *Arthrobacter*. Plant Soil 115:151–153. doi:10.1007/BF02220706
- Crozier A, Arruda P, Jasmim JM, Monteiro AM, Sandberg G (1988) Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. Appl Environ Microbiol 54:2833–2837
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-González C, Caballero-Mellado J, Aguirre JF, Kapulnik Y, Brenner S, Burdman S, Kadouri D, Sarig S, Okon Y (2001) Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Aust J Plant Physiol 28:871–879
- Döbereiner J, Marriel IE, Nery M (1976) Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can J Microbiol 22:1464–1473
- Esquivel-Cote 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, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México
- Gadagi RS, Krishnaraj PU, Kulkarni JH, Sa T (2004) The effect of combined *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of the blanket flower *Gaillardia pulchella*. *Sci Hort* 100:323–332. doi:10.1016/j.scienta.2003.10.002
- García de Salamone IE, Hynes RK, Nelson LM (2001) Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J Microbiol* 47:404–411. doi:10.1139/cjm-47-5-404
- Glick BR (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol Adv* 21:383–393. doi:10.1016/S0734-9750(03)00055-7
- Glick BR, Karaturovic DM, Newell PC (1995) A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Can J Microbiol* 41:533–536
- Glick BR, Penrose DM, Li J (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor Biol* 190:63–68
- Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng Z, Duan J, McConkey B (2007) Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit Rev Plant Sci* 26:227–242. doi:10.1080/07352680701572966
- Govindasamy V, Senthilkumar M, Gaikwad K, Annapurna K (2008) Isolation and characterization of ACC deaminase gene from two plant growth-promoting rhizobacteria. *Curr Microbiol* 57:312–317. doi:10.1007/s00284-008-9195-8
- Greene EM (1980) Cytokinin production by microorganisms. *Bot Rev* 46:25–74. doi:10.1007/BF02860866
- Grichko VP, Glick BR (2001) Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol Biochem* 39:11–17. doi:10.1016/S0981-9428(00)01212-2
- Hartmann A, Bashan Y (2009) Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB) - special issue. *Eur J Soil Biol* 45:1–2. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.11.004
- Holguin G, Glick BR (2001) Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb Ecol* 41:281–288. doi:10.1007/s002480000040
- Honma M, Shimomura T (1978) Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric Biol Chem* 42:1825–1831
- Horemans S, de Koninck K, Neuray J, Hermans R, Vlassak K (1986) Production of plant growth substances by *Azospirillum* sp. and other rhizosphere bacteria. *Symbiosis* 2:341–346
- Kapulnik Y, Kigel J, Okon Y, Nur I, Henis Y (1981) Effect of *Azospirillum* inoculums on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. *Plant Soil* 61:65–67
- Kende H (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44:283–307
- Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 9:299–306. doi:10.1093/bib/bbn017
- Lambers H, Chapin FS III, Pons TL (1998) Plant physiology ecology. Springer-Verlag, New York
- Lynch J, Brown KM (1997) Ethylene and plant responses to nutritional stress. *Physiol Plant* 100:613–619
- Ma W, Sebastianova S, Sebastian J, Burd GI, Guinel F, Glick BR (2003) Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobia* spp. *Ant Leew* 83:285–291. doi:10.1023/A:1023360919140
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Ryu J, Sa TM (2006) Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Planta* 224:268–278. doi:10.1007/s00425-005-0211-y
- Mayak S, Tirosh T, Glick BR (2004) Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol Biochem* 42:565–572. doi:10.1016/j.plaphy.2004.05.009
- Penrose DM, Glick BR (2001) Levels of ACC and related compounds in exudates and extracts of canola seeds treated with ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Can J Microbiol* 47:368–372. doi:10.1139/cjm-47-4-368
- Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol Plant* 118:10–15
- Perrig D, Boiero ML, Masciarelli OA, Penna C, Ruiz OA, Cassán FD, Luna MV (2007) Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:1143–1150. doi:10.1007/s00253-007-0909-9
- Prigent-Combaret C, Blaha D, Pothier JF, Vial I, Poirier MA, Wisniewski-Dye F, Moëne-Loccoz Y (2008) Physical organization and phylogenetic analysis of acdR as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene acdS in phyto-beneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 65:202–219. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00474.x
- Ribaudo CM, Krumpholz EM, Cassán FD, Bottini R, Cantore ML, Curá JA (2006) *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *J Plant Growth Regul* 24:175–185. doi:10.1007/s00344-005-0128-5
- Rodríguez H, Vessely S, Shah S, Glick BR (2008) Effect of a nickel-tolerant ACC deaminase-producing *Pseudomonas* strain on growth of nontransformed and transgenic canola plants. *Curr Microbiol* 57:170–174. doi:10.1007/s00284-008-9181-1
- SAGARPA-INIFAP (2009) <http://www.inifap.gob.mx>. Accessed 17 July 2009
- Shah S, Li J, Moffatt BA, Glick BR (1998) Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol* 44:833–843
- Shaharoona B, Arshad M, Zahir ZA, Khalid A (2006) Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biol Biochem* 38:2971–2975. doi:10.1016/j.soilbio.2006.03.024
- Shaharoona B, Naveed M, Arshad M, Zahir ZA (2008) Fertilizer-dependent efficiency of pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Appl Microbiol Biotechnol* 79:147–155. doi:10.1007/s00253-008-1419-0

- Sheng XF, Xia JJ, Jiang CY, He LY, Qian M (2008) Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ Pollut* 156:1164–1170. doi:10.1016/j.envpol.2008.04.007
- SIAP-SAGARPA (2009) <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>. Accessed 27 October 2009
- Steenhoudt O, Vanderleyden J (2000) *Azospirillum*, a free-living bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev* 24:487–506
- Tahir M, Arshad M, Navced M, Zahir ZA, Shaharoona B, Ahmad R (2006) Enrichment of recycled organic waste with N fertilizer and PGPR containing ACC-deaminase for improving growth and yield of tomato. *Soil Environ* 25:105–112
- Taller BJ, Wong TY (1989) Cytokinins in *Azotobacter vinelandii* culture medium. *Appl Environ Microbiol* 55:266–267
- Terry E, Leyva A, Hernández A (2005) Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Rev Colomb Biotechnol* 7:47–54
- Tien TM, Gaskin MH, Hubbel DH (1979) Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl Environ Microbiol* 37:1016–1024
- Timmsk S, Nicander B, Granhall U, Tillberg E (1999) Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem* 31:1847–1852. doi:10.1016/S0038-0717(99)00113-3
- USDA (2008) Economic research service. <http://www.ers.usda.gov/Briefing/Vegetables/tomatoes.htm>. Accessed 19 November 2008
- Van der Werf A, Nagel OW (1996) Carbon allocation to shoots and roots in relation to nitrogen supply is mediated by cytokinins and sucrose. *Plant Soil* 185:21–32

---

## CAPÍTULO IV

### Efecto de *Azospirillum* en el crecimiento y producción de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) fertilizadas con diferentes dosis de nitrógeno, en un cultivo en invernadero

#### RESUMEN

En este estudio evaluamos el efecto de tres cepas de *Azospirillum* en el crecimiento de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) Var. Juanita, fertilizadas con dos dosis de nitrógeno (170 y 255 kg N ha<sup>-1</sup>). Se llevó a cabo un análisis de crecimiento y se evaluó la producción de frutos del primer corte. Los resultados mostraron que con una concentración del inóculo de 10<sup>8</sup> células g-raíz<sup>-1</sup>, las raíces de jitomate son colonizadas por las diferentes cepas de *Azospirillum* endofíticamente en un orden de 10<sup>5</sup> células g raíz<sup>-1</sup>. Las cepas AMs3 y AZm5 de *Azospirillum* promueven el crecimiento vegetal en la etapa vegetativa y reproductiva de las plantas de jitomate. La cepa AZm5 de *A. lipoferum* incrementó el contenido de K<sup>+</sup> en frutos de plantas de jitomate fertilizadas con 170 kg N ha<sup>-1</sup>. Este estudio mostró que la dosis de 170 kg N ha<sup>-1</sup> de fertilizante químico nitrogenado fue suficiente para ser empleada en combinación con la inoculación con cepas de *Azospirillum* en plantas de jitomate, cultivadas en invernadero, que es inferior tanto a la recomendada para el cultivo como a la utilizada en diferentes regiones de México donde se cultiva jitomate.

**Palabras clave:** análisis de crecimiento, *Azospirillum*, jitomate, nitrógeno



---

## INTRODUCCIÓN

Uno de los graves problemas ambientales por los que atraviesa el campo agrícola en México y en otros países del mundo, es el uso y abuso de los fertilizantes químicos, principalmente los nitrogenados, los cuales son aplicados al suelo indiscriminadamente para obtener el mayor rendimiento de los cultivos. La cantidad de nitratos que se aplican a los cultivos mediante los fertilizantes generalmente es excesiva, y no es asimilada en su totalidad por la planta, por lo que se lixivia a través del suelo, donde llega a contaminar los acuíferos subterráneos provocando, entre otros, problemas graves de salud por la ingesta de nitratos y nitritos (Ward, 2009). Ante esta situación, se han propuesto alternativas viables para reducir el uso de fertilizantes químicos, especialmente en cultivos con un alto valor económico, como ocurre con el jitomate, la hortaliza de mayor exportación de México (SIAP-SAGARPA, 2009), a cuyo cultivo se llegan a aplicar desde 150 hasta 450 kg N ha<sup>-1</sup> en forma de fertilizante.

Ante esta situación, una de las estrategias más empleadas en todo el mundo ha sido la aplicación al suelo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, plant growth promoting rhizobacteria), de las cuales *Azospirillum* es uno de los géneros mejor conocidos (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). Recomendada para su uso como inoculante, esta bacteria es capaz de influir en el crecimiento y el rendimiento de numerosas especies vegetales, muchas de interés agrícola y ecológico (Bashan *et al.*, 2004; Hartmann y Bashan, 2009). Se ha reportado que la inoculación de plantas con *Azospirillum* incrementa el crecimiento vegetal en presencia de dosis completas o reducidas de nitrógeno en el suelo (Kapulnik *et al.*, 1981; Bhattarai y Hess, 1998; Gadagi *et al.*, 2004). Sin embargo, en la actualidad son escasos los estudios acerca del efecto que las PGPR tienen en el crecimiento y producción de especies hortícolas, para las que uno de los retos agroecológicos y económicamente importantes a cumplir es obtener la mayor producción de frutos con el menor insumo de agroquímicos (pesticidas y fertilizantes) (Pretty, 2008), y en las que el uso de las PGPR ha sido una alternativa prometedora (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2001). Con base en lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inoculación de *Azospirillum* en el crecimiento y producción de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) fertilizadas con dosis reducidas de nitrógeno.

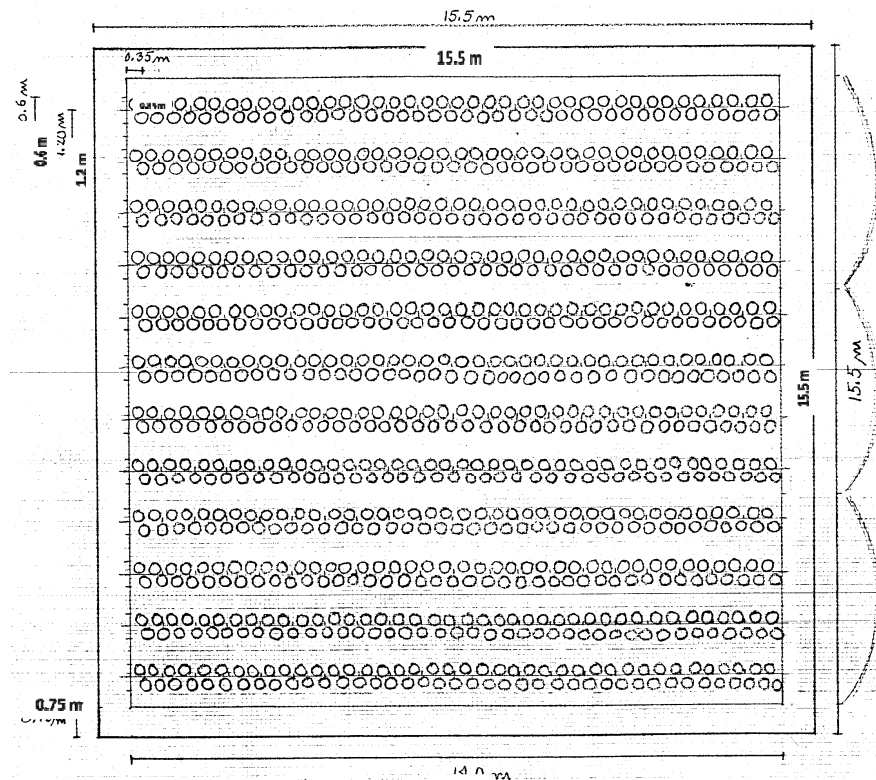


## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM, y del Laboratorio de Ecofisiología Vegetal del Instituto de Ecología, UNAM. El trabajo de invernadero se realizó en la mini empresa productora y comercializadora de jitomate, JITOSAN SPR de RL; ubicado en San Santiago Tepalcatlalpan, Xochimilco, D.F., propiedad del Sr. Pedro Jiménez Olivares y del MVZ Fermín Jiménez Flores.

### Cultivo de plantas de jitomate e invernadero

La técnica seleccionada para el cultivo de las plantas de jitomate incluyó la germinación en almácigo y trasplante en un sistema semi hidropónico llevándose a cabo de marzo a octubre de 2004. El cultivo se realizó en un invernadero de 240.25 m<sup>2</sup> (Figura 4.1, ver Anexo 1), con cubierta plástica que dejaba pasar el 90% de luz, y con las siguientes condiciones ambientales: 35-40°C/10-15°C (día/noche) de temperatura, 80 % de humedad relativa y luz natural, las cuales fueron monitoreadas con el datalogger HOBO (Model H08-004-02) y el software BoxCar Pro 4.0.



**Figura 4.1** Esquema que muestra las medidas del invernadero y la distribución de las unidades experimentales.

## Preparación del almácigo y de unidades experimentales

El almácigo se preparó en charolas de unicel con 242 cavidades (11x22), las cuales se rellenaron con un sustrato preparado con turba canadiense (Lambert Peat Moss Inc., Riviere-Ouelle, QC, CAN) y agrolita (Minerales Expandidos, S.A. de C.V., MEX, MEX), en una proporción de 10:1, el cual se humedeció a saturación con una solución de dos fungicidas (Terrazan 75 PH<sup>1</sup> y Ridomil Gold Bravo 76.5 PH<sup>2</sup>, Agroo LC S.A de C.V., OAX, MEX), con objeto de prevenir la infección por hongos (situación muy común entre los cultivos de esta zona), ambos en una concentración de 1 g l<sup>-1</sup>. Previamente a la aplicación de estos dos fungicidas, se realizó una prueba de sensibilidad (Concentración Mínima Inhibitoria y Difusión en Placa) para las cepas de *Azospirillum*, en la que se verificó que los fungicidas no afectaban el desarrollo de las cepas y por tanto el resultado del experimento. Para el trasplante se prepararon bolsas de plástico negro (unidades experimentales), perforadas en la base para favorecer el drenaje, con 21.5 kg de sustrato, el que se preparó con tezontle rojo (5 mm de diámetro) y suelo no estéril, en una proporción de 3:1. El sustrato fue humedecido con agua corriente previamente al trasplante (Anexo 1). La densidad de plantas fue de seis plantas m<sup>-2</sup>.

## Análisis físico, químico y microbiológico del suelo

El suelo que se utilizó como parte del sustrato fue analizado de acuerdo a sus características físicas y químicas, como: textura, densidad aparente, pH, materia orgánica (%), nitrógeno total (%), fósforo total (ppm), potasio (ppm) y calcio (ppm). Así mismo, se realizó un análisis microbiológico del sustrato. En dicho análisis se llevó a cabo la cuantificación por la técnica de dilución y vertido en placa, con los siguientes medios de cultivo y condiciones de incubación: para bacterias mesófilas aerobias, se usó Gelosa Nutritiva (Difco Laboratories, Detroit, MI, EU), a 37±2°C por 48 h; para hongos (filamentosos y levaduras), Agar Sabouraud (Difco Laboratories, Detroit, MI, EU), a 28±2°C por 3-5 días. La técnica del número más probable (NMP) se realizó para cuantificar el número de bacterias del género *Azospirillum*, en medio NFB semisólido (NFB-ss), a 34±2°C por 48 h, registrándose como tubos positivos aquellos que presentaron las características típicas de *Azospirillum*: formación de una película blanca bien definida en el área microaerófila acompañada de la alcalinización del medio de cultivo (Tarrand *et al.*, 1978; Döbereiner *et al.*, 1976) (ver Anexo 1).

<sup>1</sup> Quintozeno-(Pentacloronitrobenzeno). Equiv. a 750 g I.A./kg

<sup>2</sup> Metalaxil-M:(R)-2((2,6 dimetilfenil)metoxiacetilamonio)-ácido propiónico metil. Equiv. a 45 g de I.A./kg y Clorotalonil: Tetracloroisoftalonitrato. Equiv. a 720 g de I.A./kg.

## Cepas y producción del inoculante bacteriano

Se evaluaron tres cepas de *Azospirillum* de la colección del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química (UNAM): AMs3, AZm5 y VS9 (Cuadro 4.1), las cuales se han reportado como promotoras del crecimiento de plantas de jitomate (Esquivel-Cote, 1997; Esquivel-Cote, 2002; Urzúa, 1997; Urzúa, 2001). A partir de los cultivos activos en medio de cultivo NFB-ss (Tarrand *et al.*, 1978; Döbereiner *et al.*, 1976), de cada cepa se transfirió una asada a un matraz Erlenmeyer (250 ml) con 100 ml de medio de cultivo NFB líquido (NFB-I), se incubó en agitación a 150 rpm a  $34\pm 2^\circ\text{C}$  por 48 h; posteriormente con 1 ml de esta suspensión se inoculó otro matraz con 100 ml del mismo medio de cultivo y se incubó en agitación a 150 rpm a  $34\pm 2^\circ\text{C}$  por 24 h. Finalmente, la población microbiana se ajustó a una densidad óptica (560 nm) de aproximadamente 0.01, en un espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec 3000. La concentración bacteriana de cada inóculo se muestra en el siguiente cuadro.

**Cuadro 4.1** Población de células de *Azospirillum* presente en los inóculos.

Cepa	Origen	Especie	Densidad Óptica (560nm)	Inóculo (células ml <sup>-1</sup> )
AMs3 <sup>a</sup>	Rizosfera de alfalfa ( <i>Medicago sativum</i> L.), Valle del Mezquital, Hgo.	<i>Azospirillum</i> sp.	0.013	$>1\times 10^8$
AZm5 <sup>a</sup>	Rizosfera de maíz ( <i>Zea mays</i> L.), Valle del Mezquital, Hgo.	<i>A. lipoferum</i>	0.013	$>1\times 10^8$
VS9 <sup>b</sup>	Rizosfera de sorgo ( <i>Sorghum</i> sp. L.) Valle de Santiago, Gto.	<i>A. brasilense</i>	0.014	$1\times 10^6$

<sup>a</sup>Esquivel-Cote, 2002; <sup>b</sup>Flores-Ayala, 1985

## Siembra, inoculación y trasplante

Se utilizó semilla certificada de jitomate bola (*Solanum lycopersicum*), variedad Juanita (832, Hazera Seeds, Inc., FL, EU) (Cuadro 4.2). Las semillas fueron sembradas sobre el sustrato del almácigo (una por cavidad) y cubiertas con este mismo. Los almácigos se regaron a saturación por aspersión con agua corriente. Quince días después de la siembra (dds) se realizó la inoculación (200 µl de inóculo en la base de cada plántula). A los 71 dds, se llevó a cabo el trasplante, donde se seleccionaron plántulas uniformes de cada tratamiento, posteriormente la raíz fue sumergida en la solución de fungicidas, ya mencionados, y trasplantadas, una plántula por cada unidad experimental (ver Anexo 1).

**Cuadro 4.2** Características de la variedad Juanita (832, Hazera Seeds, Inc., FL, EU).

Característica	
Tipo de crecimiento	Indeterminado
Resistencia a	<i>Fusarium oxysporium</i> f. sp. <i>licopersici</i> ; <i>Verticillium</i> y el virus del mosaico del tabaco.
Madurez relativa	Normal
Vigor	Fuerte
Firmeza	Buena
Peso del fruto	150 – 250 g
Forma	Deep Oblate
Hombros	Sí, verdes

### Fertilización y riego

El fertilizante se administró como solución nutritiva, la cual se preparó de acuerdo a la formulación recomendada por Hazera Seeds, Inc. (FL, EU) (Cuadro 4.3) para la variedad de jitomate empleada en este estudio, en un cultivo intensivo. Se evaluaron dos niveles de fertilización nitrogenada: 170 y 255 kg N ha<sup>-1</sup>; correspondientes al 50% y 75% respectivamente, de la dosis completa recomendada. La solución se aplicó en el riego (ver Anexo 1), el cual se realizó durante 2-3 min (1.5 litros aprox.), tres veces por semana, y un riego con solo agua, una vez cada dos semanas para evitar la acumulación de sales. La concentración de amonio (ppm) y de nitrato (ppm) en el sustrato fue medido a los 90 y 200 días después del trasplante, de acuerdo a la técnica descrita en Jackson (1976).

**Cuadro 4.3** Solución nutritiva recomendada para el cultivo hidropónico de jitomate (*Solanum lycopersicum*), recomendada por Hazera Seeds, Inc. (FL, EU).

Nutriente <sup>a</sup>	kg N ha <sup>-1</sup>			
	0	170	255	340
KNO <sub>3</sub>	0	25	37.5	50
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	0	475	712.5	950
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	20	30	40
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	25	37.5	50
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100	100	100	100
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500	500	500	500
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	800	800	800	800
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15	15	15	15
MnSO <sub>4</sub>	3	3	3	3
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> •10H <sub>2</sub> O	5	5	5	5
CuSO <sub>4</sub>	0.5	0.5	0.5	0.5
ZnSO <sub>4</sub>	0.5	0.5	0.5	0.5

<sup>a</sup>Los nutrientes están expresados en mg l<sup>-1</sup> de agua. El pH final fue de 6.0±0.2.

### Cuantificación endofítica de *Azospirillum* en las raíces de jitomate

La población de cada una de las cepas se cuantificó en el medio de cultivo NFB-ss, a los 71 (trasplante) y 200 dds, mediante la técnica del NMP con tres repeticiones.

### Análisis de crecimiento vegetal y producción

El análisis se llevó a cabo a los 71 y 122 dds (trasplante y cosecha). La planta fue separada de las hojas, del tallo y la raíz. El área foliar (AF) fue medida usando un medidor de área (Delta-T Devices Ltd., Cambridge, England). Las plántulas se secaron a  $70\pm 2^{\circ}\text{C}$  en una estufa (Boekel Industries Inc. Mod. 107801) y el peso seco (PS) se determinó en las diferentes partes de las plantas (hojas, tallo y raíz). Posteriormente se calculó la biomasa total (BT), la relación raíz:vástago (R:V) y las variables de crecimiento de acuerdo a Hunt (1990), descritas en el Cuadro 4.4. La producción de frutos se consideró a los 122 dds, al corte de los frutos provenientes de los cuatro primeros racimos florales. El peso fresco de cada fruto se registró empleando una balanza analítica Sartorius BP310P (Sartorius AG, Göttingen, GER). (ver Anexo 1).

**Cuadro 4.4** Variables evaluadas para el análisis de crecimiento vegetal de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*).

Variable <sup>a</sup>	Definición	Fórmula
LMR	hoja:biomasa	PS hoja / PS total
SMR	tallo:biomasa	PS tallo / PS total
RMR	raíz:biomasa	PS raíz / PS total
SLA	área foliar específica	AF / PS hoja
LAR	PS total:área foliar	SLA × LMR
NAR	tasa de asimilación neta	$(PS_2 - PS_1 / t_2 - t_1) (\ln AF_2 - \ln AF_1 / AF_2 - AF_1)$
RGR	tasa relativa de crecimiento	LAR × NAR

<sup>a</sup>De sus siglas en inglés: LMR = Leaf Mass Ratio, SMR = Steam Mass Ratio, RMR = Root Mass Ratio, SLA = Specific Leaf Area, LAR = Leaf Area Ratio, NAR = Net Assimilation Rate, RGR = Relative Growth Rate.

### Análisis Químico Proximal (AQP) de frutos

Un AQP (AOAC, 2005) se aplicó en los frutos del primer racimo. Se eligieron ocho frutos por tratamiento al azar, los cuales se secaron a  $70\pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta un peso constante. El análisis se realizó en el Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, y consistió en el cálculo de: materia seca, humedad, proteína cruda (Nx6.25), extracto etéreo, cenizas, fibra cruda, extracto libre de nitrógeno, potasio, y pH (1:1).

## Diseño experimental

El diseño del experimento fue factorial 4x2x6, considerando 4 tratamientos (3 inóculos de *Azospirillum* y un control); 2 niveles de fertilización con nitrógeno (255 Kg ha<sup>-1</sup> y 170 Kg ha<sup>-1</sup>, 75 y 50% de la dosis recomendada respectivamente) y 6 repeticiones por tratamiento y por nivel; distribuidos en tres bloques al azar.

## Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de dos vías y 2 niveles, con 6 repeticiones (MANOVA) y el software StatGraphics Centurion XV (2006, Statpoint Technologies Inc., VA, USA). Las medias fueron comparadas usando el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD, least significant difference) de Fisher ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS

### Análisis físico, químico y microbiológico del suelo

Las características físicas y químicas del suelo se presentan en el Cuadro 4.5, en el que se muestra que las características físicas del suelo fueron las adecuadas para el cultivo del jitomate, ya que de acuerdo con Castilla (1995), este cultivo se desarrolla bien en suelos sueltos (arenosos) y bien drenados, un pH de 5 a 7, y ligeramente más básicos como los de suelos calizos.

De acuerdo a los resultados del análisis químico, el suelo presentó un buen porcentaje de materia orgánica, y no presentó deficiencias en cuanto a nitrógeno, fósforo, potasio y calcio (Fassbender y Bornemisza, 1987).

**Cuadro 4.5** Características físicas y químicas del suelo empleado en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*).

Textura			Densidad Aparente (g cc <sup>-1</sup> )	pH	Materia Orgánica (%)	N total (%)	P total (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)
arena (%)	limo (%)	arcilla (%)							
84.76	8.92	5.32	1.435	7.73	3.19	0.1	785.34	968.5	1036.5

En el Cuadro 4.6 se muestra los resultados del análisis microbiológico realizado en los sustratos empleados en el cultivo de jitomate (turba-agrolita y suelo), donde observamos que el sustrato turba-agrolita presentó una concentración menor a 10 células bacterianas g sustrato<sup>-1</sup> (límite inferior de diluciones que se manejaron en el análisis). Resultados que eran de esperarse ya que los materiales que se emplearon durante el experimento fueron adquiridas de empresas con un alto control de calidad en sus productos, por lo que podríamos suponer la ausencia total, tanto de hongos, como de *Azospirillum*. Estos resultados nos podrían asegurar que, el efecto en el crecimiento de las plántulas a los 71 dds, se debió a la presencia o ausencia de los inóculos evaluados en este experimento.

**Cuadro 4.6** Resultados del análisis microbiológico realizado en los sustratos empleados en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*), turba-agrolita (almácigo) y suelo (trasplante).

Hongos levaduriformes (células g sustrato <sup>-1</sup> )		Hongos filamentosos (células g sustrato <sup>-1</sup> )		Bacterias mesófilas aerobias (células g sustrato <sup>-1</sup> )		<i>Azospirillum</i> (células g sustrato <sup>-1</sup> )	
turba-agrolita	suelo	turba-agrolita	suelo	turba-agrolita	suelo	turba-agrolita	suelo
< 1 x 10 <sup>2</sup>	4.2 x 10 <sup>5</sup>	< 1 x 10 <sup>2</sup>	<1x10 <sup>3</sup>	2.5 x10 <sup>1</sup>	2x10 <sup>6</sup>	< 1 x 10 <sup>2</sup>	<1x10 <sup>3</sup>

Respecto al suelo, éste presentó una población microbiana normal (Atlas y Bartha, 2001), donde verificamos que la cantidad de células de *Azospirillum* g sustrato<sup>-1</sup> no representaban un riesgo para el experimento, debido a dos factores principalmente: primero, las raíces de las plántulas que se trasplantaron a suelo se debían encontrar colonizadas previamente por las células de los inóculos de *Azospirillum* evaluados en este estudio, y como lo veremos más adelante; y segundo, la cantidad de células de *Azospirillum* debió disminuir al diluir el suelo con tezontle para preparar las unidades experimentales, por lo que la cantidad de células con posibilidad de colonizar las raíces de jitomate fueron mínimas. Al respecto se ha reportado que la adhesión de células de *Azospirillum* a las de la raíz es esencial para el establecimiento de la simbiosis con la planta hospedero; sin embargo, las posibilidades de adhesión y posterior agregación en la raíz disminuyen debido a que las células compiten con la microbiota predadora del suelo y la establecida primeramente (Burdman *et al.*, 2000).

### Fertilización y Riego

Las concentraciones de amonio y de nitrato presentes en el sustrato a los 90 y 200 dds, se muestran en el Cuadro 4.7. La concentración de nitrato presente en el sustrato de los tratamientos fertilizados con 255 kg N ha<sup>-1</sup> fue diez veces mayor que los fertilizados con 170 kg N ha<sup>-1</sup> a los 90 dds; sin embargo, esta proporción disminuyó notablemente a los 200 dds.

La cantidad de amonio presente en el sustrato fertilizado con 255 kg N ha<sup>-1</sup> fue del doble respecto a lo registrado con los tratamientos de fertilización con 170 kg N ha<sup>-1</sup>, tanto a los 90 como a los 200 dds. Así mismo en este estudio, observamos que en el sustrato utilizado, la concentración de nitratos fue mayor a la de amonio, en una proporción de 1:1000, con ambas dosis de fertilización (170 y 255 kg N ha<sup>-1</sup>) a los 90 y 200 dds.

**Cuadro 4.7** Concentración de amonio y nitrato, presente en el sustrato, monitoreado a diferentes días de después de la siembra (dds) del cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*).

Tratamiento kg N ha <sup>-1</sup>	90 dds		200 dds	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (ppm)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (ppm)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm)
170	0.322	2.245	0.940	43.44
255	0.614	24.205	2.268	56.77

#### Cuantificación endofítica de *Azospirillum* en las raíces de jitomate

La población de células de *Azospirillum* presente endofíticamente en las raíces de las plantas inoculadas fue de 1x10<sup>5</sup> células g raíz<sup>-1</sup>, a los 71 dds (Cuadro 4.8). El desarrollo de las bacterias en el medio de cultivo NFB-ss fue típico para el género *Azospirillum* de acuerdo a lo reportado por Döbereiner y colaboradores (1976), y Tarrand y colaboradores (1978). En tanto que, las raíces de las plantas no inoculados, a pesar de que presentaron una población de 5x10<sup>2</sup> células de *Azospirillum* g raíz<sup>-1</sup>, el desarrollo no fue totalmente característico, ya que presentaban una película blanca difusa en la zona microaerofílica del medio de cultivo. Estos resultados nos permitirían asegurar que esta población bacteriana no influyó en el crecimiento de las plantas de jitomate durante su cultivo después del trasplante. Al final del cultivo (200 dds) la población de células de *Azospirillum* disminuyó en la mayoría de los tratamientos inoculados.

**Cuadro 4.8** Población de células de *Azospirillum* presente en raíces de jitomate Var. Juanita, a diferentes días después de la siembra (dds) del cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*).

Inóculo	kg N ha <sup>-1</sup>	células g raíz <sup>-1</sup>	
		71 dds	200 dds
AMs3	170	7 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>3</sup>
	255	7 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>4</sup>
AZm5	170	7 x 10 <sup>5</sup>	1.4 x 10 <sup>5</sup>
	255	7 x 10 <sup>5</sup>	7.2 x 10 <sup>4</sup>
VS9	170	1 x 10 <sup>5</sup>	1.1 x 10 <sup>4</sup>
	255	1 x 10 <sup>5</sup>	4 x 10 <sup>3</sup>
Control	170	5 x 10 <sup>2</sup>	<1 x 10 <sup>3</sup>
	255	5 x 10 <sup>2</sup>	<1 x 10 <sup>3</sup>



---

### Análisis de crecimiento vegetal y producción

A los 71 dds, las plantas inoculadas con *Azospirillum*, asignaron significativamente mayor biomasa al tallo (SMR) ( $F=11.31$ ,  $P=0.0001$ ) en comparación con aquellas no inoculadas (Cuadro 4.9). Las plantas inoculadas con la cepa AMs3 y con la AZm5 incrementaron significativamente la tasa de asimilación neta (NAR) ( $F=4.07$ ,  $P=0.0207$ ) y la tasa relativa de crecimiento (RGR) ( $F=7.44$ ,  $p=0.0016$ ) respecto a las plantas inoculadas con la cepa VS9 y las no inoculadas. En todos los tratamientos no se presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la relación R:V, biomasa asignada a hojas (LMR), área foliar específica (SLA) y la relación entre el área foliar específica respecto a la biomasa total de la planta (LAR).

En el Cuadro 4.10, se muestran los resultados del análisis de crecimiento en plantas de jitomate inoculadas con *Azospirillum* y fertilizadas con diferentes dosis de nitrógeno. Se observa que las plantas inoculadas con la cepa AMs3, AZm5 y fertilizadas con 170 kg N ha<sup>-1</sup> incrementaron significativamente la relación R:V ( $F=3.36$ ,  $p=0.0084$ ) y la biomasa asignada a raíz (RMR) ( $F=3.29$ ,  $p=0.0094$ ) respecto a las plantas no inoculadas y fertilizadas con 170 kg N ha<sup>-1</sup>. No obstante, que no se presentaron diferencias significativas, las plantas inoculadas con la cepa AMs3 y fertilizadas con 170 kg N ha<sup>-1</sup> presentaron los valores más altos en el área foliar específica (SLA) y la relación entre el peso foliar y la biomasa total de la planta (LAR) y respecto a los demás tratamientos. En tanto que, las plantas inoculadas con la cepa AMs3 y fertilizadas con 255 kg N ha<sup>-1</sup> presentaron los valores más altos en la tasa de asimilación neta (NAR) ( $F=1.09$ ,  $p=0.3916$ ) respecto a las inoculadas con la cepa VS9 y fertilizadas con 255 kg N ha<sup>-1</sup>. Es importante mencionar que, comparativamente, las plantas no inoculadas y fertilizadas con presentaron los valores más altos en la relación R:V, la biomasa asignada a tallo (SMR) y a raíz (RMR).

La producción de frutos de los primeros cuatro racimos florales, se vió estadísticamente incrementada por efecto de la fertilización nitrogenada ( $F=2$ , 198;  $p=0.00067$ ), siendo las plantas fertilizadas con el 50% de la dosis de N recomendada (170 kg N ha<sup>-1</sup>) las que tuvieron una mayor producción (1500 g de fruto planta<sup>-1</sup>), en comparación con aquellas plantas fertilizadas con el 75% de la dosis de N recomendada (255 kg N ha<sup>-1</sup>) (1330 g de fruto planta<sup>-1</sup>). La inoculación bacteriana no influyó en la producción de frutos. No obstante, la interacción de ambos factores mostró que las plantas inoculadas con la cepa AMs3 y fertilizadas con 170 kg N ha<sup>-1</sup> favorecieron la producción de frutos (Cuadro 4.11). De acuerdo a Hazera Seeds, Inc. (FL, EU), el peso característico del fruto de jitomate para la variedad Juanita se encuentra entre 150 y 250 g (Cuadro 4.2). Con base en lo anterior, la mayor cantidad de frutos con este rango de peso, se registró en las plantas fertilizadas con 170 kg N ha<sup>-1</sup>. En tanto que las plantas que produjeron una mayor cantidad de frutos menores a 150 g fueron las fertilizadas con 255 kg N ha<sup>-1</sup>.

**Cuadro 4.9** Análisis de crecimiento de plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) (71 días después de la siembra, trasplante) inoculadas con cepas de *Azospirillum* (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo) y fertilizadas con diferentes dosis de nitrógeno. Relación Raíz:Vástago (R:V); LMR (relación hoja biomasa); SMR (relación tallo biomasa); RMR (relación raíz biomasa); SLA (área foliar específica); LAR (relación hoja área foliar); NAR (tasa neta de asimilación); RGR (tasa relativa de crecimiento). Las letras indican la diferencia estadísticamente significativa entre las muestras inoculadas y el control, de acuerdo al método de Fisher (LSD, least significant difference) con un límite de confianza de 0.05. Los datos en paréntesis ( $\pm$ ) representan el error estándar de la media de cinco réplicas.

Tratamiento	Relación R:V	LMR (g g <sup>-1</sup> )	SMR (g g <sup>-1</sup> )	RMR (g g <sup>-1</sup> )	SLA (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	LAR (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )	NAR (g m <sup>-2</sup> día <sup>-1</sup> )	RGR (mg g <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )
<i>Azospirillum</i> sp. AMs3	0.3276 (0.043)	0.4107 (0.014)	0.3444 a (0.012)	0.2448 b (0.022)	396.244 (21.758)	162.389 (9.265)	0.00055 a (0.00004)	0.0855 a (0.0032)
<i>A. lipoferum</i> AZm5	0.3611 (0.043)	0.4149 (0.014)	0.3237 a (0.012)	0.2613 ab (0.022)	377.791 (21.758)	156.290 (9.265)	0.00056 a (0.00004)	0.0866 a (0.0032)
<i>A. brasilense</i> VS9	0.3987 (0.043)	0.4000 (0.014)	0.3218 a (0.012)	0.2781 ab (0.022)	410.485 (21.758)	163.881 (9.265)	0.00045 ab (0.00004)	0.0731 b (0.0032)
Control	0.4565 (0.043)	0.4333 (0.014)	0.2539 b (0.012)	0.3127 a (0.022)	402.056 (21.758)	173.619 (9.265)	0.00040 b (0.00004)	0.0693 b (0.0032)

**Cuadro 4.10** Análisis de crecimiento de plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) (122 días después de la siembra) inoculadas con cepas de *Azospirillum* (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo) y fertilizadas con diferentes dosis de nitrógeno. Relación Raíz:Vástago (R:V); LMR (relación hoja biomasa); SMR (relación tallo biomasa); RMR (relación raíz biomasa); SLA (área foliar específica); LAR (relación hoja área foliar); NAR (tasa neta de asimilación); RGR (tasa relativa de crecimiento). Las letras indican la diferencia estadísticamente significativa entre las muestras inoculadas y el control, de acuerdo al método de Fisher (LSD, least significant difference) con un límite de confianza de 0.05. Los datos en paréntesis ( $\pm$ ) representan el error estándar de la media de seis réplicas.

Tratamiento	kg N ha <sup>-1</sup>	Relación R:V	LMR (g g <sup>-1</sup> )	SMR (g g <sup>-1</sup> )	RMR (g g <sup>-1</sup> )	SLA (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	LAR (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )	NAR (g m <sup>-2</sup> día <sup>-1</sup> )	RGR (mg g <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )
<i>Azospirillum</i> sp. AMs3	170	0.149 a (0.013)	0.333 ab (0.021)	0.368 ab (0.022)	0.129 a (0.010)	269.58 a (18.93)	89.879 a (7.811)	0.00073 b (0.00008)	0.0623 ab (0.0008)
	255	0.109 c (0.013)	0.300 c (0.021)	0.352 b (0.022)	0.098 c (0.010)	213.73 b (18.93)	65.230 b (7.811)	0.00100 a (0.00008)	0.0602 b (0.0008)
<i>A. lipoferum</i> AZm5	170	0.147 ab (0.013)	0.367 ab (0.021)	0.379 ab (0.022)	0.128 ab (0.010)	208.79 b (18.93)	76.855 ab (7.811)	0.00082 ab (0.00008)	0.0623 ab (0.0008)
	255	0.101 c (0.013)	0.312 bc (0.021)	0.352 b (0.022)	0.091 c (0.010)	250.49 ab (18.93)	76.908 ab (7.811)	0.00085 ab (0.00008)	0.0626 a (0.0008)
<i>A. brasilense</i> VS9	170	0.111 bc (0.013)	0.334 abc (0.021)	0.385 ab (0.022)	0.099 bc (0.010)	252.90 ab (18.93)	84.287 ab (7.811)	0.00075 b (0.00008)	0.0623 ab (0.0008)
	255	0.129 abc (0.013)	0.394 a (0.021)	0.388 ab (0.022)	0.114 abc (0.010)	223.14 ab (18.93)	87.199 ab (7.811)	0.00074 b (0.00008)	0.0626 a (0.0008)
Control	170	0.105 c (0.013)	0.333 abc (0.021)	0.374 ab (0.022)	0.094 c (0.010)	219.28 ab (18.93)	73.082 ab (7.811)	0.00087 ab (0.00008)	0.0615 ab (0.0008)
	255	0.163 a (0.013)	0.353 abc (0.021)	0.422 a (0.022)	0.140 a (0.010)	209.64 b (18.93)	74.073 ab (7.811)	0.00082 ab (0.00008)	0.0606 ab (0.0008)

**Cuadro 4.11** Producción de frutos en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*). (122 días después de la siembra) inoculadas con cepas de *Azospirillum* (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo) y fertilizadas con diferentes dosis de nitrógeno. Las letras indican la diferencia estadísticamente significativa entre las muestras inoculadas y el control, de acuerdo al método de Fisher (LSD, least significant difference) con un límite de confianza de 0.05. Los datos en paréntesis ( $\pm$ ) representan el error estándar de la media de ocho réplicas.

Tratamiento	kg N ha <sup>-1</sup>	Producción de frutos (g planta <sup>-1</sup> )	Número de frutos planta <sup>-1</sup>	% de frutos <150g	% de frutos 150-250g	% de frutos >250g
<i>Azospirillum sp.</i> AMs3	170	1700.09 a (122.181)	16.96	82.38	16.89	0
	255	1315.5 b (122.181)	14.73	88.77	11.03	0
<i>A. lipoferum</i> AZm5	170	1439.8 ab (124.6)	15.24	82.72	16.78	0.48
	255	1199.89 b (124.6)	16.48	94.91	4.83	0.24
<i>A. brasilense</i> VS9	170	1355.83 b (122.181)	15.61	88.80	11.18	0
	255	1483.67 ab (119.897)	17.33	88.14	11.65	0.21
Control	170	1506.75 ab (122.181)	15.96	81.88	18.12	0
	255	1324.16 b (122.181)	16.73	93.28	6.70	0

#### Análisis Químico Proximal (AQP) de frutos

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de las variables del AQP en frutos de jitomate de los diferentes tratamientos (Cuadro 4.12). Sin embargo, los frutos cosechados de las plantas inoculadas con la cepa VS9 de *A. brasilense* fertilizadas con 255 kg N ha<sup>-1</sup> incrementaron significativamente la cantidad de minerales presentes en el fruto (cenizas) ( $F=5.206$ ,  $p=0.009$ ), en tanto que la cepa AZm5 de *A. lipoferum* y fertilizadas con 255 kg N ha<sup>-1</sup> presentaron significativamente los niveles más altos en el porcentaje de potasio ( $F=16.547$ ,  $p=0.0001$ ).

**Cuadro 4.12** Análisis Químico Proximal de frutos en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*), del primer corte, a los 122 días de desarrollo. Las letras indican la diferencia estadísticamente significativa entre las muestras inoculadas y el control, de acuerdo al método de Fisher (LSD, least significant difference) con un límite de confianza de 0.05.

Inóculo	kg N ha <sup>-1</sup>	Materia seca (%)	Humedad (%)	Proteína cruda Nx6.25 (%)	Extracto etéreo	Cenizas (%)	Fibra cruda (%)	Extracto libre de nitrógeno (%)	Potasio (%)	pH (1:1)
AMs3	170	96.49	3.51	19.06	3.96	11.15 b	12.85	53.15	3.83 bc	4.49
	255	96.92	3.08	18.05	2.24	12.24 b	11.44	556.03	3.66 bc	4.51
AZm5	170	94.04	5.96	17.91	2.59	12.04 b	18.03	49.44	4.36 b	4.50
	255	98.98	1.02	18.07	3.52	14.13 b	13.30	50.98	5.59 a	4.53
VS9	170	97.28	2.71	17.37	2.14	12.37 b	11.56	56.59	3.44 c	4.51
	255	97.96	2.04	19.69	3.50	17.03 a	11.19	48.67	3.63 bc	4.48
Control	170	98.33	1.67	18.07	2.69	13.72 b	15.78	49.77	3.69 bc	4.53
	255	97.45	2.55	18.80	2.30	13.11 b	17.26	48.53	3.98 bc	4.50

## DISCUSIÓN

Uno de los factores que afectan la respuesta de la planta a la inoculación es la falta de una colonización microbiana de las células de la raíz en el momento preciso requerido por la planta (Bashan, 1998; Lugtenberg y Kamilova, 2009). Con base en lo anterior, se ha reportado que un inóculo con una concentración de  $1 \times 10^8$  células de *Azospirillum* por  $\text{ml}^{-1}$  medio de cultivo, es necesario para que se lleve a cabo la colonización bacteriana en raíces de diferentes especies vegetales como maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*), trigo (*Triticum aestivum*) y jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Esquivel-Cote, 2002; Terry *et al.*, 2005; Abril *et al.*, 2006; García-Olivares *et al.*, 2006). No obstante, los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la cepa VS9 de *A. brasilense* es capaz de colonizar las raíces de jitomate (*Solanum lycopersicum*) var. Juanita, a una concentración menor ( $1 \times 10^6$  células,  $\text{ml}^{-1}$  de medio de cultivo) de inóculo. A este respecto se ha reportado que, algunas células de *Azospirillum* son capaces de formar flóculos para agregarse en las raíces y de esta forma colonizar y establecer una asociación eficiente con la planta hospedero hasta en condiciones ambientales desfavorables (Burdman *et al.*, 2000), característica que probablemente se presente con la cepa VS9 de *A. brasilense*.

Se ha reportado que la principal fisiopatía en los jitomates cultivados en hidroponía es la podredumbre apical negra del fruto, ocasionada por deficiencias de calcio en el sustrato (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995), por lo que las fórmulas empleadas para fertilizar el cultivo, además de nitrógeno, contienen grandes cantidades de calcio. En este estudio, las fuentes de nitrógeno que se aplicaron en la solución nutritiva fueron el nitrato de calcio, el nitrato de potasio, el fosfato de amonio y el sulfato de amonio, de los cuales el nitrato de calcio se adicionó en una cantidad diez veces mayor respecto a las otras fuentes; lo anterior puede ser la causa de que en nuestro cultivo las concentraciones de nitrato hayan sido muy superiores a las de amonio. Por otro lado, se ha estudiado que la volatilización de amonio es una de las principales causa de pérdida de la mayor cantidad de nitrógeno aplicado al suelo mediante la fertilización (Pepper *et al.*, 2006). Nuestros resultados sugiere que el sistema de cultivo empleado en este experimento (semi hidropónico) favoreció la acumulación de nitratos, ya que al comparar estos resultados con la concentración de nitratos presentes en el suelo de un cultivo en campo, simultáneo a nuestro experimento, fertilizado con  $340 \text{ kg N ha}^{-1}$  (100% de la dosis al recomendada por Hazera Seeds, Inc. FL, EU), se observó que la concentración de nitratos fue diez veces menor que la presente en el sustrato de nuestras unidades experimentales (datos no publicados), lo que hace suponer que los nitratos, del experimento simultáneo, fueron lixiviados mediante el riego a través del suelo. Lo anterior, sugiere que el mecanismo empleado por las cepas de *Azospirillum* para promover el crecimiento de las plantas de jitomate no fue la fijación de nitrógeno, ya que ésta se inhibe ante la presencia de nitrógeno en el medio (Fassbender y Bornemisza, 1987; Dobbelaere *et al.*, 2001).

En este estudio, se observó que las plantas de jitomate inoculadas con las diferentes cepas de *Azospirillum* favorecen la asignación de biomasa a tallos a los 71 dds (etapa de trasplante), debido probablemente a la producción de auxinas de las cepas de *Azospirillum*. Se ha reportado que la producción de fitohormonas, principalmente auxinas, es uno de los mecanismos más característicos del género *Azospirillum* (Okon y Vanderleyden, 1987). Las auxinas son las fitohormonas responsables de la elongación de tallos y coleóptilos (Marschner, 1995; Taiz y Zeiger, 2002). Comparativamente, las plantas no inoculadas incrementaron significativamente la asignación de recursos a la raíz, lo cual puede deberse a una estrategia de la planta que, en ausencia del simbionte, el cual le genera un gasto de carbono, asigna más energía a la raíz para la búsqueda de recursos (Larcher, 2003).

Así mismo, las cepas AMs3 de *Azospirillum* sp. y AZm5 de *A. lipoferum* favorecieron la producción de biomasa por unidad de área foliar en las plantas de jitomate, ya que presentaron un incremento significativo en la tasa de asimilación neta (NAR). Este aspecto es ecológicamente muy importante, ya que una mayor biomasa alcanzada en un tiempo corto, le confiere a las plantas ventajas, como la captación de más recursos (luz, agua y nutrimentos) y una mayor capacidad competitiva (Grime, 1979; Huante, 1996; Chapin *et al.*, 2002). De acuerdo con las experiencias de los mismos agricultores de Xochimilco, las plántulas de jitomate en etapa de trasplante son económicamente bien cotizadas, ya que la venta de individuos sanos y en buen estado asegura al productor un mayor porcentaje de sobrevivencia de plantas hasta la cosecha, evitando así el tiempo y el esfuerzo invertido en el manejo de la semilla, la siembra, la preparación de almácigos, la instalación de lugares que aseguren el control de temperatura y humedad para la germinación, y el control de plagas, tanto de insectos como de bacterias u hongos fitopatógenos.

Uno de los síntomas más evidentes que presentan las plantas cuando crecen en condiciones limitantes de nitrógeno, es la clorosis de las hojas (Marshner, 1995, Taiz y Zeiger, 2002; Urrestarazu, 2004). No obstante, tanto las plantas de jitomate fertilizadas con 170 Kg N ha<sup>-1</sup> (50% de la dosis completa recomendada), como con 255 Kg N ha<sup>-1</sup> (75% de la dosis completa recomendada) no mostraron estos síntomas. Además, de acuerdo a los resultados del análisis de crecimiento, no hubo un efecto significativo de la fertilización nitrogenada en el crecimiento vegetal de las plantas a los 122 dds. Lo anterior, sugiere que ambas dosis de N presentan el mismo efecto en el crecimiento vegetal y no representaron una deficiencia de este elemento para la planta, por lo que se proponen estudios dirigidos a conocer la dosis mínima de nitrógeno que se puede aplicar al cultivo de jitomate var. Juanita para un óptimo crecimiento, y en este caso específico, bajo las condiciones de la mini empresa productora y comercializadora de jitomate, JITOSAN SPR de RL, ya que el objetivo comercial de esta organización es la mayor producción con el mínimo de insumos y que esta producción tenga calidad de exportación. A

este respecto, observamos que las plantas que presentaron la mayor producción de frutos con los pesos reportados para la variedad empleada en este estudio (Juanita, frutos entre 150 y 250 g) fueron las fertilizadas con  $170 \text{ Kg N ha}^{-1}$ . Contrariamente, la mayor producción de frutos con pesos menores a 150 g se dio en las plantas fertilizadas con  $255 \text{ Kg N ha}^{-1}$ .

Es importante aclarar que en el primer corte de la cosecha (26 agosto) del primer racimo, la mayor producción de frutos se registró en las plantas inoculadas con la cepa AZm5 y fertilizadas con  $255 \text{ Kg N ha}^{-1}$ , y las plantas inoculadas con la cepa VS9 y fertilizadas con  $170 \text{ Kg N ha}^{-1}$  (datos no publicados). En tanto que, en las plantas no inoculadas, fertilizadas con  $170 \text{ Kg N ha}^{-1}$  y  $255 \text{ Kg N ha}^{-1}$ , la mayor producción se obtuvo hasta el quinto corte (3 octubre). Lo anterior nos permite sugerir una dosis de  $170 \text{ Kg N ha}^{-1}$  y la inoculación con las cepas de *Azospirillum* sp., para favorecer el crecimiento del cultivo y la producción de frutos de jitomate variedad Juanita, lo cual beneficiaría al agricultor porque comercializaría su producto más tempranamente en el mercado.

La fertilización nitrogenada influyó en el crecimiento vegetal de las plantas de jitomate a los 122 dds, y afectó la producción de frutos de mayor peso. A pesar de que la inoculación bacteriana no tuvo un efecto significativo en la producción de frutos, sí presentó diferencias significativas en la calidad de los mismos, ya que la cantidad de  $\text{K}^+$  presente en los frutos de las plantas inoculadas con la cepa AZm5 y fertilizadas con  $255 \text{ Kg de N ha}^{-1}$ , fue significativamente mayor respecto a la cantidad de  $\text{K}^+$  presente en los frutos de las plantas inoculadas con las cepas AMS3 y VS9, y las no inoculadas.

El  $\text{K}^+$  representa el 85% de los cationes en el fruto y su acumulación es proporcional a la materia seca (Chamarro, 1995). Además, el contenido de  $\text{K}^+$  en el fruto es una característica muy importante ya que incrementa la acidez, firmeza, uniforma la maduración y logra un mejor sabor en el fruto (Ho y Adams, 1995). No obstante, que no se ha documentado que *Azospirillum* favorezca la absorción de  $\text{K}^+$  en tejido vegetal o en fruto, vía la absorción de nitrógeno, sí ha sido documentado que las citocininas promueven la absorción de  $\text{K}^+$  (Taiz y Zeiger, 2002). A este respecto se ha reportado que *Azospirillum* incrementa la longitud de la raíz y la formación de raíces laterales y pelos radiculares, favoreciendo a la planta con una mayor capacidad para absorber nutrimentos y agua (Bashan y Levanony, 1990). En particular se ha reportado que la cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum* produce *in vitro* cantidades significativas de *t*-zeatina (Esquivel-Cote *et al.*, 2010), una de las citocininas más importantes de las plantas.



## CONCLUSIONES

La inoculación de plántulas de jitomate var. Juanita con *Azospirillum* durante el almácigo, favorecen el crecimiento vegetal de las plántulas a los 71 días después de la siembra, en la etapa vegetativa del cultivo, donde las cepas AMs3 (*Azospirillum* sp.), AZm5 (*A. lipoferum*) y VS9 (*A. brasilense*) favorecen la longitud de tallo, la cepa AMs3 y la AZm5 favorecen la tasa de asimilación neta (NAR) y la tasa relativa de crecimiento (RGR).

La fertilización de plantas de jitomate var. Juanita con las dosis de 170 Kg N ha<sup>-1</sup> y 255 Kg N ha<sup>-1</sup> tienen el mismo efecto en el crecimiento vegetal a los 122 días después de la siembra, en la etapa del primer corte de frutos.

La fertilización de plantas de jitomate var. Juanita con la dosis de 170 Kg N ha<sup>-1</sup> incrementa la producción de frutos de 150-250 g, a los 122 días después de la siembra, en la etapa del primer corte. En tanto que la fertilización con la dosis de 255 Kg N ha<sup>-1</sup> incrementa la producción de frutos con un peso menor a 150 g.

La inoculación de plantas de jitomate var. Juanita con la cepa la AMs3 de *Azospirillum* sp., y fertilizadas con 170 Kg N ha<sup>-1</sup> incrementa la producción de frutos, a los 122 días después de la siembra, en la etapa del primer corte.

La inoculación de plantas de jitomate var. Juanita con la cepa la AZm5 de *Azospirillum lipoferum*, y fertilizadas con 255 Kg N ha<sup>-1</sup> incrementa el contenido de K<sup>+</sup> de los frutos, a los 122 días después de la siembra, en la etapa del primer corte.

## LITERATURA CITADA

Abril A., Biasutti C., Maich R., Dubbini L. y Noe L. 2006. Inoculación con *Azospirillum* spp. en la región semiárida-central de Argentina: Factores que afectan la colonización rizosférica. Tesis de grado. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 10 ed. Official Methods Analysis. <http://www.aoac.org>

Atlas, R. y Bartha R. 2001. Ecología Microbiana. Pearson Addison-Wesley, EU. 696 pp.

Bashan Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnol Adv 16: 729-770.

Bashan Y., Holguin G. y de-Bashan L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can J Microbiol 50: 521-577.

Bashan Y. y Levanony H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* is a challenge for agriculture. Can J Microbiol 36: 591-608.

Bhattarai T. y Hess D. 1998. Growth and yield responses of a Nepalese spring wheat cultivar to the inoculation with Nepalese *Azospirillum* spp at various levels of nitrogen fertilization. Biol Fertil Soils 26: 72-77.

Burdman S., Okon Y. y Jurkevitch E. 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. Crit Rev Microbiol 26: 91-110.

Castilla P.N. 1995. Manejo del cultivo intensivo con suelo. pp 189-225. En: Nuez F. El cultivo del tomate. Mundi Prensa. España. 793 pp.

Chamarro L.J. 1995. Anatomía y Fisiología de la Planta. pp 43-91. En: Nuez F. (Ed.) El cultivo del Tomate. Ediciones Mundi-Prensa, España. 793 pp.

Chapin III F.S., Matson P. y Mooney H.A. 2002 Principles of terrestrial ecosystem ecology. Springer-Verlag, New York. 436 pp.

Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera-González C., Caballero-Mellado J., Aguirre J.F., Kapulnik Y., Brener S., Burdman S., Kadouri D., Sarig S. y Okon Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Aust J. Plant Physiol 28: 871-879.

Döbereiner J., Marriel I.E. y Nery M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can J Microbiol 22: 1464-1473.

Esquinas-Alcázar J. y Nuez V.F. 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate pp 15-42.. En: Nuez F. (Coord.). El cultivo del tomate. Mundi Prensa, España. 793 pp.

Esquivel-Cote R., Ramírez-Gama R.M., Tsuzuki-Reyes G., Orozco-Segovia A. y Huante P. 2010. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. Plant Soil 337: 65-75.

Esquivel-Cote 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. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Esquivel-Cote R. 1997. Efecto de la fertilización biológica con *Azospirillum* y la fertilización química simultánea sobre el desarrollo de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) bajo condiciones de invernadero. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México.

Fassbender H.W. y Bornemisza E. 1987. Química de suelos, con énfasis en suelos de América Latina. Ed. Ilica, San José, Costa Rica. 420 pp.

Ferrera-Cerrato R. y Alarcón A. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. Ciencia Ergo Sum Redalyc 8: 175-183.

Flores-Ayala A.A. 1985. Asilamiento y caracterización de *Azospirillum* sp. de la rizosfera de sorgo en valle de Santiago, Gto. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Gadagi R.S., Krishnaraj P.U., Kulkarni J.H. y Sa T. 2004. The effect of combined *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of the blanket flower *Gaillardia pulchella*. *Sci Hort* 100: 323-332.
- García-Olivares J.G., Moreno-Medina V.R., Rodríguez-Luna I.C., Mendoza-Herrera A. y Mayek-Pérez N. 2006. Biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo, en el Norte de México. *Agricultura Técnica en México* 32: 135-141.
- Grime J.P. 1979. *Plant strategies and vegetation processes*. Wiley, Chichester, Reino Unido. 410 pp.
- Hartmann A. y Bashan Y. 2009. Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB) - special issue. *Eur J Soil Biol* 45: 1-2.
- Ho L.C. y Adams P. 1995. Nutrient uptake and distribution in relation to crop quality. *Act Hort* 396: 33-44.
- Huante P.P. 1996. Plasticidad, disponibilidad de recursos y crecimiento en plántulas de la selva baja caducifolia de Chamela, Jalisco: un enfoque experimental. Tesis de doctorado (Doctorado en Ecología). Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hunt R. 1990. *Basic growth analysis*. Unwin Hyman Ltd, London, Reino Unido. 112 pp.
- Jackson M.L. 1976. 3a. ed. *Análisis químico de suelos*. OMEGA, Barcelona. 662 pp.
- Kapulnik Y., Kigel J., Okon Y., Nur I. y Henis Y. 1981. Effect of *Azospirillum* inoculums on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. *Plant Soil* 61: 65-67.
- Larcher W. 2003. 4a. ed. *Physiological plant ecology*. Springer-Verlag, Berlín. 513 pp.
- Lugtenberg B. y Kamilova F. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63: 541-546.
- Marschner H. 1995. 2a. ed. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press. San Diego, California. 889 pp.
- Okon Y. y Vanderleyden J. 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *Am Soc Microbiol News* 63: 366-370.
- Pepper L.I., Gerba C.P. y Brusseau M.L. 2006. 2a. ed. *Environmental and pollution science*. Academic Press. Elsevier, EU. pp 243-258.
- Pretty J. 2008. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. *Phil Trans R Soc B* 363: 447-465.
- SIAP-SAGARPA. 2009. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>. Revisado el 27 Octubre de 2009.
- Steenhoudt O. y Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev* 24: 487-506.
- Taiz L. y Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*. 4a. ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Mass, EU. 565 pp.
- Tarrand J., Krieg R. y Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can J Microbiol* 24: 967-980.

Terry E., Leyva A. y Hernández A. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Rev Colomb Biotecnol. 7: 47-54.

Urzúa H.M.C. 1997. Evaluación del efecto de *Azospirillum* sobre el rendimiento de *Lycopersicon esculentum* (bajo condiciones controladas). Tesis de Licenciatura. FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

Urzúa H.M.C. 2001. Selección de la concentración óptima de *Azospirillum* y su combinación con diferentes dosis de fertilización en dos sistemas de cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum* M.). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Urrestarazu G.M. 2004. 3a. ed. Tratado de cultivos sin suelo. Mundi-Prensa, Barcelona, España, 915 pp.

Ward M.H. 2009. Too much of a good thing? Nitrate from nitrogen fertilizers and cancer. Rev Environ Health 24: 357-363.

---

## CAPÍTULO V

### **Efecto de la interacción *Azospirillum* – hongos micorrízicos arbusculares en la etapa vegetativa del crecimiento de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) fertilizadas con dosis reducidas de nitrógeno y fósforo**

#### **RESUMEN**

En el presente trabajo se evaluó el efecto en el crecimiento vegetativo de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) co-inoculadas con *Azospirillum* y hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y la reducción en la fertilización química nitrogenada y fosfatada. Para ello se llevaron a cabo dos experimentos en suelo donde se utilizaron dos variedades de jitomate: en el primero se empleó la variedad Juanita, la cepa bacteriana AZm5 de *A. lipoferum* y un inóculo micorrízico silvestre en un suelo sin fertilizar; en el segundo se empleó la variedad ACE VF55 y se evaluaron dos cepas de *Azospirillum* (AZm5 y VS9 de *A. brasilense*) y el inóculo micorrízico Zac 19 en un suelo fertilizado con el 50% de nitrógeno y 0% de fósforo de la dosis recomendada. La co-inoculación con la cepa AZm5 de *A. lipoferum* y el inóculo micorrízico silvestre favorecieron la tasa relativa de crecimiento (TRC) de plantas de jitomate (var. Juanita) a los 32 días de desarrollo, en un cultivo en suelo sin fertilizar. Las plantas de jitomate (var. ACE VF55) co-inoculadas con la cepa AZm5 de *A. lipoferum* y la cepa micorrízica Zac 19, incrementaron la longitud de tallo y contenido de N y P en tejido vegetal a los 52 días de desarrollo, en un cultivo en suelo fertilizado con el 50% de nitrógeno y 0% de fósforo de la dosis recomendada.

**Palabras clave:** *Azospirillum*, jitomate, micorriza

## INTRODUCCIÓN

El uso desmedido y constante de fertilizantes químicos para mejorar e incrementar el rendimiento de los cultivos agrícolas, han causado severos problemas ambientales, como la contaminación del suelo y agua debido a los nitratos, que se generan a partir de los fertilizantes nitrogenados, y que se lixivian a través del suelo. A este respecto, actualmente se han incorporado alternativas viables que permitan continuar con la productividad agrícola y disminuir el efecto nocivo en el ambiente que provoca el uso de los fertilizantes químicos. Una de estas alternativas ha sido el uso de inoculantes de microorganismos benéficos para la planta (Adesemoye y Kloepper, 2009; Adesemoye *et al.*, 2009), entre los que se destacan los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Azcón, 2000).

Los HMA y algunas rizobacterias, pueden interactuar sinérgicamente para estimular el crecimiento de una gran variedad de especies vegetales. Esta interacción juega un papel fundamental en el desarrollo sostenible de los sistemas agrícolas, ya que favorece la disminución del uso de agroquímicos empleados para mantener la fertilidad del suelo (Artursson *et al.*, 2006; Pivato *et al.*, 2009; Gianinazzi *et al.*, 2010). Se ha reportado que el uso combinado de HMA y de *Azospirillum* incrementa significativamente el crecimiento vegetal y el contenido de carbono, fósforo y nitrógeno total en varios cultivos de interés agrícola, principalmente cereales, lo que ha motivado la sustitución parcial e incluso total de fertilizantes químicos por la inoculación microbiana (Linderman, 1992; Veeraswamy *et al.*, 1992; Adesemoye *et al.*, 2008). Por lo tanto, ha surgido la necesidad de evaluar el efecto del uso combinado de estos microorganismos como inoculantes con la aplicación de dosis reducidas de fertilizantes químicos en otros cultivos de importancia económica, como el jitomate (*Solanum lycopersicum*). Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la co-inoculación con *Azospirillum* y HMA en la etapa vegetativa del crecimiento de plantas de jitomate, desarrolladas en un cultivo en suelo fertilizado con dosis reducidas de fertilizante químico nitrogenado y fosfatado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Ecofisiología Vegetal del Instituto de Ecología, UNAM y del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM.

---

**Experimento 1. Efecto de la co-inoculación con *Azospirillum lipoferum* (AZm5) y un inóculo micorrízico silvestre en plantas de jitomate en la etapa vegetativa del crecimiento.****Inóculo micorrízico**

El inóculo micorrízico se preparó con esporas y raíces colonizadas de hongos micorrízicos arbusculares silvestres presentes en un suelo rizosférico de plantas de pasto de jardín (Xochimilco, México D. F.); para ello se llevó a cabo la cuantificación de esporas presentes en este suelo rizosférico y la determinación del porcentaje de colonización micorrízica que presentaban las raíces de pasto. El inóculo micorrízico consistió de 1 g de raíces de pasto colonizadas más 10 g de suelo. Esta cantidad se mezcló con el sustrato de las unidades experimentales al momento del trasplante.

**Cuantificación de esporas de hongos micorrízicos.**

Para llevar a cabo la cuantificación de esporas, primero se realizó su extracción mediante la técnica de gradientes de concentración de sacarosa (Sieverding, 1991). En un recipiente, se pesaron 100 g de suelo (divididos en submuestras de 25 g cada una). A cada recipiente se le agregó agua, y se agitó mecánica y vigorosamente por 5 min para romper los agregados. Las muestras se filtraron a través de una serie de tamices (1410  $\mu\text{m}$ , 590  $\mu\text{m}$ , 149  $\mu\text{m}$  y 38  $\mu\text{m}$ ) y se lavaron con abundante agua. Las fracciones retenidas en los dos últimos tamices (149  $\mu\text{m}$  y 38  $\mu\text{m}$ ) se colocaron en tubos Nalgene (NALGENE® Labware, MIA, EU) de polipropileno para centrifuga (50 ml), uno por cada fracción, el volumen se aforó a 25 ml con agua de la llave. A continuación, a cada tubo, se le agregaron 15 ml de sacarosa al 60% y 10 ml de sacarosa al 20%, posteriormente se mezcló bien con el suelo cuidando de no romper el gradiente formado entre las dos concentraciones de sacarosa. Los tubos se colocaron en una centrífuga (IEC HN SII, GMI, Inc., EU) y se centrifugaron por 10 min a 2000 rpm. El sobrenadante se filtró y se lavó a través de un sistema de filtración a vacío con membrana *Millipore* de 45  $\mu\text{m}$ , donde se retuvieron las esporas, las cuales se observaron y se cuantificaron en un microscopio estereoscópico (Olympus América de México S.A. de C.V.) con un aumento de 40x. Se contaron el total de esporas presentes en cuatro muestras de suelo de 25 g cada una.

Para la observación de las esporas (Figura 5.1), éstas se extrajeron con una aguja de disección y se colocaron sobre un portaobjetos, donde se montaron con alcohol polivinílico-glicerol (Schenck y Pérez, 1990).





**Figura 5.1** Espora de hongo micorrízico arbuscular del inóculo silvestre empleado en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*, var Juanita), visto en un microscopio estereoscópico, con un aumento de 40x.

#### Porcentaje de colonización micorrízica de raíces de pasto

El porcentaje de colonización micorrízica de las raíces se realizó mediante la tinción de Phillips-Hayman (1970), la cual consistió de los siguientes pasos: a) clareo con KOH al 10 %, b) blanqueo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, c) acidificación con HCl al 10%, d) tinción con azul de tripano al 0.5 % en lactoglicerol, en cada uno de los anteriores pasos se llevó a cabo un calentamiento por 10 min, y e) decoloración con lactoglicerol, el cual se dejó actuar por 10 min. Posterior a la decoloración, las raíces se montaron en un portaobjetos, 10 segmentos de 1 cm cada uno, y con la ayuda de un microscopio óptico (Olympus América de México S.A. de C.V.) y un aumento de 40x, se cuantificó la presencia o ausencia de hifas, vesículas y arbuscúlos por cada segmento. Se consideró una raíz colonizada por hongos micorrízicos cuando presentaba dos o más de estas estructuras. El porcentaje de colonización se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de colonización} = \frac{(\text{Número de segmentos colonizados}) \times 100}{\text{Número de segmentos totales}}$$

#### Inóculo bacteriano

Se evaluó la cepa AZm5 de *A. lipoferum*, de la colección del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química (UNAM), aislada de cultivos de maíz (*Zea mays*) del Valle del Mezquital (Hidalgo, México), la cual ha sido reportada como promotora del crecimiento de jitomate (Esquivel-Cote, 2002).

A partir del cultivo activo en medio de cultivo NFB semisólido (NFB-ss) (Tarrand *et al.*, 1978; Döbereiner *et al.*, 1976) se transfirió una asada a un matraz Erlenmeyer (250 ml) con 100 ml de medio de cultivo NFB líquido (NFB-l), se incubó en agitación a 150 rpm a  $34\pm 2^\circ\text{C}$  por 48 h; posteriormente con 1 ml de esta suspensión se inoculó otro matraz con 100 ml del mismo medio de cultivo y se incubó en agitación a 150 rpm y a  $34\pm 2^\circ\text{C}$  por 24 h. Finalmente la población bacteriana se ajustó a una densidad óptica (560 nm) de 0.010, en un espectrofotómetro (Pharmacia Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, RU), para obtener una población de  $1\times 10^8$  células  $\text{ml}^{-1}$  de inóculo.

#### Siembra, inoculación y trasplante de plantas

Se empleó semilla certificada de jitomate bola (*Solanum lycopersicum*), variedad Juanita (832, Hazera Seeds, Inc., FL, EU). Las semillas se sembraron en charolas de germinación con arena sílica como sustrato, la cual fue lavada, secada y esterilizada ( $121^\circ\text{C}$ ,  $1.1 \text{ kg m}^{-2}$ , por 1 h) en autoclave. Las charolas se colocaron en cámaras de crecimiento (Convicon E15, Winnipeg, Canadá con lámparas fluorescentes Sylvania F72T12/CW/VHO/LT), a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , por 12 días, con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, y un flujo fotónico de  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Cinco días después de la siembra (dds), las plántulas fueron inoculadas con 200  $\mu\text{l}$  del inóculo bacteriano (AZm5), en la base de cada plántula; las plántulas control se humedecieron con el medio de cultivo estéril.

A los 12 dds, se eligieron plántulas de tamaño uniforme y se trasplantaron en bolsas negras (unidades experimentales) que contenían 5 litros de sustrato, el cual fue preparado con una mezcla de suelo estéril (autoclave a  $121^\circ\text{C}$ ,  $1.1 \text{ kg m}^{-2}$ , por 2 h) y agrolita, en una relación 1:2 v/v. El inóculo micorrízico (ver arriba) se mezcló en los primeros 5 cm del sustrato dentro de cada una de las respectivas unidades experimentales, previo al trasplante para posteriormente colocar una plántula por cada bolsa. Las bolsas con las plántulas se colocaron en las cámaras de crecimiento durante 20 días más, bajo las mismas condiciones. El cultivo fue regado con solo agua, tres veces a la semana.

Las características del suelo antes de mezclar fueron: pH 6.5, materia orgánica 6.3%, nitrógeno total 0.03%, fósforo total  $1.61 \text{ mg kg}^{-1}$  y calcio  $1447 \text{ mg kg}^{-1}$ .

#### Diseño experimental

El diseño del experimento fue factorial  $2\times 2\times 7$ , considerando 2 tratamientos inoculados con *Azospirillum* (AZm5): con inóculo y sin inóculo; con 2 niveles de inoculación con HMA para cada tratamiento bacteriano: con inóculo y sin inóculo, el tratamiento control no fue inoculado; con 7 repeticiones por tratamiento y por nivel.; para un total de 28 unidades experimentales.

### Análisis de crecimiento

Se realizaron dos cosechas, la primera cinco días después del trasplante ( $t_1 = 17$  dds) y la segunda veinte días después ( $t_2 = 32$  dds). En cada cosecha, el vástago de la planta fue separado en hojas, tallo y raíz, y fueron puestos a secar a  $70 \pm 2^\circ\text{C}$  en una estufa (Boekel Industries Inc. Mod. 107801). Se determinó la longitud del tallo, el peso fresco y seco de tallo y hojas, y la tasa relativa de crecimiento (TRC):  $\ln W_2 - \ln W_1 / t_2 - t_1$ ;  $W_2 =$  biomasa (peso seco) en el tiempo  $t_2$  y  $W_1 =$  biomasa en el tiempo  $t_1$ , de acuerdo con Hunt (1990).

Determinación del porcentaje de colonización micorrízica y cuantificación endofítica de *Azospirillum*, en raíces de jitomate

El porcentaje de colonización micorrízica en las raíces, se determinó mediante la tinción de Phillips y Hayman (1970), de acuerdo a lo descrito previamente. La cuantificación endofítica de *Azospirillum*, se llevó a cabo empleando el medio de cultivo NFB-ss, mediante la técnica del Número Mas Probable (NMP) (Oblinger y Koburger, 1975), con tres repeticiones. Ambas determinaciones se realizaron al final del experimento.

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de 2 vías y 2 niveles por vía, con 7 repeticiones (ANOVA/MANOVA), usando el software StatGraphics Centurion XV (2006, Statpoint Technologies Inc., VA, EU). Las medias fueron comparadas usando el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD, least significant difference) de Fisher ( $p \leq 0.05$ ).

**Experimento 2. Efecto de la co-inoculación con cepas de *Azospirillum* y el inóculo micorrízico Zac 19 en plantas de jitomate fertilizadas con una dosis media de nitrógeno y sin fertilizante fosfatado, en la etapa vegetativa del crecimiento.**

### Inóculos microbianos

Se evaluaron las cepas bacterianas AZm5 de *A. lipoferum* y la cepa VS9 de *A. brasilense*, de la colección del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química (UNAM), reportadas como promotoras del crecimiento de jitomate (Urzúa 2001; Esquivel-Cote, 2002).

El inóculo micorrízico utilizado fue el consorcio Zac 19: mezcla de *Glomus claroideum*, *G. diaphanum* y *G. albidum* (Chamizo *et al.*, 1998), proporcionada por el Dr. Ronald Ferrera-Cerrato del Área de Microbiología, del Postgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México.

#### Siembra, inoculación y trasplante de plantas

Se empleó semilla certificada de jitomate bola (*Solanum lycopersicum*), variedad ACE VF55 (Westar Seeds International Inc., CA, EU). Las semillas se desinfectaron con 10 ml de alcohol etílico (95%) por 10 min en agitación con Vortex, y posteriormente con 5 ml de hipoclorito de sodio al 3% por 5 min. Se lavaron 7 veces con 10 ml de agua destilada estéril en cada ocasión; y finalmente con 10 ml de  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.3 M). Una vez desinfectadas, las semillas se sumergieron en 10 ml de cada uno de los inóculos bacterianos (AZm5 y VS9, ver abajo) o en medio de cultivo estéril (control), por una hora a temperatura ambiente. En condiciones de asepsia se tomaron 15 semillas de cada tratamiento y se colocaron en cajas Petri estériles con papel filtro húmedo; estas se germinaron en una incubadora a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 5-7 días.

Siete días después de la siembra (dds), se eligieron plántulas de tamaño uniforme y se trasplantaron en vasos de unisel (unidad experimental) que contenían 500 g de sustrato, el cual fue preparado con una mezcla de suelo estéril (autoclave a  $121^\circ\text{C}$ ,  $1.1 \text{ kg m}^{-2}$ , por 2 h) y agrolita (1:2 v/v), donde se empleó el mismo suelo del Experimento 1. Se trasplantó una plántula por unidad experimental. Previamente al trasplante, el sustrato se humedeció con solución nutritiva estéril y de acuerdo al tratamiento, se mezcló con 10 g del inóculo micorrízico Zac 19 (esporas y raicillas mezcladas en tezontle). Las unidades experimentales se incubaron por 45 días, en un invernadero en la Cd. de México, a una temperatura de  $10/35^\circ\text{C}$  min/max, 60% de humedad, iluminado con luz natural, durante los meses de septiembre y octubre de 2008.

#### Fertilización y riego

El fertilizante se administró como solución nutritiva, donde se administraron  $170 \text{ kg N ha}^{-1}$  y  $0 \text{ kg P ha}^{-1}$ , 50% de N, y 0% de P de la dosis al 100%, de acuerdo a la formulación recomendada por Hazera Seeds, Inc. (FL, EU) (Cuadro 5.1) para el cultivo de jitomate bola. La solución se aplicó mediante el riego, el cual se realizó tres veces por semana, y un riego con solo agua, una vez cada dos semanas para evitar la concentración de sales.

**Cuadro 5.1** Solución nutritiva recomendada por Hazera Seeds, Inc. (FL, EU), para el cultivo hidropónico de jitomate (*Solanum lycopersicum*), donde 170 kg N ha<sup>-1</sup> (dosis de N al 50%) y 340 kg N ha<sup>-1</sup> (dosis de N al 100%).

Nutriente <sup>a</sup>	kg N ha <sup>-1</sup>	
	170	340
KNO <sub>3</sub>	25	50
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	475	950
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20	40
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25	50
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	100
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500	500
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	800	800
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15	15
MnSO <sub>4</sub>	3	3
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> •10H <sub>2</sub> O	5	5
CuSO <sub>4</sub>	0.5	0.5
ZnSO <sub>4</sub>	0.5	0.5

<sup>a</sup>Los nutrientes están expresados en mg l<sup>-1</sup> de agua. El pH final fue de 6.0±0.2.

### Diseño experimental

El diseño experimental fue factorial 3x2x7, considerando 3 tratamientos inoculados con *Azospirillum*: un inóculo de *Azospirillum lipoferum* (AZm5), un inóculo de *Azospirillum brasilense* (VS9) y uno sin inocular; con 2 niveles de inoculación con el HMA Zac 19 para cada tratamiento bacteriano: con inóculo y sin inóculo, el tratamiento control no fue inoculado; con 7 repeticiones por tratamiento y por nivel, para un total de 35 unidades experimentales.

### Análisis de crecimiento

A los 22, 37 y 52 dds se midió la longitud del tallo de cada planta. Se realizó una cosecha a los 52 dds, en la cual el vástago de la planta fue separado de la raíz. Se determinó el peso seco del vástago, el peso fresco de la raíz, y el contenido de nitrógeno y fósforo en el vástago, los cuales se cuantificaron por el método de Kjeldahl y el del Vanadato-Molibdato Amarillo (Alcántar-González y Sandoval-Villa, 1999), respectivamente. El porcentaje de colonización micorrízica y la cuantificación endofítica de *Azospirillum* se determinó de acuerdo con lo descrito previamente, en el Experimento 1.

---

## Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de 2 vías (*Azospirillum* y HMA), 3 niveles para *Azospirillum* y 2 niveles para HMA, con 7 repeticiones (ANOVA/MANOVA), usando el software StatGraphics Centurion XV (2006, Statpoint Technologies Inc., VA, EU). Las medias fueron comparadas usando el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD, least significant difference) de Fisher's ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS

### Experimento 1. Efecto de la co-inoculación con *Azospirillum lipoferum* (AZm5) y un inóculo micorrízico silvestre en plantas de jitomate en la etapa vegetativa del crecimiento.

#### Control de calidad del inóculo micorrízico

El suelo empleado como fuente de inóculo micorrízico presentó un promedio de  $1908 \pm 167$  esporas por 50 g de suelo. El porcentaje de colonización de las raíces de pasto, que se emplearon también como inóculo micorrízico, fue de 74.66 %.

#### Análisis de crecimiento

A los 17 dds, observamos que las plantas co-inoculadas con la cepa AZm5 de *A. lipoferum* y un inóculo silvestre de HMA incrementaron significativamente la longitud ( $F=64.9$ ,  $p=0.00001$ ) y el peso fresco del tallo ( $F=23.55$ ,  $p=0.00001$ ), así como el peso fresco total del vástago ( $F=24.72$ ,  $p=0.00001$ ) respecto a las plantas no co-inoculadas (Cuadro 5.2a). En tanto que, las plantas inoculadas con la micorriza incrementaron significativamente el peso seco del tallo ( $F=16.35$ ,  $p=0.00001$ ) (Cuadro 5.2b).

A los 32 dds, la co-inoculación favoreció significativamente la longitud del tallo ( $F=10.06$ ,  $p=0.0006$ ), el peso fresco ( $F=33.56$ ,  $p=0.00001$ ) y seco ( $F=19.88$ ,  $p=0.00001$ ) de hoja y peso fresco ( $F=19.60$ ,  $p=0.00001$ ) y seco ( $F=17.92$ ,  $p=0.00001$ ) total del vástago, respecto a las plántulas inoculadas con sólo el inóculo bacteriano o micorrízico y las no inoculadas.

**Cuadro 5.2a** Análisis de crecimiento en plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) var. Juanita, a los 17 y 32 días después de la siembra (dds), inoculadas con la cepa AZm5 de *A. lipoferum* y un inóculo micorrízico silvestre (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo no fertilizado). Las letras indican la diferencia estadísticamente significativa entre las muestras inoculadas y el control (sin ambos inóculos), y los asteriscos entre los 17 d y 32 d de cada variable, de acuerdo al método de Fisher (LSD, least significant difference) con un límite de confianza de 0.05. Los datos en paréntesis ( $\pm$ ) representan el error estándar de la media de siete réplicas.

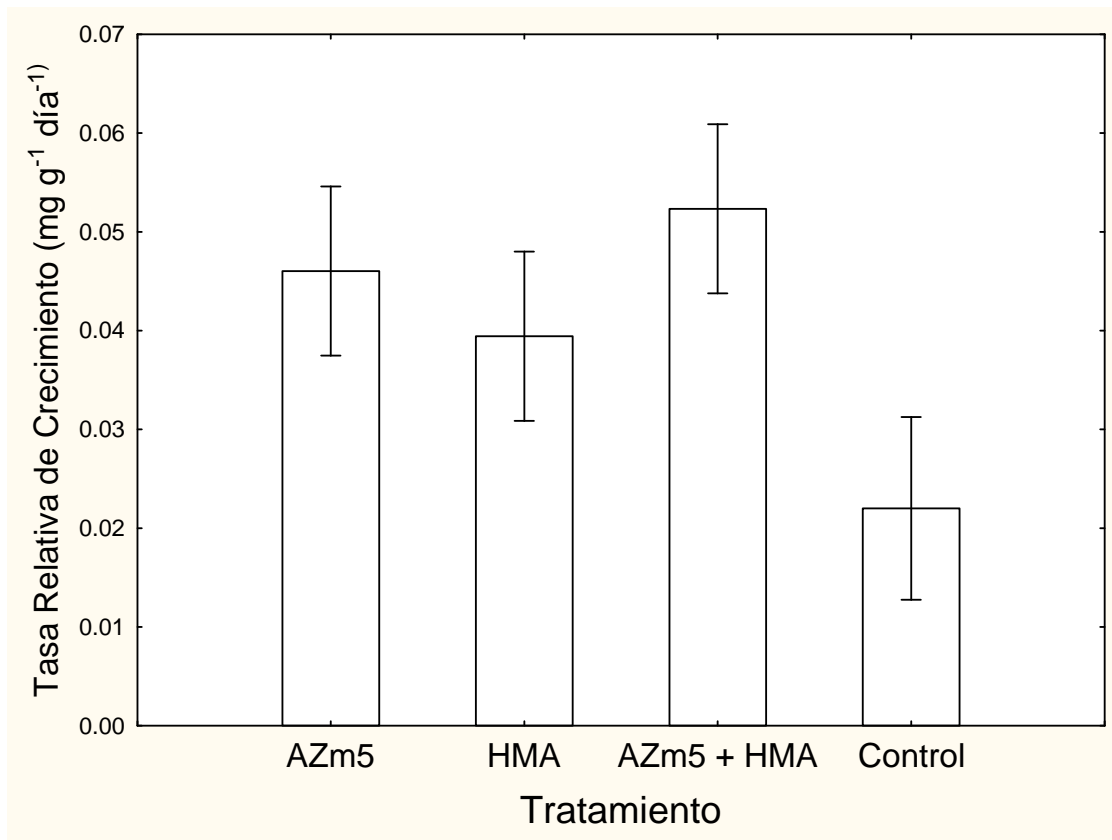
Tratamiento Bacteria	Tratamiento Micorriza	Longitud de tallo (cm)		Peso fresco de tallo (g)		Peso fresco de hoja (g)		Peso fresco total (g)	
		17 dds	32dds	17 dds	32dds	17 dds	32dds	17 dds	32dds
<i>A. lipoferum</i> AZm5	HMA	5.44 a *	7.78 a *	0.1092 a *	0.2414 a *	0.0512 a *	0.3593 a *	0.2047 a *	0.6007 a *
	Sin inocular	4.46 b *	5.38 b *	0.0367 c	0.0986 b	0.0306 c *	0.0931 c *	0.0673 b *	0.1918 b *
Sin inocular	HMA	4.6 b	5.2 b	0.0450 c	0.0601 b	0.1092 a *	0.1895 b *	0.1542 b *	0.2497 b *
	Sin inocular	3.4 c *	5.4 b *	0.0653 b	0.1259 ab	0.0955 ab	0.0863 c	0.1326 c	0.0212 b
Valor de F		19.37		5.59		36.96		25.60	



**Cuadro 5.2b** Análisis de crecimiento en plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) var. Juanita, a los 17 y 32 días después de la siembra (dds), inoculadas con la cepa AZm5 de *A. lipoferum* y un inóculo micorrízico silvestre (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo no fertilizado). Las letras indican la diferencia estadísticamente significativa entre las muestras inoculadas y el control (sin ambos inóculos), y los asteriscos entre los 17 d y 32 d de cada variable, de acuerdo al método de Fisher (LSD, least significant difference) con un límite de confianza de 0.05. Los datos en paréntesis ( $\pm$ ) representan el error estándar de la media de siete réplicas.

Tratamiento Bacteria	Tratamiento Micorriza	Peso seco tallo (g)		Peso seco hoja (g)		Peso seco total (g)	
		17 dds	32dds	17 dds	32dds	17 dds	32dds
<i>A. lipoferum</i> AZm5	HMA	0.0172 b *	0.0355 *	0.0185 b *	0.0797 a *	0.0358 b *	0.1153 a *
	Sin inocular	(0.0032)	(0.0024)	((0.0035)	(0.0035)	(0.0053)	(0.0001)
Sin inocular	HMA	0.0029 c *	0.0294 *	0.0277 ab	0.0355 b	0.0306 b *	0.0650 b *
	Sin inocular	(0.0032)	(0.0024)	(0.0035)	(0.0035)	(0.0053)	(0.0001)
Sin inocular	HMA	0.0350 a	0.0350	0.0195 b	0.0251 b	0.0545 a	0.0602 b
	Sin inocular	(0.0032)	(0.0024)	(0.0035)	(0.0035)	(0.0053)	(0.0001)
Sin inocular	HMA	0.0219 b *	0.0321 *	0.0313 a	0.0322 b	0.0533 a	0.0643 b
	Sin inocular	(0.0032)	(0.0024)	(0.0035)	(0.0035)	(0.0053)	(0.0001)
Valor de F		15.94		17.43		19.84	

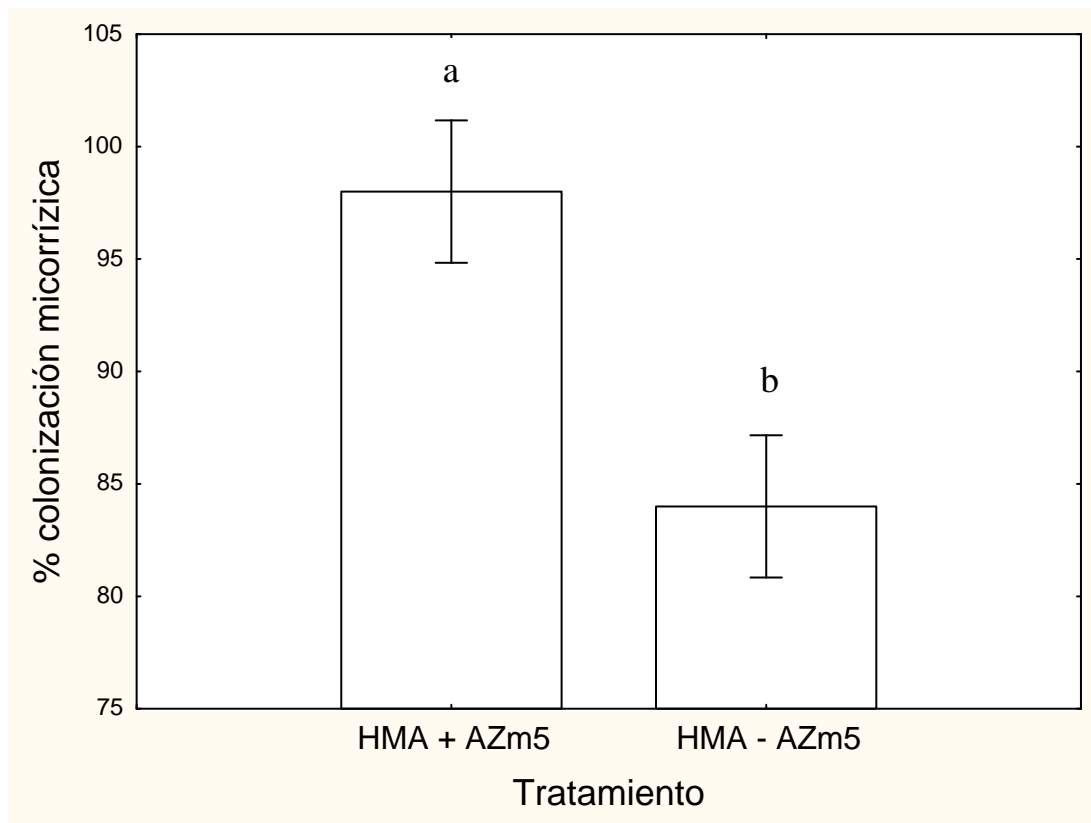
Las plántulas inoculadas con la cepa AZm5 de *A. lipoferum*, con el inóculo silvestre de HMA y con la combinación de ambos no presentaron diferencias significativas en la TRC ( $F=3.23$ ,  $p=0.126$ ) en la etapa vegetativa del cultivo de jitomate (17 a 32 días después de la siembra). No obstante, el tratamiento co-inoculado (AZm5+HMA) incrementó la TRC respecto a el tratamiento no inoculado o control (137.86%), el inoculado con el inóculo silvestre de HMA (32.68%) y el tratamiento inoculado con la cepa AZm5 de *A. lipoferum* (13.68%) (Figura 5.2).



**Figura 5.2** Efecto de la interacción *A. lipoferum* (AZm5) - hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la tasa relativa de crecimiento (TRC) en la etapa vegetativa de plántulas jitomate (17 a 32 días después de la siembra). Las barras indican el error estándar de la media de siete réplicas.

Determinación del porcentaje de colonización micorrízica y cuantificación endofítica de *Azospirillum*, en raíces de jitomate

En las plántulas co-inoculadas con la cepa AZm5 de *A. lipoferum* y un inóculo silvestre de HMA se registró una colonización micorrízica del 98% (Figura 5.3), mientras que las plántulas inoculadas con sólo el inóculo micorrízico (HMA) registró un 84% de colonización micorrízica.

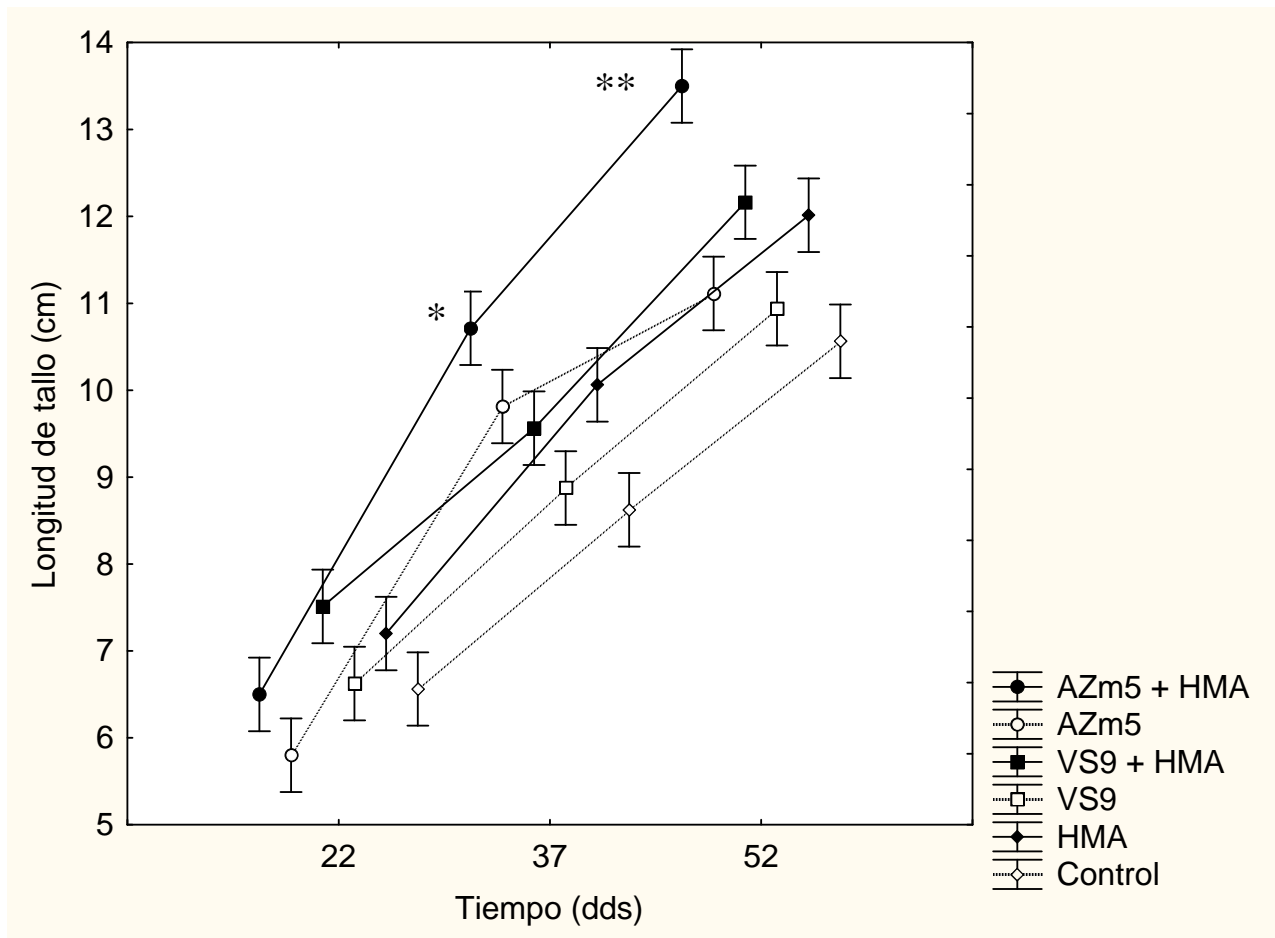


**Figura 5.3** Porcentaje de colonización micorrízica con (HMA+AZm5) y sin inoculación con la cepa AZm5 de *A. lipoferum* (HMA-AZm5). Las barras indican el error estándar de la media de cinco réplicas. Las letras indican la diferencia estadísticamente significativa entre las muestras inoculadas y el control, de acuerdo al método de Fisher (LSD, least significant difference) con un límite de confianza de 0.05.

**Experimento 2. Efecto de la co-inoculación con cepas de *Azospirillum* y el inóculo micorrízico Zac 19 en plantas de jitomate fertilizadas con una dosis media de nitrógeno y sin fertilizante fosfatado, en la etapa vegetativa del crecimiento.**

Análisis de crecimiento

Las plantas co-inoculadas con la cepa AZm5 de *A. lipoferum* y el consorcio micorrízico Zac 19 incrementaron significativamente la longitud del tallo ( $F=2.2$ ,  $p=0.02$ ) a los 37 y 52 dds (Figura 5.4), respecto a las plantas no inoculadas e inoculadas con cada uno de los inóculos microbianos. Comparativamente, se observa que las plantas co-inoculadas (HMA-AZm5) y las no inoculadas (Control-HMA), la diferencia en la altura es significativa desde los 37 dds.



**Figura 5.4** Longitud de tallo a diferentes días después de la siembra (dds) en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*, var. ACE VF55). Las barras indican el error estándar de la media de siete réplicas. EL asterisco sencillo indica el tratamiento que presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a todos los tratamientos a los 37 dds, y el asterisco doble indica el tratamiento que presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a todos los tratamientos a los 52 dds

En la Figura 5.4 y en el Cuadro 5.3, se observa que a los 52 dds las plantas inoculadas con la cepa micorrízica Zac 19 incrementaron significativamente la longitud del tallo, independientemente del inóculo bacteriano.

El contenido de nitrógeno y fósforo en el vástago fue significativamente mayor ( $F=9.47$ ,  $p=0.0082$ ;  $F=75.12$ ,  $p=0.0001$ ; respectivamente) en plantas co-inoculadas, respecto a los tratamientos inoculados con *Azospirillum* (Cuadro 5.3). Es importante mencionar que, el valor del porcentaje de nitrógeno en vástago de plantas no inoculadas se debe a que en el análisis la muestra viró débilmente a un color no característico y diferente del resto de las muestras, por tanto se consideró como 0.00.

**Cuadro 5.3** Efecto en el crecimiento de plántulas de jitomate var. ACE VF55 (52 dds) inoculadas con cepa AZm5 de *A. lipoferum*, la cepa VS9 de *A. brasilense* y el inóculo micorrízico Zac19 (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo, fertilizado con 170 kg N ha<sup>-1</sup> y 0 kg P ha<sup>-1</sup>). Las letras indican la diferencia estadísticamente significativa entre las muestras inoculadas y el control (sin ambos inóculos), de acuerdo al método de Fisher (LSD, least significant difference) con un límite de confianza de 0.05. Los datos en paréntesis (±) representan el error estándar de la media de siete réplicas para la longitud del tallo, peso seco de vástago y peso fresco de la raíz; y de dos réplicas para N y P.

Tratamiento Bacteria	Tratamiento Micorriza Zac 19	Longitud de tallo (cm)	Peso seco de vástago (g)	Peso fresco de la raíz (g)	N en vástago (%)	P en vástago (ppm)
<i>A. lipoferum</i> AZm5	HMA	13.48 a (0.394)	2.623 (0.0395)	0.2266 (0.0346)	2.455 a (0.0975)	22.007 a (0.1792)
	Sin inocular	11.10 bc (0.415)	2.533 (0.0416)	0.185 (0.0346)	1.428 c (0.0975)	16.452 b (1.4336)
<i>A. brasilense</i> VS9	HMA	12.20 b (0.394)	2.555 (0.0394)	0.2500 (0.0346)	2.005 b (0.0975)	11.792 c (0.3583)
	Sin inocular	10.93 c (0.471)	2.550 (0.0472)	0.2283 (0.0346)	1.276 c (0.0975)	13.047 bc (0.1792)
Sin inocular	HMA	12.17 b (0.394)	2.541 (0.0395)	0.190 (0.0346)	1.817 b (0.0975)	20.932 a (0.1792)
	Sin inocular	10.61 c (0.415)	2.525 (0.0416)	0.2067 (0.0346)	0.000 d*	13.584 bc (0.7167)

\*Muestra que no reaccionó de forma característica al análisis químico.

Determinación del porcentaje de colonización micorrízica y cuantificación endofítica de *Azospirillum*, en raíces de jitomate

En el Cuadro 5.4 se registraron los resultados obtenidos en la cuantificación de la colonización bacteriana y micorrízica en raíces de jitomate bola var. ACE VF 55, a los 52 dds. La población bacteriana de la cepa AZm5 de *A. lipoferum* fue de  $5 \times 10^6$  NMP células g raíz<sup>-1</sup>, sin diferencia estadística con la población de la cepa VS9 de *A. brasilense* que fue de  $4 \times 10^6$  NMP células g raíz<sup>-1</sup>. Respecto a la colonización micorrízica, se observó que las raíces de jitomate, inoculadas con el inóculo Zac 19, fueron colonizadas en un 100% con hifas y arbusculos, y más de 90% con vesículas, independientemente de la presencia del inóculo bacteriano (AZm5 o VS9).

**Cuadro 5.4** Colonización microbiana de plántulas de jitomate var. ACE VF55 (52 dds) inoculadas con cepas de *Azospirillum* y la cepa micorrízica Zac19 (experimento llevado a cabo en un cultivo en suelo, fertilizado con 170 kg N ha<sup>-1</sup> y 0 kg P ha<sup>-1</sup>). Las letras indican la diferencia estadísticamente significativa entre las muestras inoculadas y el control (sin ambos inóculos), de acuerdo al método de Fisher (LSD, least significant difference) con un límite de confianza de 0.05. Los datos en paréntesis ( $\pm$ ) representan el error estándar de la media de seis replicas.

Tratamiento Bacteria	Tratamiento Micorriza Zac 19	Colonización bacteriana (10 <sup>6</sup> NMP células g raíz <sup>-1</sup> )	Colonización micorrízica		
			Hifas (%)	Vesículas (%)	Arbúsculos (%)
<i>A. lipoferum</i> AZm5	HMA	5.60 a (0.7815)	100 a (1.3944)	96.66 a (2.5159)	100 a (2.1082)
	Sin inocular	5.16 a (0.8561)	0 b (1.3944)	0 b (2.5159)	0 c (2.1082)
<i>A. brasilense</i> VS9	HMA	4.88 a (0.7815)	95 b (1.3944)	90 a (2.5159)	90 b (2.1082)
	Sin inocular	4.12 a (0.9571)	0 b (1.3944)	0 b (2.5159)	0 c (2.1082)
Sin inocular	HMA	0 b (0.7815)	100 a (1.3944)	95.95 a (2.5159)	100 a (2.1082)
	Sin inocular	0 b (0.7815)	0 b (1.3944)	0 b (2.5159)	0 c (2.1082)

## DISCUSIÓN

El desarrollo de la agricultura industrial, las labores de campo y el uso de agroquímicos han modificado el ecosistema de los campos agrícolas, los cuales son cada vez más dependientes de grandes cantidades de energía y de productos químicos necesarios para mantener su producción (Gianinazzi *et al.*, 2010); por lo que, los efectos benéficos de las PGPR y los HMA en las plantas y el suelo se plantean como aspectos esenciales a considerar para el manejo sostenible de los ecosistemas agrícolas (Jeffries *et al.*, 2003; Adesemoye *et al.*, 2008). Al respecto existen reportes para varias especies agrícolas, como cereales, frutales y crasuláceas cuando se inoculan con HMA (González-Chávez *et al.*, 1998; Meyer y Linderman 1986; Sawers *et al.*, 2007; Zambrano y Díaz, 2008; Pimienta-Barrios *et al.*, 2009; Gianinazzi *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

Uno de los factores que afectan la respuesta de la planta a la inoculación es la falta de una colonización microbiana de la raíz en el momento preciso requerido por la raíz (Bashan, 1998; Lugtenberg y Kamilova, 2009). A este respecto observamos que la cepa AZm5 de *A. lipoferum* favoreció la colonización de raíces de jitomate (var. Juanita) con el inóculo silvestre, lo que podría evidenciar una complementariedad funcional; en tanto que no presentó ningún efecto en la colonización con el inóculo Zac 19 en raíces de jitomate (var. ACE VF 55).

Algunas bacterias del género *Azospirillum* han sido consideradas como microorganismos estimuladores de la colonización micorrízica, denominadas MHB (por sus siglas en inglés *Mycorrhiza Helper Bacteria* (Garbaye, 1994; Frey-Klett *et al.*, 2007)) (Barea *et al.*, 1983; Subba Rao *et al.*, 1985). Se ha reportado que las auxinas producidas por *Azospirillum* en un medio de cultivo estimulan la formación y el desarrollo de la simbiosis micorrízica en una diversa gama de plantas (Costacurta y Vanderleyden, 1995).

Los hongos micorrízicos arbusculares tienen un impacto favorable en las plantas al permitir un mayor absorción de nutrimentos y agua del suelo, ya que las hifas extrarradicales incrementan la zona de captación de agua y permiten una continuidad del líquido en la interfase del suelo y la raíz (Guadarrama *et al.*, 2004; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007), lo que resulta en el incremento de biomasa vegetal. A este respecto, los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo antes expuesto, ya que observamos que las plantas de jitomate bola (var. Juanita) co-inoculadas con la cepa AZm5 de *A. lipoferum* y el inóculo micorrízico silvestre incrementaron la absorción de agua en hojas y la producción de biomasa (Experimento 1); en tanto que las plantas de jitomate bola (var. ACE VF 55) co-inoculadas con la cepa AZm5 de *A. lipoferum* y la cepa micorrízica Zac 19 incrementaron la cantidad de nitrógeno y fósforo en tejido vegetal. El efecto de la co-inoculación se manifestó desde los 17 dds y permaneció hasta etapas posteriores del desarrollo. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores, que indican que la co-inoculación de *A. brasilense*, *Glomus clarum* y *G. fasciculatum* favorecen el crecimiento de plantas de jitomate (Pulido *et al.*, 2003); en tanto que, Terry y colaboradores (2005) reportaron que la co-inoculación con *A. brasilense* y *G. clarum* mejoran el estado nutrimental de plantas de jitomate. Por otro lado, Barea y colaboradores (1983), reportaron un incremento en el contenido de nitrógeno y fósforo en plantas de maíz inoculadas con *Azospirillum brasilense* y *Glomus mosseae*. Así mismo, la diferencia en el crecimiento vegetativo observado en las plántulas de jitomate co-inoculadas con *Azospirillum* y HMA respecto a las no inoculadas, sugiere que las plantas puedan incrementar las probabilidades de sobrevivencia en campo, o pueden ser comercializadas como plántulas para trasplante a nivel de campo o invernadero, lo cual representa una ventaja económica muy importante para el agricultor.

Los resultados sugieren que la presencia de la cepa AZm5 de *A. lipoferum* y la de ambos inóculos (silvestre y Zac 19) benefició el crecimiento de plántulas de jitomate durante la etapa vegetativa, en un cultivo con suelo no fertilizado o fertilizado con dosis reducidas de nitrógeno. Varios autores mencionan que algunos inoculantes, como las PGPR y las micorrizas, pueden favorecer el uso eficiente de los fertilizantes químicos aplicados y de los abonos (Guerra-Sierra 2008; Adesemoye y Kloepper, 2009; Adesemoye *et al.*, 2009).



Además, se ha reportado que una alta fertilización (N, P, K) del suelo y prácticas constantes de cultivos intensivos, disminuyen la colonización micorrízica, impidiendo la formación simbiótica e incluso la extinción de especies micorrízicas arbusculares en el suelo (Gianinazzi 1994).

Los resultados obtenidos en estos estudios apoyan el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal y una reducción en las dosis de fertilizantes para el cultivo de especies agrícolas en suelos poco fértiles.

### CONCLUSIONES

La colonización de plántulas de jitomate con un inóculo micorrízico silvestre es favorecida en la longitud de tallo por la presencia de la cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum*.

El inóculo micorrízico silvestre incrementa el contenido de agua y la biomasa total en vástago en la etapa vegetativa de plántulas de jitomate bola variedad Juanita.

Las plántulas inoculadas con la cepa micorrízica Zac 19 favorecen la absorción de N y P por plántulas de jitomate bola variedad ACE VF55 fertilizadas con el 50% de nitrógeno y el 0% de fósforo de la dosis recomendada.

La interacción *Azospirillum lipoferum* (AZm5) y hongos micorrízicos (silvestre y Zac19), muestra un efecto sinérgico en el crecimiento vegetal de plántulas de jitomate en la etapa vegetativa del cultivo.

### LITERATURA CITADA

Adesemoye A.O. y Kloeppel J.W. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1-12.

Adesemoye A.O., Torbert H.A. y Kloeppel J.W. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol* 58: 921-929.

Adesemoye A.O., Torbert H.A. y Kloeppel J.W. 2008. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Can J Microbiol* 54: 876-886.

Alcántar-González G. y Sandoval-Villa M. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación Especial No. 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Chapingo, México. 156 pp.

Artursson V., Finlay R.D. y Jansson J.K. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ Microbiol* 8: 1-10.

Azcón, R. 2000. Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola. pp 1-15. En Ferrera-Cerrato R. (ed) *Ecofisiología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular*. Ed. Mundi-Prensa, Colegio de Postgraduados-IRENAT, Montecillo, México.

Bashan Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv* 16: 729-770.

Barea J.M., Bonis A.F. y Olivares J. 1983. Interactions between *Azospirillum* and VA mycorrhiza and their effects on growth and nutrition of maize and ryegrass. *Soil Biol Biochem* 15: 705-709.

Chamizo-Checa A., Ferrera-Cerrato R. y Varela L. 1998. Identificación de especies de un consorcio del género *Glomus*. *Rev Mex Micol* 14: 37-40.

Costacurta A. y Vanderleyden J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol* 21: 1-18.

Döbereiner J., Marriel I.E. y Nery M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can J Microbiol* 22: 1464-1473.

Esquivel-Cote 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. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Ferrera-Cerrato R. y Alarcón A. 2007. *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta organismo*. Trillas, México, México. 568pp.

Frey-Klett P., Garbaye J. y Tarkka M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol* 176: 22-36.

Garbaye J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128:197-210.

Gianinazzi S., Gollotte A., Binet M.N., van Tuinen D., Redecker D. y Wipf D. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20: 519-530.

González-Chávez C., Ferrera-Cerrato R. y Pérez-Moreno J. 1998. *Biotecnología de la micorriza arbuscular en fruticultura*. Universidad Autónoma de Tlaxcala y Colegio de Postgraduados, México, 131 pp.

Guadarrama P., Álvarez-Sánchez J. y Estrada-Torres A. 2004. Phosphorus dependence in seedlings of a tropical pioneer tree: the role of arbuscular mycorrhizae. *J of Plant Nutr* 27: 2159-2174.

Guerra-Sierra B.E. 2008. *Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible*. Tecnología en Marcha 21: 191-201.

Hunt R. 1990. *Basic growth analysis*. Unwin Hyman Ltd, London, UK. 112 pp.

---

Jeffries P., Gianinazzi S., Perotto S., Turnau K. y Barea J.M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol Fertil Soils* 37: 1-16.

Linderman R.G. 1992. Vesicular-Arbuscular micorrhizae and soil microbial interactions. En: Bethlenfalvay G.J. y Linderman R.G. (Ed.). *Mycorrhizae in sustainable agricultura*. pp 45-70. ASA, Special Publication no. 54. Madison, USA.

Lugtenberg B. y Kamilova F. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63: 541-546.

Meyer J.R. y Linderman R.G. 1986. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol Biochem* 18: 185-190.

Oblinger J.L. y Koburger J.A. 1975. Understanding and teaching the Most Probable Number technique. *J Milk Food Technol* 38: 540-545.

Phillips L. y Hayman D. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and VA mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55: 158-161.

Pimienta-Barrios E., Zañudo-Hernández J y López-Alcocer E. 2009. Efecto de las micorrizas arbusculares en el crecimiento, fotosíntesis y anatomía foliar de plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *Act Bot Mex* No.89: 63-78. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-71512009000400005&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-71512009000400005&lng=es).

Pivato B., Offre P., Marchelli S., Barbonaglia B., Mougél C., Lemanceau P. y Berta G. 2009. Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza* 19: 81-90.

Pulido L.E., Medina N. y Cabrera A. 2003. La biofertilización con rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de postura de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y cebolla (*Allium cepa* L.).I. Crecimiento vegetativo. *Cultivos Tropicales* 24: 15-24.

Sawers R.J.H., Gutjahr C. y Paszkowski U. 2007. Cereal mycorrhiza: an ancient symbiosis in modern agriculture. *Trends Plant Sci* 13: 93-97.

Schenck N.C. y Pérez Y. 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3th Edition. Synergistic Publications. Gainesville.

Sieverdin, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Eschborn, Germany.

Subba Rao N.S., Tilak K.V.B.R. y Sing C.S. 1985. Synergistic effect of vesicular-arbuscular mycorrhizas and *Azospirillum brasilense* on the growth of barley in pot. *Soil Biol Biochem* 17: 119-121.

Tarrand J., R. Krieg y J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. *Can J Microbiol* 24: 967-980.

Terry E., Leyva A. y Hernández A. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Rev Colomb Biotecnol 7: 47-54.

Urzúa H.M.C. 2001. Selección de la concentración óptima de *Azospirillum* y su combinación con diferentes dosis de fertilización en dos sistemas de cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum* M.). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Veeraswamy J., Padmavathi T. y Venkateswarlu K. 1992. Interaction effects of *Glomus intraradices* and *Azospirillum lipoferum* on sorghum. Indian J Microbiol 32: 305-308.

Wang X., Pan Q., Chen F., Yan X. y Liao H. 2011. Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P Mycorrhiza 21: 173-181.

Zambrano J.A. y Díaz L.A. 2008. Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus* sp. en *Gmelina arborea* durante su germinación y manejo en vivero. Universitas Scientiarum 13: 162-170.

## CAPÍTULO VI

## Discusión general y conclusiones

Existen en la rizosfera microorganismos capaces de promover el crecimiento de las plantas, como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), los cuales utilizan diferentes mecanismos de acción para estimular dicho crecimiento (Davison, 1988; Kloepper *et al.*, 1989; Smith y Read, 1997; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).

Una de las rizobacterias más importantes y mejor caracterizadas como PGPR es *Azospirillum*. Su efecto promotor del crecimiento vegetal ha sido atribuido principalmente, entre otros mecanismos, a la fijación de nitrógeno y a la producción de fitohormonas (Crozier *et al.*, 1988; Strzelczyk *et al.*, 1994; Bashan y Holguin, 1997; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Dobbelaere *et al.*, 2001; Martínez-Morales *et al.*, 2003; Thuler *et al.*, 2003; Perrig *et al.*, 2007; Spaepen *et al.*, 2007). Las bacterias del género *Azospirillum* se caracterizan por ser diazótrofes, es decir a través del sistema enzimático de la nitrogenasa, reducen el dinitrógeno atmosférico a formas disponibles para la planta como el amonio y el nitrato (Postgate, 1998); no obstante como lo indican nuestros resultados, no todas las especies tienen la misma capacidad para fijar nitrógeno, ya que la cepa VS9 de *A. brasilense* presenta mayor actividad de la nitrogenasa que la cepa AZm5 de *A. lipoferum* (ver siguiente cuadro).

Cepa	Actividad nitrogenasa	Producción de auxinas (ácido indol acético)	Producción de auxinas (ácido indol butírico)	Producción de giberelinas (ácido giberélico)	Producción de citocininas ( <i>trans</i> -zeatina)	Producción de citocininas ( <i>trans</i> -zeatina ribosida)	Actividad de la enzima ACC desaminasa
AZm5 <i>A. lipoferum</i>	+	-	-	-	+	-	+
VS9 <i>A. brasilense</i>	+	+	+	+	-	-	-

Así mismo, *Azospirillum* se ha distinguido por la producción de fitohormonas tales como auxinas, giberelinas, citocininas y etileno; sin embargo, como lo muestran nuestros resultados, no todas las especies de *Azospirillum* son capaces de producir el mismo tipo de fitohormonas, la cepa VS9 de *A. brasilense* produce en cultivos *in vitro* las auxinas ácido indol-3-acético (AIA) y ácido indol-3-butírico (AIB), y giberelinas, pero no citocininas; en cambio, la cepa AZm5 de *A. lipoferum* es capaz de producir la citocinina trans-zeatina en cantidades superiores a las reportadas para algunas cepas de *A. brasilense* pero no AIA ni AIB.

El AIA es la auxina más importante y estudiada de las fitohormonas producidas por *Azospirillum*. Se ha reportado que plantas inoculadas con cepas de *A. brasilense* o *A. lipoferum* incrementan la longitud y el volumen de raíces adventicias, con efectos similares a los observados en plantas no inoculadas pero adicionadas con AIA (Crozier *et al.*, 1988; Costacurta y Vanderleyden, 1995; Bashan y Holguin, 1997; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Aguilar-Piedras *et al.*, 2008). Tal efecto en la raíz favorece la capacidad de la planta para absorber los nutrimentos minerales del suelo (Marschner, 1995). A pesar de que la cepa AZm5 de *A. lipoferum* no produce AIA ni AIB, si es capaz de producir otras sustancias indólicas parecidas al AIA (Esquivel-Cote, 2002), las cuales podrían tener actividad biológica en las plantas, como el ácido indol pirúvico, el ácido indol láctico, el indol acetamida, el indol acetaldheído, el indol etanol y el indol metanol (Crozier *et al.*, 1988). La producción de sustancias indólicas, particularmente el AIA, juega un papel muy importante en el crecimiento de la raíz; no obstante, es probable que otras fitohormonas, como las citocininas o la interacción entre auxinas y citocininas sean también responsables del crecimiento y desarrollo vegetal (Zimmer y Bothe, 1988; Zhao, 2008; Moubayidin *et al.*, 2009).

En cuanto a la producción de citocininas, se conoce que en *A. brasilense* y en otras PGPR's como *Azotobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas* es una característica común (Tien *et al.*, 1979; Greene, 1980; Cacciari *et al.*, 1989; Horemans *et al.*, 1986; Nieto y Frankenberger, 1990; Timmusk *et al.*, 1999; García de Salamone *et al.*, 2001; Ortíz-Castro *et al.*, 2008), sin embargo no es frecuente en cepas de *A. lipoferum* (Bashan *et al.*, 2004).

Por otra parte, se ha reportado que *Azospirillum* puede sintetizar etileno (Strzelczyk *et al.*, 1994), no obstante los estudios al respecto son escasos. En este sentido, el mecanismo de la enzima ACC desaminasa en las PGPR regula la producción de etileno en plantas (Glick *et al.*, 1998). De acuerdo con nuestros resultados, no todas las especies de *Azospirillum* producen esta enzima, ya que la cepa AZm5 de *A. lipoferum* presenta una alta actividad de la ACC desaminasa, superior a la reportada por bacterias nativas e incluso transformadas genéticamente (Holguín y Glick, 2001; Ma *et al.*, 2003, Belimov *et al.*, 2005), en comparación con la cepa VS9 de *A. brasilense*, que no presenta actividad de la enzima ACC desaminasa. Adicionalmente, en la cepa

AZm5 se identificó un fragmento de ADN de 639 pb (GU727865) que corresponde al gen *acdS*, el cual codifica para la enzima ACC desaminasa, y que presentó una homología del 100% con la secuencia de nucleótidos del gen *acdS* de la cepa 4B de *A. lipoferum* reportado por Blaha y colaboradores (2006). Por otro lado, se observó la promoción significativa de la elongación de raíces de plántulas de jitomate, mediante el bioensayo gnotobiótico; resultados que evidencian la actividad de la enzima ACC desaminasa. Lo anterior, sugiere que *A. lipoferum* podría presentar una mayor capacidad de respuesta a cambios en el ambiente (por ejemplo, los que se generan en el suelo debido a la contaminación por aguas negras o metales pesados), donde el gen *acdS* jugaría un papel importante en la adaptación y tolerancia a ambientes cambiantes de las bacterias, es decir, *A. lipoferum* podría tener una mayor respuesta a variaciones en condiciones ambientales.

*Azospirillum* puede participar en la regulación hormonal de las plantas; al respecto Bashan y colaboradores (1996), supusieron que la producción de fitohormonas por parte de *Azospirillum* podría intervenir en el balance hormonal de la planta e influenciar su desarrollo, sin embargo proponían necesarios más estudios al respecto. Los resultados de esta tesis sugieren, por un lado, una diversidad metabólica en el género *Azospirillum* mayor a la que se había reportado, lo cual extiende el abanico de herramientas con las que cuenta la bacteria para promover el crecimiento de las plantas, y por tanto amplía la posible diversidad de respuestas en diferentes escenarios ambientales.

Aunado a lo anterior, se ha reportado que el efecto en el crecimiento de plantas inoculadas con *Azospirillum* se incrementa gracias a la presencia de otros microorganismos promotores del crecimiento vegetal (Berg, 2009), como los HMA, que son capaces de establecer simbiosis con las raíces de casi el 90% de todas las especies vegetales existentes en el planeta (Smith y Read 1997), y que emplean como principales mecanismos de acción la absorción de agua y fósforo soluble del suelo para promover el crecimiento vegetal (Smith y Read, 1997; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007, Javot *et al.*, 2007). No obstante que autores como Linderman (1992), Veeraswamy y colaboradores (1992) y Berg (2009), señalan que la co-inoculación de plantas con *Azospirillum* y HMA incrementa significativamente el crecimiento vegetal de varios cultivos de interés agrícola, la información que existe acerca del efecto de esta co-inoculación en el cultivo de jitomate es escasa, por lo cual se sugieren mas estudios al respecto.

Con base en lo anterior, el presente trabajo contribuye al conocimiento del efecto de la co-inoculación *Azospirillum*-HMA en el crecimiento de plantas de jitomate. De acuerdo con nuestros resultados *Azospirillum* y los HMA presentan un efecto sinérgico en el crecimiento vegetal ya que las plantas de jitomate inoculadas con estos microorganismos, presentaron un mayor contenido de biomasa, nitrógeno y fósforo, lo cual puede deberse a una



complementariedad funcional. Por otro lado, se sabe que algunas bacterias conocidas como *Mycorrhiza Helper Bacteria* o MHB (Garbaye, 1994), donde se incluye al género *Azospirillum* (Frey-Klett *et al.*, 2007), se adhieren al micelio extrarradical del HMA, favorecen su desarrollo y su actividad metabólica (Bonfante y Anca, 2009), lo que favorece el establecimiento de la simbiosis.

Respecto a lo anterior, el jitomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas económicamente más importantes que se producen en México (FAO, 2010; SIAP, 2010). No obstante, para su cultivo intensivo, como en muchos otros, los agricultores requieren aplicar agroquímicos (pesticidas y fertilizantes químicos), en la mayoría de los casos, en dosis excesivas, y donde desafortunadamente en México su uso no está regulado. A este respecto, se sabe que en la actualidad uno de los graves problemas ambientales por los que atraviesa el campo mexicano y el de otros países del mundo, es el uso indiscriminado de fertilizantes químicos al suelo para obtener el mayor rendimiento de los cultivos. Los fertilizantes químicos son sales que al ser aplicados excesiva y constantemente provocan la erosión y pérdida de nutrimentos del suelo (Fassbender y Bornemisza, 1987; Pepper *et al.*, 2006). Por ejemplo, en los fertilizantes nitrogenados aplicados al suelo, el nitrógeno se pierde principalmente por volatilización del amonio a la atmósfera, y por lixiviación de nitratos, los cuales al llegar a los acuíferos subterráneos se reducen a nitritos, compuestos altamente tóxicos responsables de la contaminación del agua. Por otro lado, el fósforo de los fertilizantes fosfatados, se fija a las partículas tanto de suelos ácidos como alcalinos, dejándolo no disponible para la planta (Malleville y Chambolle, 1990; Arcand y Schneider, 2006; Estrada-Botello *et al.*, 2007), lo que provoca que cada vez se apliquen mayores cantidades de fertilizante. En este sentido la sostenibilidad de los sistemas agrícolas se centra en la necesidad de desarrollar tecnologías alternas que no dependan enteramente de insumos externos no renovables, que no tengan efectos adversos en el ambiente, que sean accesibles y efectivos para los productores, y que permitan mejorar y asegurar la productividad agrícola (Pretty, 2008). Algunas de estas alternativas han sido la producción de inoculantes microbianos, que promueven el crecimiento y nutrición vegetal (Lugthenberg *et al.*, 2002; Vessey, 2003; Morrissey *et al.*, 2004; Berg, 2009; Lugthenberg y Kamilova, 2009).

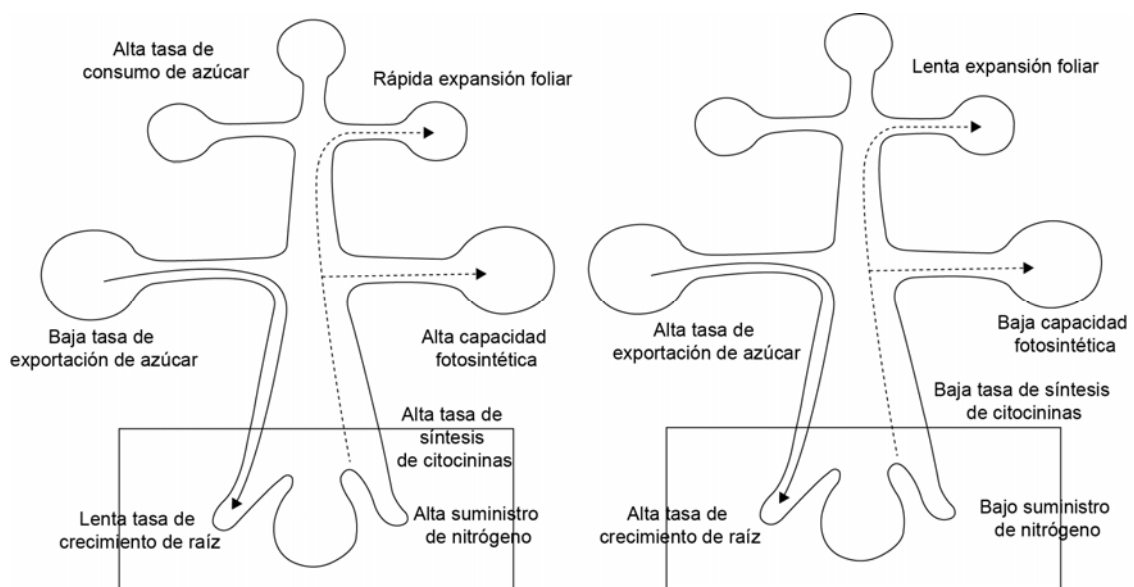
Acerca de lo descrito se ha reportado que el biofertilizante “micorrizas” del INIFAP, el cual para el cultivo de maíz en el estado de México se recomienda un kilo del biofertilizante por cada 45 kg de semilla, más la mitad de la dosis de fertilizante químico que acostumbra el productor, registró en Juchitepec un rendimiento promedio en maíz blanco de 2 100 kg ha<sup>-1</sup>, 800 kg arriba de lo logrado sin inoculación. En Otumba, en maíz azul inoculado, se lograron en promedio 3 054.8 kg ha<sup>-1</sup> contra 1 599.8 kg ha<sup>-1</sup> en promedio con fertilización química únicamente (Larqué-Saavedra *et al.*, 2010). Lo anterior proporciona un beneficio económico

adicional muy importante para el agricultor, ya que las plantas requerirían de menor cantidad de fertilizantes para su nutrición, lo cual reduce los costos de producción. Por ejemplo, para el cultivo de maíz en Morelos, se requiere un costo de \$6 000.00 y \$8 000.00 para fertilizar el suelo de una hectárea, dependiendo del tipo y la dosis del fertilizante; en tanto que, el costo del biofertilizante para inocular las semillas necesarias para una hectárea es de \$250.00 con una reducción del 50% del fertilizante químico, lo cual trae una reducción de \$2 750 a \$3 750.00 por hectárea (Biofábrica, Siglo XXI, 2011). Razón por la cual, se ha motivado la sustitución parcial e incluso total de fertilizantes químicos, tanto nitrogenados como fosfatados, por la inoculación con estos microorganismos (Adesemoye y Kloepper, 2009; Adesemoye *et al.*, 2009).

Por otra parte, Hazera Seeds Inc., es una empresa subsidiaria de Hazera Genetics Ltd., que promueve, comercializa y distribuye semillas de híbridos de diversas flores y vegetales en diversos países del mundo, incluido México. Además de las semillas, Hazera Seeds Inc., recomienda las condiciones de cultivo y fertilización que se deben llevar a cabo durante el desarrollo de los cultivos. Para los productores de hortalizas de Xochimilco, México, D.F., Hazera Seeds Inc. les recomienda, para un máximo rendimiento del cultivo de jitomate bola, una fertilización de 340 kg N ha<sup>-1</sup>, dosis similar a la que se emplea en el norte de la República Mexicana y en Estados Unidos. No obstante, y de acuerdo a nuestros resultados, es factible la reducción de la dosis recomendada, ya que la inoculación de plantas de jitomate con la cepa AZm5de *A. lipoferum* favorece el crecimiento vegetal y la producción de las plantas al ser fertilizadas con el 50% de la dosis de nitrógeno recomendada, es decir 170 kg N ha<sup>-1</sup>.

El crecimiento vegetal se refiere al incremento en peso seco, volumen, longitud o área de una planta, y se expresa en términos de producción de biomasa y de su distribución en los diferentes órganos de la planta, de acuerdo a la adquisición de recursos (agua, nutrientes, luz), donde la tasa relativa de crecimiento (RGR) y la tasa de asimilación neta (NAR) son variables que expresan esta condición (Lambers *et al.*, 1998; Larcher, 2003). A este respecto, se sabe que la inoculación de *Azospirillum* promueve el crecimiento de varias especies vegetales (Dobbelaere *et al.*, 2001). No obstante, el efecto de la inoculación en estas variables de crecimiento vegetal ha sido reportado escasamente en algunas especies vegetales, lo cual es muy importante evaluar porque nos podría sugerir que la inoculación microbiana tiene un efecto funcional en la planta, la cual depende de las condiciones ambientales donde ésta se desarrolle.

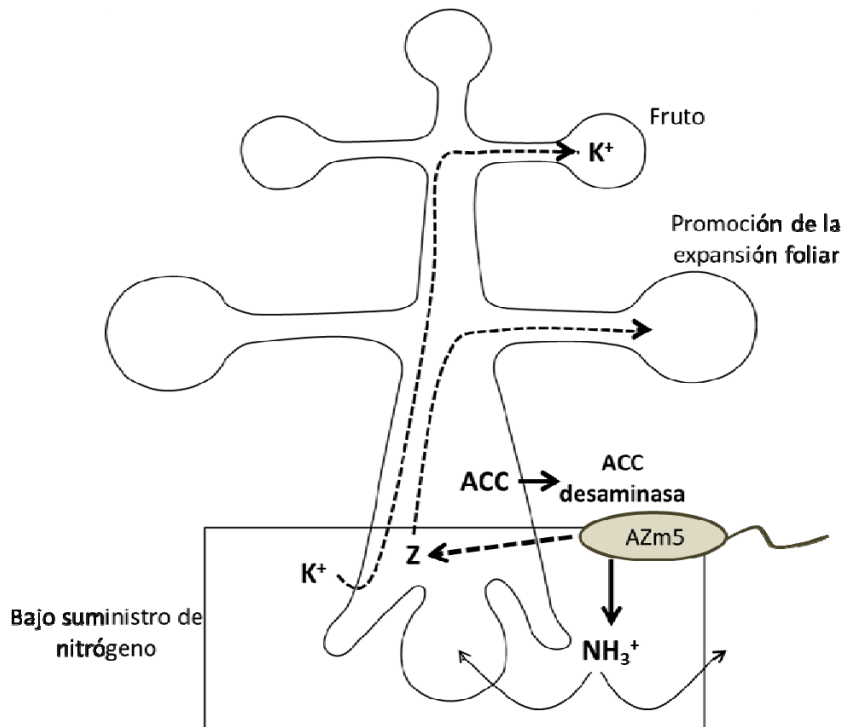
En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que cuando plantas de jitomate de 42 días de desarrollo en un cultivo hidropónico, inoculadas con la cepa AZm5 y fertilizadas con  $170 \text{ kg N ha}^{-1}$  (50% de la dosis completa recomendada), la biomasa total, la RGR y el contenido de nitrógeno en hojas se ven incrementadas. Estos resultados coinciden con la de algunos autores (Tahir *et al.*, 2006; Shaharoon *et al.*, 2008), quienes reportan que las plantas que son inoculadas con PGPR's con actividad de la enzima ACC desaminasa y fertilizadas con una fuente orgánica de nitrógeno, incrementan su contenido de nitrógeno en el tejido vegetal. De acuerdo al modelo hipotético propuesto por Van der Werf y Nagel (1996), que se representa en la figura 6.1, indica que cuando existe una baja disponibilidad de nitrógeno en el sustrato la planta responde con una baja producción de citocininas, reduciendo la traslocación de éstas hacia las hojas, lo que repercute en una baja tasa de expansión foliar (expresada en la variable SLA) y por tanto, una disminución en la capacidad fotosintética de la planta (expresada en la variable NAR). La alta producción de citocininas por la cepa AZm5 de *A. lipoferum* puede explicar el incremento en la expansión foliar o una relación área foliar: peso foliar (SLA) alta, de las plantas inoculadas con la cepa AZm5 cuando se encuentran desprovistas de una fuente de nitrógeno. Así mismo, los frutos de las plantas inoculadas con AZm5 y fertilizadas con  $255 \text{ Kg N ha}^{-1}$  presentaron mayor contenido de  $\text{K}^+$ , el cual favorece la acidez, firmeza y uniformizar la maduración y el sabor, según lo reportado por Ho y Adams (1995). Al respecto, se ha reportado que las citocininas promueven la absorción de cationes como el  $\text{K}^+$  (Taiz y Zeiger, 2002), lo que supone que las citocininas producidas por la cepa AZm5 promovieron la absorción de potasio del suelo.



**Figura 6.1** Modelo hipotético propuesto por Van der Werf y Nagel (1996) que explica el efecto en el crecimiento vegetal de un alto o bajo aporte de nitrógeno. Tomado de Lambers *et al.* (1998).

Por otro lado, y de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se observó que la cepa AZm5 incrementó la NAR y la RGR de plántulas de jitomate de 71 días de desarrollo que se encontraban en almácigo previo al trasplante, en un sistema de cultivo intensivo semi hidropónico para fines comerciales. La variable RGR coincide con los resultados obtenidos en el cultivo de 42 días, en cambio contradice los resultados respecto a la variable NAR. A este respecto, los datos sugieren que la NAR se expresa en etapas posteriores del crecimiento de plantas de jitomate. En etapas posteriores al trasplante, el efecto de la inoculación no es significativo, lo cual coincide con Larcher (2003), quién reporta que las variables de crecimiento como NAR y RGR son especialmente altos en etapas de crecimiento intensivo de la planta, como lo es la etapa vegetativa. El efecto de la cepa AZm5 en los diferentes parámetros del crecimiento vegetal podrían atribuirse a la actividad de la enzima ACC desaminasa, resultados que coinciden con lo reportado en la literatura, donde mencionan que cepas rizobacterias que sintetizan ACC desaminasa, como *Pseudomonas*, incrementan el crecimiento vegetal y el contenido de nitrógeno en plantas de canola y trigo fertilizadas con dosis subóptimas de nitrógeno (Belimov *et al.*, 2002; 2005).

De acuerdo con los resultados expuestos en este trabajo de tesis, se diseñó un modelo (Figura 6.2) para explicar el mecanismo que la cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum* emplea para promover el crecimiento vegetal de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*), y el cual expone que en un sustrato con bajas concentraciones de nitrógeno disponible, la biosíntesis y traslocación de citocininas en tejido vegetal disminuyen, generando una reducción en la expansión foliar de las hojas, aspecto que influye en el crecimiento vegetal. Sin embargo, en estas mismas condiciones del sustrato, cuando las plantas son inoculadas con la cepa AZm5 (*A. lipoferum*), la deficiencia en la biosíntesis de citocininas la compensa la producción de la propia cepa, por tanto la traslocación no disminuye, lo que favorece la expansión foliar y el crecimiento vegetal, así mismo, las citocininas estimulan la absorción de potasio, catión que se presenta en la formación del fruto. Sumado a lo anterior, la actividad de la enzima ACC desaminasa favorece el incremento de nitrógeno en la planta, posiblemente a la producción de amonio que resulta del desdoblamiento del compuesto ACC durante la biosíntesis de etileno en plantas.

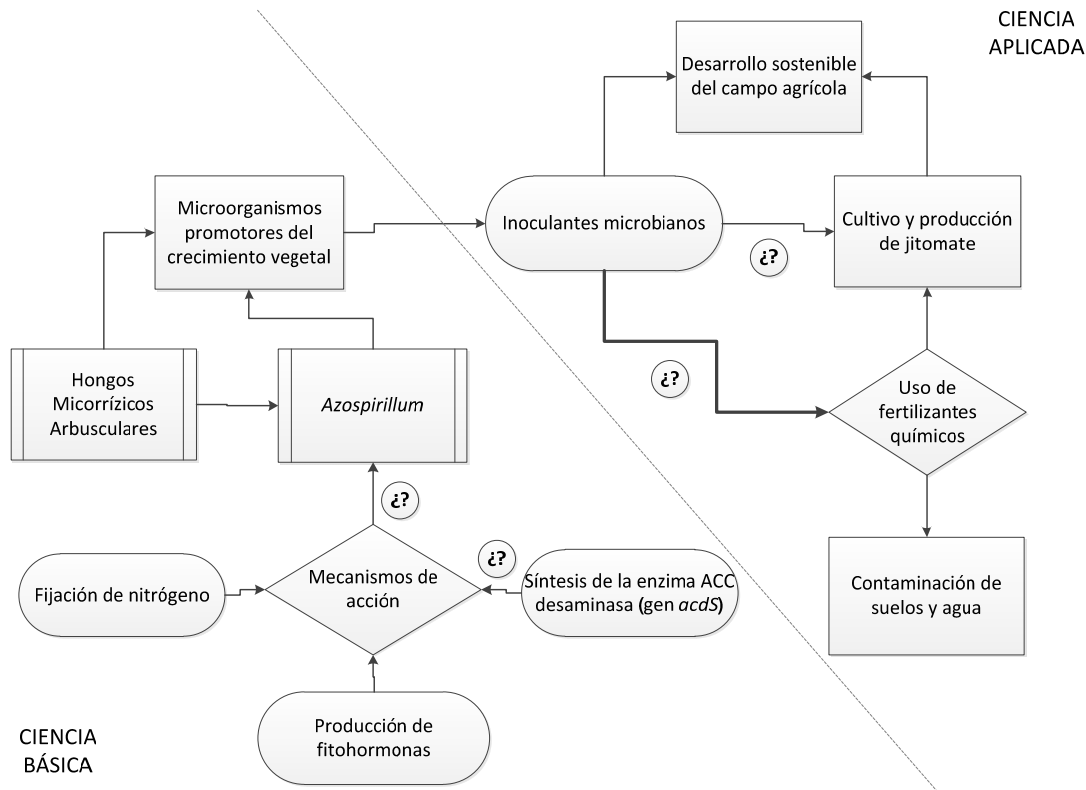


**Figura 6.2** Modelo hipotético propuesto para explicar el mecanismo de acción que la cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum* emplea para promover el crecimiento vegetal de jitomate. ACC=ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico,  $K^+$ =potasio, Z=citocininas.

Como conclusiones inéditas y relevantes reportadas en este trabajo de tesis y que aportan al conocimiento del uso de inoculantes microbianos como una alternativa a la reducción del uso de fertilizantes para el cultivo de jitomate, desde el punto de vista de la ciencia básica y aplicada (Figura 6.3) son:

- La cepa AZm5 de *A. lipoferum*, es capaz de sintetizar la enzima que desamina el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC, compuesto precursor del etileno) o ACC desaminasa, la cual presenta una alta actividad que se relaciona con la presencia del gen *acdS*; produce altas concentraciones de la citocinina *trans*-zeatina, en un cultivo *in vitro*; y que los mecanismos que emplea para promover el crecimiento vegetal de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) son la producción de citocininas y la actividad de la enzima ACC desaminasa.
- El uso de inoculantes, elaborados con la cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum*, HMA como el inóculo Zac 19 o ambos, favorecen el crecimiento vegetal o la producción del cultivo del jitomate.

Por tanto, el género *Azospirillum* presenta un abanico diverso de herramientas para promover el crecimiento vegetal.



**Figura 6.3** Aspectos con los cuales los resultados del trabajo de tesis contribuye a la ciencia básica y aplicada en el uso de inoculantes microbianos para el cultivo de jitomate.

Finalmente, esta tesis apoya el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal en la agricultura para mejorar el crecimiento de los cultivos y favorecer la reducción del uso de fertilizantes químicos, principalmente los nitrogenados, tal como lo indican autores como Adesemoye y Kloepper (2009), Adesemoye y colaboradores (2009), Berg (2009), Bonfante y Anca (2009), Lugtenberg y Kamilova (2009), Ortíz-Castro y colaboradores (2009), Rashedul y colaboradores (2009), Artursson y colaboradores (2006), y Rosenblueth y Martínez-Romero (2006)., ya que el uso excesivo de estos agroquímicos, se ha convertido en uno de los problemas ambientales más importantes a resolver, debido a la contaminación del suelo y agua por nitratos y nitritos.

---

**LITERATURA CITADA**

- Adesemoye A.O. y Kloepper J.W. 2009. Plant interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1-12.
- Adesemoye A.O., Torbert H.A. y Kloepper J.W. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol* 58: 921-929.
- Aguilar-Piedras J.J., Xiqui-Vázquez M.L., García-García S. y Baca B.E. 2008. Producción de lindol-3-acético en *Azospirillum*. *Rev Lat Microbiol* 50: 29-37.
- Arcand M.M. y Schneider K.D. 2006. Plant-and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 78: 791-807.
- Artursson V., Finlay R.D. y Jansson J.K. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ Microbiol* 8: 1-10.
- Bashan Y., Holguin G. y Ferrera-Cerrato R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos *Azospirillum*. *Terra* 14: 159-183.
- Bashan Y., Holguin G. y de-Bashan L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol* 50: 521-577.
- Bashan Y. y Holguín G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can J Microbiol* 43: 103-121.
- Belimov A.A., Safronova V.I. y Mimura T. 2002. Response of spring rape (*Brassica napus* var. *oleifera* L.) to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase depends on nutrient status of the plant. *Can J Microbiol* 48: 189-199.
- Belimov A.A., Hontzas N., Safronova V.I., Demchinskaya S.V., Piluzza G., Bullitta S. y Glick BR. 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biol Biochem* 37: 241-250.
- Berg G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 11-18.
- Biofábrica Siglo XXI, 2011. Disponible en línea <http://www.biofabrica.com.mx/>
- Blaha D., Prigent-Combaret C., Sajjad M.M. y Moënne-Loccoz Y. 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol Ecol* 56: 455-470.
- Bonfante P. y Anca I.A. 2009. Plants, mycorrhizal fungi and bacteria: a network of interactions. *Annu Rev Microbiol* 63: 363-383.



Cacciari I., Lippi D. y Pietrosanti T. 1989. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum spp.* and *Arthrobacter*. *Plant Soil* 115: 151-153.

Costacurta A. y Vanderleyden J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol* 21: 1-18.

Crozier A., Arruda P., Jasmim J.M., Monteiro A.M. y Sandberg G. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol* 54: 2833-2837.

Davison J. 1988. Plant beneficial bacteria. *BioTech* 6: 282-286.

Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera-González C., Caballero-Mellado J., Aguirre J.F., Kapulnik Y., Brener S., Burdman S., Kadouri D., Sarig S. y Okon Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust J Plant Physiol* 28: 871-879.

Estrada-Botello M.A., Nikolskii-Gavrilov I., Mendoza-Palacios J.D., Cristobal-Acevedo D., de la Cruz Lázaro E., Brito-Manzano N.P., Gómez-Vázquez A. y Bakhlaeva-Egorova O. 2007. Lixiviación de nitrógeno inorgánico en un suelo agrícola bajo diferentes tipos de drenaje en el trópico húmedo. *Universidad y Ciencia* 23: 1-14.

Esquivel-Cote 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. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

FAO 2010. FAOSTAT. <http://www.fao.org>. Revisado el 2 de Mayo de 2010.

Fassbender H.W. y Bornemisza E. 1987. Química de suelos, con énfasis en suelos de América Latina. Ed. Ilica, San José, Costa Rica, 420 pp.

Ferrera-Cerrato R. y Alarcón A. 2007. Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Trillas S.A. de C.V. México. 568 pp.

Frey-Klett P., Garbaye J. y Tarkka M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol* 176: 22-36.

Garbaye J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 128:197-210.

García de Salamone I.E., Hynes R.K. y Nelson L.M. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J Microbiol* 47: 404-411.

Glick B.R., Penrose D.M. y Li J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor Biol* 190: 63-68.

Greene E.M. 1980. Cytokinin production by microorganisms. *Bot Rev* 46: 25-74.

Ho L.C. y Adams P. 1995. Nutrient uptake and distribution in relation to crop quality. *Act Hort* 396: 33-44.

- Holguín G. y Glick B.R. 2001. Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb Ecol* 41: 281-288.
- Horemans S., de Koninck K., Neuray J., Hermans R. y Vlassak K. 1996. Production of plant growth substances by *Azospirillum* sp. and other rhizosphere bacteria. *Symbiosis*.2: 341-346.
- Javot H., Penmetsa V.R., Terzaghi N., Cook D.R. y Harrison M.J. 2007. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1720-1725.
- Kloepper J.W., Lifshitz R. y Zablotowicz R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7: 39-43.
- Lambers H., Chapin F.S. III y Pons T.L. 1998. *Plant physiology ecology*. Springer-Verlag, New York.
- Larcher W. 2003. 4a. ed. *Physiological plant ecology*. Springer-Verlag, Berlín. 513 pp.
- Larqué-Saavedra B.S., Irizar G.M.B.G., Díaz V.M. y Sangerman J.D.M. 2010. Experiencias de productores que aplicaron biofertilizante "micorrizas" en cereales en el estado de México. INIFAP. Campo Experimental Valle de México.
- Linderman R.G. 1992. Vesicular-Arbuscular micorrhizae and soil microbial interactions. En: Bethlenfalvay G.J. y Linderman R.G. (Ed.). *Mycorrhizae in sustainable agricultura*. pp 45-70. ASA, Special Publication no. 54. Madison, USA.
- Lugtenberg B.J. y Kamilova F. 2009. Plant Growth-Promoting-Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63: 541-556.
- Lugtenberg B.J., Chin-A-Wong T.F., Blumeberg G.V. 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Anton Leeuw* 81: 373-383.
- Ma W., Sebastianova S., Sebastian J., Burd G.I., Guinel F. y Glick B.R. 2003a. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobia* spp. *Anton Leeuw* 83: 285-291.
- Malleville J. y Chambolle T. 1990. Calidad del agua. *Mundo Científico*. 10: 768-778.
- Marschner H. 1995. 2a. ed. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press. San Diego, CA, USA, 889 pp.
- Martínez-Morales L.J., Soto-Urzúa L. Baca B.E. y Sánchez-Ahédo J.A. 2003. Indole-3-butyric acid (IBA) production in cultura médium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 228:167-173.
- Morrissey J.P., Dow J.M., Mark G.L. y O'Gara F. 2004. Are microbes at the root of a solution to world food production? Rational exploitation of interactions between microbes and plants can help to transform agriculture. *EMBO Reports* 5: 922-926.
- Moubayidin L., Di Mambro R. y Sabatini S. 2009. Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends Plant Sci* 14: 557-562.
- Nieto K.F. y Frankenberger W.T. 1990. Microbial production of cytokinins. *Soil Biol Biochem* 6: 191-248.

Ortíz-Castro R., Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L. y López-Bucio J. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav* 4: 701-712.

Ortiz-Castro R., Valencia-Cantero E. y Lopez-Bucio J. 2008. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signal Behav* 3: 263-265.

Pepper L.I., Gerba C.P. y Brusseau M.L. 2006. Environmental and pollution science. 2a. ed. Academic Press. Elsevier. USA. pp.243-258.

Perrig D., Boiero M.L., Masciarelli O.A., Penna C., Ruiz O.A., Cassán F.D. y Luna M.V. 2007. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 1143-1150.

Postgate J. 1998. 3a. ed. Nitrogen Fixation. Cambridge University Pres, Cambridge RU. 67 pp.

Pretty J. 2008. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. *Phil Trans R Soc B* 363: 447-465.

Rashedul I.M., Madhaiyan M., Boruah H.P.D., Yim W., Lee G., Saravanan V.S., Fu Q., Hu H. y Sa T. 2009. Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. *J Microbiol Biotechnol* 19: 1213-1222.

Rosenblueth M. y Martínez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant-Microbe Interact* 19: 827-837.

Shaharoona B., Naveed M., Arshad M. y Zahir Z.A. 2008. Fertilizer-dependent efficiency of pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 147-155.

SIAP. 2010. <http://www.siap.gob.mx>. Revisado el 23 Junio de 2010.

Smith S.E. y Read D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, San Diego, USA, 605 pp.

Spaepen S., Vanderleyden J. y Remans R. 2007. Indole-3-acetic in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31: 425-448.

Steenhoudt O. y Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev* 24: 487-506.

Strzelczyk E., Kampert M. y Li C.Y. 1994. Cytokinin like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol Res* 149: 55-60.

Tahir M., Arshad M., Naveed M., Zahir Z.A., Shaharoona B. y Ahmad R. 2006. Enrichment of recycled organic waste with N fertilizer and PGPR containing ACC-deaminase for improving growth and yield of tomato. *Soil Environ* 25: 105-112.

Taiz L. y Zeiger E. 2002. Plant Physiology. 4a. ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Mass, USA, 565 pp.

Thuler D.S., Floh E.I.S., Handro W. y Barbosa H.R. 2003. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. *Lett Appl Microbiol* 37: 174-178.

Tien T.M., Gaskin M.H. y Hubbel D.H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl Environ Microbiol* 37: 1016-1024.

Timmusk S., Nicander B., Granhall U y Tillberg E. 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem* 31: 1847-1852.

Van der Werf A. y Nagel O.W. 1996. Carbon allocation to shoots and roots in relation to nitrogen supply is mediated by cytokinins and sucrose. *Plant Soil* 185: 21-32.

Veerawamy J., Padmavathi T. y Venkateswarlu K. 1992. Interaction effects of *Glomus intraradices* and *Azospirillum lipoferum* on sorghum. *Indian J Microbiol* 32: 305-308.

Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.

Zhao Y. 2008. The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Curr Op Plant Biol* 11: 16-22.

Zimmer W. y Bothe H. 1988. The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat. *Plant Soil* 110: 239-247.

## Anexo 1

### CAPÍTULO IV

# Efecto de *Azospirillum* en el crecimiento y producción de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) fertilizadas con diferentes dosis de nitrógeno, en un cultivo en invernadero

## Cultivo de plantas de jitomate e invernadero



Aspecto del invernadero para el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*) Var. Juanita 832, Hazera Seeds, Inc., FL, USA).

## Preparación del almácigo y de unidades experimentales



Fungicidas: Terrazan 75 PH y Ridomil Gold Bravo 76.5 PH, Agroo LC S.A de C.V., OAX, MEX).



Preparación del sustrato para el almácigo: mezcla de fungicidas más turba canadiense (Lambert Peat Moss Inc., Riviere-Ouelle, QC, CAN) y agrolita (Minerales Expandidos, S.A. de C.V., MEX, MEX) (10:1).



a) y b) Preparación del almácigo: extendido y llenado de las charolas con sustrato.



Preparación del sustrato (tezontle rojo y suelo no estéril, 3:1) y llenado de las unidades experimentales.

### Análisis físico, químico y microbiológico del suelo



Desarrollo característico de *Azospirillum* en medio de cultivo NFB semisólido (NFB-ss), incubado a  $34\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 h.



**Siembra, inoculación y trasplante**



Siembra de semillas en almácigo. Una por cavidad.



Aspecto del almácigo después de la siembra de las semillas cubiertas el sustrato.



Aspecto del riego del almácigo después de la siembra.



Plántulas de jitomate a los 15 días después de la siembra, listas para la inoculación.



Detalle de la inoculación de las plántulas de jitomate.



Comparación del aspecto de las plántulas de jitomate inoculadas con la cepa AMs3 (*Azospirillum* sp.) y las plántulas no inoculadas, a los 71 días después de la siembra.





Comparación del aspecto de las plántulas de jitomate inoculadas con la cepa AZm5 (*Azospirillum lipoferum*) y las plántulas no inoculadas, a los 71 días después de la siembra.



Comparación del aspecto de las plántulas de jitomate inoculadas con la cepa VS9 (*Azospirillum brasilense*) y las plántulas no inoculadas, a los 71 días después de la siembra.



Dra. Pilar Huante y el productor Fermín Jiménez en el trasplante de plántulas a unidades experimentales



Aspecto de las plántulas al final del trasplante en las unidades experimentales en el invernadero.

Variedad Juanita (832, Hazera Seeds, Inc., FL, USA):



## Fertilización y Riego



Aspecto de las mangueras de riego, sistema mediante el cual se aplicó la solución nutritiva.



Detalle del riego del sustrato, de la manguera a las unidades experimentales.

## Análisis de Crecimiento Vegetal y Producción



Detalle de los frutos desarrollados en los racimos florales en las plantas de jitomate a los 95 días después de la siembra.



Aspecto de las plantas de jitomate a los 95 días después de la siembra.

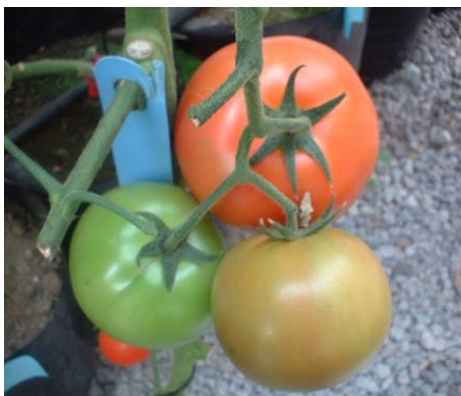




Aspecto de las plantas de jitomate a los 122 días después de la siembra (primer corte).



Registro del tamaño (a) y peso (b) de los frutos de jitomate.



Aspecto de los diferentes estados de maduración de los frutos de jitomate en un mismo racimo floral (verde, tuning, rojo).



Aspecto de frutos maduros de jitomate desarrollados en un mismo racimo floral, listos para su cosecha.