



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**Respuesta de co-inoculación *Azospirillum lipoferum* (AZm5) y hongos micorrizicos arbusculares en plántulas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) con deficiencia de nutrientes**

**Tesis**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**Selene López Gómez**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Rosa María Ramírez Gama

VOCAL: Profesor: María Elsa Escudero García

SECRETARIO: Profesor: Rosalba Esquivel Cote

1er. SUPLENTE: Profesor: María del Carmen Urzúa Hernández

2º SUPLENTE: Profesor: Atziri Corona Romero

FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

ASESOR DEL TEMA: ROSALBA ESQUIVEL COTE

SUSTENTANTE: SELENE LÓPEZ GÓMEZ

## Dedicatoria

A Dios por permitirme llegar a este momento de mi vida escolar y disfrutarla; porque durante este trayecto me ha rodeado de salud y de personas maravillosas

A mi mamá, por darme la vida y todo su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por cuidarme y amarme.

A mi papá, por todos los momentos, por todo lo que nos das en todos aspectos; por cuidarnos y procurarnos: gracias; te quiero muchote

A mi herma, te quiero muchisísimo, no sé que sería esta vida sin ti; gracias por ir caminando junto conmigo en este largo y divertido camino, siempre juntas!!

A Edi por estar en mi vida y en mi corazón, te amo con toda mi alma, y doy gracias de coincidir y compartirlo todo contigo.

A Alan porque llegaste a revolucionar mi alma y mi vida entera, eres el regalo más precioso que la vida me ha dado, te amo profundamente.

A mi padrino y mi abuelita Mari porque sé que ellos siempre van junto a mí y por el día que nos volveremos a encontrar.

A mis tíos y tías porque sin su cariño y apoyo no seríamos la grandiosa familia a la cual me siento muy orgullosa de pertenecer.

A mis prim@s por darme grandes anécdotas y aventuras que alimentan mi alma.

Bely, Lili, Richaud, Amigocha, porque al paso de los muchos años seguimos juntas son más que mis confidentes y cómplices, gracias, las quiero mucho.

Brujis, tantos años juntas y el lazo tan entrañable que se formó entre nosotras soy afortunada de que seas mi hermana.

Rosalba Esquivel por ser una excelente persona, amiga, maestra y madre; desde que nos encontramos tú has sido de vital importancia en mi vida y la de mi familia en todos los aspectos

Brunis, Gabacha, Mari, Taniux, Rubí, Carolina por ser amigas del alma en las excelentes, las buenas, las malas y en las peores.

Román, gracias porque más que un padre eres como el ángel guardián, siempre apareces cuando sin saber mas lo he necesitado.

A Chelito luna y su esposo así como a la Sra. Dolores Tovar por el apoyo a amor que nos dan a mí y a mi familia.

Caro, Dani, Blanca por la amistad sincera las quiero; la Daniela, Chieko, Gi, Xoch Nidian, Zoi, Paty, Mozo, Ale Saavedra, Joel, Sergio, Normita y tantos amigos que gracias a cada uno de ustedes aún cuando no vean su nombre aquí porque cada uno he sido y seguirá siendo mi amigo a pesar de la distancia.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por acogerme durante mi vida escolar, por la formación académica otorgada, por las experiencias adquiridas para mi desarrollo profesional y personal; por el orgullo de pertenecer a esta gran institución.

Al colegio de profesores y la Sección 024 del AAPAUNAM, por haber designado a este trabajo ganador de la Cátedra Fernando Orozco Díaz en el año 2008, y gracias a su apoyo fue posible la realización e impresión de esta tesis.

A la M. en C. Rosa María Ramírez Gama jefa del Laboratorio de Microbiología Experimental, de la Facultad de Química (UNAM), por la oportunidad de la realización del desarrollo de este trabajo.

A la M. en C. Rosalba Esquivel Cote por su atención, confianza, paciencia y enseñanza, y por ser más que una asesora, ser una gran amiga y compañera de vida.

A la M en C. Ma. Guadalupe Tsuzuki Reyes, técnico del Laboratorio de Microbiología Experimental, de la Facultad de Química (UNAM), por su apoyo, enseñanza y confianza.

A Mi tía Ma. Roció Gómez por la "beca" otorgada en esta tesis.

A Felix López Salinas por el apoyo en todo el "material" para este trabajo

Al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato por la donación del inóculo de hongos micorrízicos arbusculares (Zac 19), utilizado en este trabajo.

A los profesores de la Facultad de Química que a lo largo de mi enseñanza han transmitido sus conocimientos para mi formación académica.

## INDICE

I. Introducción	1
II Objetivos e Hipótesis	5
III. Marco teórico	6
3.1. El jitomate ( <i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.)	6
3.1.1 Aspectos generales	6
3.1.2 Aspectos a considerar para su cultivo	7
3.1.3 Características externas del fruto para ser consumido	11
3.1.4 Composición nutrimental del fruto	12
3.1.5 Producción del jitomate a nivel mundial	14
3.1.6 Importancia económica del jitomate en México	14
3.1.7 Problemática del cultivo de jitomate en México	15
3.2. Bacterias del genero <i>Azospirillum</i> sp.	17
3.2.1 Bacterias Promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)	17
3.2.2 Características generales de <i>Azospirillum</i>	19
3.2.3 Asociación planta <i>Azospirillum</i>	22
3.2.4 Mecanismos de acción que promueven el crecimiento vegetal	23
3.3. La enzima ACC desaminasa	24
3.3.1 Importancia del etileno en plantas	25
3.3.2 Bacterias que sintetizan la enzima ACC desaminasa	27
3.4. Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)	28
3.4.1 .Características generales	28
3.4.2 Asociación planta –HMA	29
3.4.3 Beneficios de la simbiosis micorrizica para la planta	31

3.4.4 Beneficios de la simbiosis micorrizica para el agricultor	32
3.5 Interacción de <i>Aspospirillum</i> y HMA	33
IV. Material y Métodos	35
4.1 Obtención de Inocúlos	35
4.2 Desinfección, inoculación y siembra de semillas	36
4.3 Labores del invernadero	37
4.4 Registro de variables de respuesta	39
V. Resultados y Discusión	42
5.1. Control de calidad del Inoculante bacteriano	42
5.2. Registro de variables de respuesta	42
5.2.1 Altura de la parte aérea	42
5.2.2 Evaluación del peso seco de parte aérea y peso fresco de raíz	45
5.2.3 Determinación de Nitrógeno y Fosforo en parte aérea	46
5.2.4 Colonización microbiana ( <i>Azospirillum lipoferum</i> y hongo micorrizico arbuscular Zac 19) en raíces	47
VI. Conclusiones	53
VII. Recomendaciones	54
VIII. Literatura Citada	55
Anexo 1. Medios de cultivo	68
Anexo 2. Análisis estadístico	69

## I. INTRODUCCION

El jitomate es uno de los productos hortícola más importantes en México. Lo anterior debido al gran consumo de productos procesados a partir de él (Bautista, 2001). Durante el periodo de enero a junio de 2010, México exportó 1,180 mil toneladas de jitomate en comparación al mismo periodo en el año anterior, donde se registró un volumen de 794 mil toneladas (SAGARPA, 2010). Por su alto valor comercial, el jitomate ha representado tradicionalmente un ingreso de divisas muy importante para nuestro país.

Uno de los principales problemas que este cultivo enfrenta es el uso excesivo de algunos agroquímicos para favorecer el crecimiento de las plantas, como ocurre con los fertilizantes nitrogenados, los cuales son considerados como contaminantes frecuentes del suelo y del agua (Medina-Morales y Cano-Ríos, 2001). Como alternativa ante esta problemática se ha recurrido al uso de biofertilizantes, inoculantes elaborados a base de microorganismos promotores del crecimiento vegetal combinados con elementos minerales y sustancias orgánicas en un soporte, que son aplicados al suelo o a las semillas para favorecer el crecimiento vegetal y la producción agrícola (Döbbelaere et al., 2001).

Algunos estudios, reportan que el uso de los biofertilizantes ha llegado a sustituir hasta un 50% de los fertilizantes químicos nitrogenados aplicados a los cultivos como en trigo, lenteja, maíz, garbanzo (Peralta, 2009).

Se ha reportado que en cultivos de jitomate inoculados con cepas de *Azospirillum lipoferum*, en condiciones de invernadero, la fertilización nitrogenada se redujo en un 50% de la dosis completa (Esquivel-Cote et al., 2004).

Dentro de los microorganismos más estudiados y empleados para la elaboración de los biofertilizantes se encuentran las rizobacterias (bacterias de la rizosfera) y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) o micorrizas. Los géneros de rizobacterias más importantes caracterizados como promotoras del crecimiento vegetal son, entre otros: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Bashan 1998; Nelson 2004), y de los géneros de HMA: *Endogone*, *Gigaspora* y *Glomus* (Frey-Klett et al., 2007).

Las bacterias del género *Azospirillum* promueven el crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos, tales como la fijación de nitrógeno, la producción de enzimas y principalmente la producción de fitohormonas (Caballero-Mellado, 2005). Los HMA ayudan a mejorar el crecimiento de la planta mediante el incremento en la absorción de los elementos minerales a través de la elongación de raíces y a proveer mayor resistencia ante enfermedades de la planta basada en el antagonismo entre microorganismos (Blanco y Salas, 2004). Tanto *Azospirillum* como los HMA han sido empleados con mucho éxito como biofertilizantes en el cultivo de varias especies vegetales como lechuga, yuca dulce, kiwi, naranja y cebolla (Pulido et al., 2003). Ambos microorganismos ayudan a la conservación y establecimientos de los sistemas agrícolas sostenibles (Peralta, 2009).

Respecto a los mecanismos empleados por las rizobacterias para promover el crecimiento vegetal, actualmente se ha propuesto un mecanismo mediante el cual las plantas disminuyen la producción de etileno, una fitohormona que se produce de forma natural y que en condiciones de estrés ambiental, tales como la sequía, la inundación, el frío o la falta de elementos nutritivos (N, P, Ca), provoca el marchitamiento y muerte de las plantas (Abeles et al., 1992). El mecanismo es llevado a cabo por la enzima que desamina el ácido 1-amino-ciclopropano carboxílico (ACC), precursor inmediato del etileno, también llamada ACC desaminasa (Glick et al., 1998).

La presencia de dicha enzima se ha reportado en un gran número de bacterias y hongos, y hasta antes de 2006 se creía que bacterias del género *Azospirillum* no la producían (Kende, 1993; Holguin y Glick, 2001). Sin embargo, en estudios recientes, se detectó la actividad de la enzima ACC desaminasa en la cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum* (Esquivel-Cote, 2002; Camarillo, 2006; Esquivel-Cote et al., 2010), cepa que pertenece a la colección del Laboratorio de Microbiología Experimental (LME) de la Facultad de Química, UNAM.

Respecto a lo anterior, se ha reportado que la inoculación de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) con la bacteria *Pseudomonas putida* (UW4) productora de la enzima ACC desaminasa y del HMA *Gigaspora rosea* (BEG9) incrementa el crecimiento vegetal en condiciones de estrés salino (Gamalero et al., 2010).

Por otro lado, en investigaciones realizadas en el LME acerca de la biofertilización con *Azospirillum* y HMA, se ha demostrado que la co-inoculación de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) con cepas de *Azospirillum brasilense* (VS9) y el consorcio micorrízico Zac 19 (*G. claroideum*, *G. diaphanum*, *G. albidum*, Chamizo et al., 1998), aumenta la altura, el número de hojas, el diámetro de tallo, el peso fresco y seco de parte aérea, el peso fresco de raíz, el contenido de nitrógeno y de fósforo, y acelera la aparición de racimos florales, en un cultivo hidropónico (González-Salmonán, 2001). No obstante, no se ha evaluado el efecto de la co-inoculación *Azospirillum*-HMA en el crecimiento vegetal de plantas de jitomate fertilizadas con dosis reducidas en nitrógeno y fósforo.

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la co-inoculación de plantas de jitomate (Var. ACEVF 55) con la cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum* productora de la enzima ACC desaminasa y con el inóculo micorrízico Zac 19, en un cultivo fertilizado con dosis bajas de nitrógeno y fósforo, respecto a la dosis recomendada para el cultivo de jitomate bola.

## II. OBJETIVOS

- 1) Evaluar la capacidad colonizadora de la cepa AZm5 (*Azospirillum lipoferum*) y del Hongo Micorrízico Arbuscular Zac 19, en raíces de jitomate bola (Var. ACE VF 55).
- 2) Evaluar el efecto de la cepa AZm5 (*Azospirillum lipoferum*) en el crecimiento de plántulas de jitomate bola (Var. ACE VF 55) fertilizadas con dosis bajas de nitrógeno y fósforo.
- 3) Evaluar la eficiencia de plántulas de jitomate bola (Var. ACE VF 55) co-inoculadas con *Azospirillum* y Hongos Micorrízicos Arbusculares para absorber nitrógeno y fósforo del sustrato y para producir biomasa vegetal.
- 4) Determinar la eficacia de la co-inoculación de plántulas de jitomate bola (Var. ACE VF 55) con *Azospirillum* y Hongos Micorrízicos Arbusculares para ser empleadas como biofertilizante.

## HIPÓTESIS

La cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum* con capacidad para sintetizar la ACC desaminasa y del HMA Zac 19, promoverán el crecimiento de plántulas de jitomate en la etapa vegetativa y estimularan la absorción de nitrógeno y fósforo del suelo, en cultivo hidropónico fertilizado con dosis mínimas de fertilizante nitrogenado y fosfatado.

### III. MARCO TEORICO

#### 3.1 El jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

##### 3.1.1 Aspectos generales:

Origen: El jitomate es originario de América del Sur, de la región andina, particularmente de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. Sin embargo, su domesticación fue llevada a cabo en México. El nombre de jitomate procede del náhuatl *xictli*, ombligo y *tomatl*, tomate, que significa tomate de ombligo (Financiera rural, 2009).

Planta: El tomate rojo o jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas, de crecimiento determinado, tipo arbustivo puede desarrollarse de forma rastrera, semirecta o erecta y el crecimiento está limitado por la variedad; cultivo de tipo anual, se caracteriza por la formación de inflorescencias o ramas abortivas en el extremo del ápice y crece hasta alturas de 2 m o más (**Figura 1**). Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) e ilimitado (indeterminadas) (Chamarro, 1995).

Fruto: El fruto es una baya ovalada, redonda o periforme. Su tamaño va desde pequeños frutos como el de una cereza, hasta frutos enormes de hasta 750 gramos.

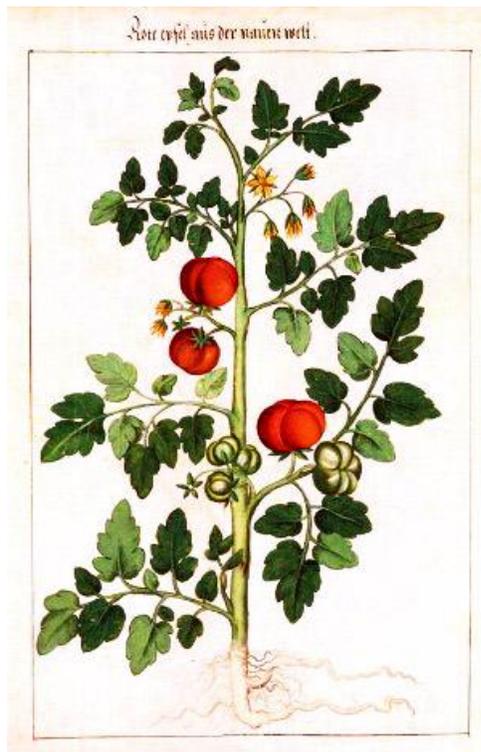


Figura 1. Planta de tomate rojo (Tomada de Canada, 2008)

### 3.1.2 Aspectos a considerar para su cultivo

En nuestro país existen dos sistemas principales para el cultivo, por siembra directa y por almacigo (SIEA, 2002):

- El método de siembra directa, se basa en colocar las semillas directamente en el suelo del campo de siembra, en horadaciones hechas a mano o con maquinaria, donde previamente el suelo es fertilizado y regado para el cultivo.
- El método de almacigo, consiste en sembrar las semillas en charolas de germinación con suelo u otro tipo de soporte como turba (peat moss),

agrolita o vermiculita. Una vez obtenidas las plántulas, se transplantan al lugar en el que crecerán hasta su madurez y producción, ya sea en macetas, en camas en campo o invernadero.

**Luz y temperatura:** Requiere de clima templado-cálido. Su temperatura óptima es de 20<sup>o</sup>-24<sup>o</sup> C. Son auténticas plantas heliófilas y por tanto, necesitan de mucho sol. No soportan el frío y las plantas mueren con las heladas. En las regiones frescas hay que elegir un lugar soleado y cálido (Infoacerca, 2008).

**Humedad:** En el cultivo de jitomate las humedades relativas del aire inferiores al 90% son deseables, pues valores superiores favorecen el desarrollo de enfermedades (Castilla, 1995).

**Suelo:** El jitomate crece mejor en suelos sueltos y profundos, aunque no es necesario siempre y cuando estén bien drenados. La preparación del terreno debe facilitar una buena infiltración de agua y una buena aireación que permita un desarrollo reticular adecuado en extensión y profundidad. Aunque prefiere suelos con textura areno-arcillosos ricos en materia orgánica; se recomienda hacer un análisis previo del suelo (Castilla, 1995).

**pH:** El pH del suelo requerido para una óptima producción del jitomate debe estar entre 6.0 y 6.5, niveles diferentes a los anteriores se obstaculizar la absorción de algunos nutrimentos, los niveles debajo de este rango permiten la absorción excesiva de algunos nutrimentos, que conducen a niveles tóxicos (Infoacerca, 2008).

**Fertilización:** La dosis de fertilizante empleada para el cultivo del jitomate depende de la zona geográfica donde se cultive, ya que en la República Mexicana existe una enorme variación en las cantidades recomendadas; por ejemplo, respecto a las dosis de fertilizante nitrogenado: en plantaciones de Culiacán se utilizan cerca de 450 kg/ha, mientras que en la región de Ensenada, las aplicaciones van en orden de los 300 kg/ha, en San Luis Potosí de 180 kg/ha y en el estado de Morelos de 150 kg/ha, por tanto las dosis que se emplean fluctúan entre estos valores. La primera aplicación incluye una tercera parte del nitrógeno junto con todo el fósforo y el potasio. El nitrógeno restante es fraccionado durante la época de desarrollo hasta que la planta forme frutos. Las aplicaciones se realizan a intervalos de 3-4 semanas (Castilla, 1995).

Es importante mencionar que el uso excesivo de fertilizante nitrogenado deriva en la pérdida del mismo, ya que al disolverse en el agua de riego se pierde por lixiviación.

**Fósforo (P):** El ácido fosfórico es uno de los elementos fertilizantes más importantes para el agricultor. Como el nitrógeno, el ácido fosfórico es un factor de crecimiento muy importante, sobre todo durante la primera fase del crecimiento. El desarrollo radicular, en particular, se ve favorecido por una buena alimentación de fósforo al principio del ciclo vegetativo. En suelos pobres se recomienda una dosis de 150-400 kg/ha  $P_2O_5$ , toda la cantidad es aplicada con la primera fertilización del nitrógeno; el nivel de P debe ser cuidadosamente monitoreado de manera periódica (IPNI, 2010).

Potasio (K): En las regiones del noroeste del país se utilizan 200-225 kg/ha de  $K_2O$ , en el resto de las zonas se aplican 80 kg/ha, aplicados en una sola ocasión junto con el fósforo y la tercera parte del nitrógeno (Faxsa, 2010).

**Cultivo hidropónico:** El jitomate también se cultiva en hidroponía; en este tipo de cultivos, las plantas crecen en el agua o en diferentes tipos de sustratos inertes que no aportan ningún tipo de nutrimento, por ejemplo, agrolita, tezontle, turba, vermiculita. El cultivo en hidropónia previene la erosión del suelo, así como la deforestación y destrucción de ecosistemas; además permite incorporar el cultivo en diferentes regiones del país, que abarcan desde terrenos poco fértiles o muy pequeños.

En un cultivo hidropónico se recomienda, el uso de solución nutritiva que es una mezcla de agua y sales minerales (fertilizantes) necesarias para nutrición vegetal. Se prepara tomando en cuenta los requerimientos de la planta y se diseña de acuerdo a cualquiera de los 18 nutrimentos esenciales que la planta necesita para desarrollarse correctamente. Es muy importante controlar el pH de la solución nutritiva para facilitar que las plantas puedan tomar los nutrimentos esenciales del sustrato (Infoacerca, 2008).

Para el cultivo de jitomate, generalmente se recomienda que la solución nutritiva contenga como fuente de nitrógeno el nitrato de amonio o fosfo-nitrato (33.5% de nitrógeno) y como fuente de fósforo, el ácido fosfórico al 85% (Infoacerca, 2008).

**Ferti-irrigación:** Con la ferti-irrigación (combinación de agua de riego con fertilizantes) la solución nutritiva se aplica directamente en las raíces de los cultivos. Consecuentemente no hay desperdicio como cuando se aplica el fertilizante al suelo y se riega por gravedad. La ferti-irrigación permite aplicar el fertilizante durante todo el ciclo de los cultivos y de acuerdo a sus necesidades de nutrición (Martínez, 2005).

### **3.1.3 Características externas del fruto para ser consumido**

Las características externas o la calidad visual del fruto, se basan en la forma, apariencia y ausencia de defectos de crecimiento y manejo. El tamaño no es factor que defina el grado de calidad, pero influye en las expectativas de calidad comercial. Según Artes y col. (1999) y Trevor y col. (2006), algunas de las características que se buscan al adquirir el fruto dependiendo de la variedad son:

-Forma: redondo, globoso aplanado u ovalado.

-Color: uniforme de rojo a anaranjado

-Apariencia: lisa y con cicatrices de la punta floral y del pedúnculo, con ausencia de grietas de crecimiento, quemaduras de sol, daños de insectos y/o mecánicos (magulladuras).

-Firmeza: al tacto no debe ser muy suave ni deformarse fácilmente.

### 3.1.4 Composición nutrimental del fruto

La composición nutrimental del fruto de jitomate se menciona en el **Cuadro 1**, la cual depende de factores como la variedad, grado de madurez y condiciones ambientales de cultivo durante la época de crecimiento y producción. La calidad exterior, su valor nutritivo y sabor dependerá de sus componentes químicos (Aguayo y Artes, 2004).

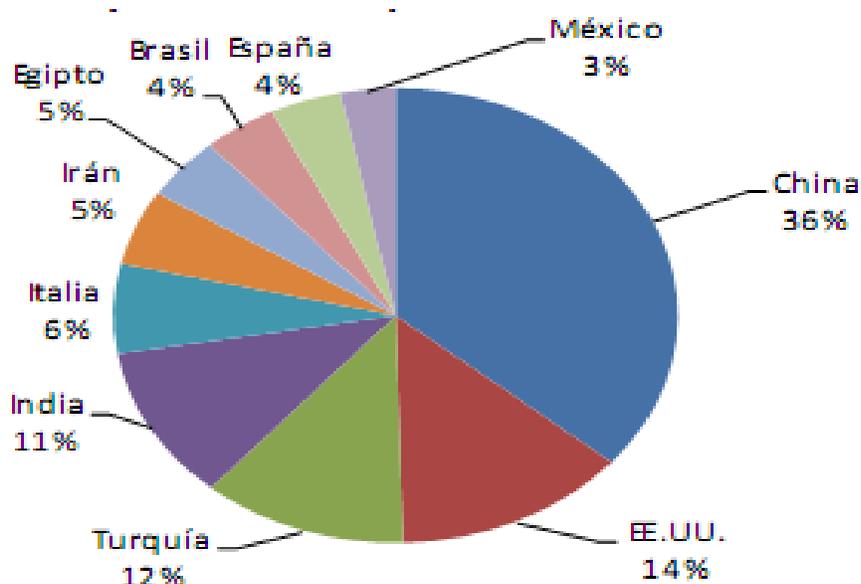
El color es tal vez el índice más fiable e importante en la madurez del jitomate (Campos et al., 1997). Las clorofilas a y b son los principales pigmentos predominantes en el fruto hasta el estado verde maduro, el típico color rojo de los jitomates maduros se debe al licopeno (Nguyen y Schwart, 1999; Fernández et al., 2007). En el fruto verde maduro contiene solo alfa y beta carotenos (Meredith y Purcell, 1996).

**Cuadro 1. Composición nutrimental de frutos de jitomate (Tomado de Faxsa, 2010)**

<b>Nutrimento</b>	<b>Valor nutricional medio por cada 100 g</b>
Agua	94.5 g
Proteínas	0.9 g
Glúcidos	2.8 g
Lípidos	0.2 g
Provitamina A	0.38 mg
Vitamina B1	0.06 mg
Vitamina B2	0.04 mg
Vitamina B6	0.11 mg
Vitamina C	15 mg
Hierro	0.4 mg
Calcio	10 mg
Magnesio	10 mg
Fósforo	24 mg
Potasio	280 mg
Sodio	1.2 mg

### 3.1.5 Producción del jitomate a nivel mundial

De acuerdo a las estadísticas de Agricultura de la FAO del 2008, los países que producen y exportan más jitomate son: China, participa con un 36% de la producción total mundial, Estados Unidos con 14%; Turquía, 12%; India, 11%; México, con 3% (**Figura 2**).



**Figura 2.** Producción mundial de jitomate en el año 2008 (10<sup>6</sup> toneladas métricas) (FAO, 2008).

### 3.1.6 Importancia económica del jitomate en México

La exportación de jitomate representa para nuestro país una importante fuente de divisas al ser ubicado como el décimo lugar a nivel mundial. La mayoría de las exportaciones tienen como destino los Estados Unidos de América.

Si se considera que la mitad de la producción mundial de hortalizas, la constituyen la papa y el jitomate conjuntamente (SAGARPA 2005), podemos saber la importancia que para la seguridad alimentaria de cualquier país en el mundo tienen estos cultivos. En el año 2010 el promedio de la producción de jitomate registrada fue de 832,751 toneladas por año. Además, este cultivo representa una fuente de empleos y de generación de divisas (Banco de México, 2006). Aproximadamente el 10% del producto se exporta y el resto es consumido por los mexicanos, quienes lo han integrado a su dieta alimentaría en forma abundante (SAGARPA, 2005).

Durante 2008, se produjeron en todo México 2.26 millones de toneladas de jitomate, siendo el principal productor el estado de Sinaloa, cuya producción representó el 35% del total nacional, 3.8 veces mayor al producido por el segundo lugar: Baja California, con 9%. Siguen en la lista los estados de Michoacán, San Luis Potosí y Jalisco con 8%, 6% y 5%, respectivamente (SAGARPA, 2010). Con base en lo anterior, México debe continuar exportando este producto, e incluso incrementar los volúmenes y mejorar sus técnicas de producción.

### **3.1.7 Problemática del cultivo de jitomate en México**

Uno de los problemas que el cultivo de jitomate presenta, tanto en México como en muchos países del mundo, es el uso excesivo de agroquímicos que se aplican para incrementar su producción (Xoconostle y Medrano, 2002).

En México, el deterioro ecológico causado por la agricultura tiene diversas causas, dentro de las cuales están: el manejo inadecuado de los recursos naturales, uso intenso de agroquímicos, prácticas agrícolas mal empleadas y fuerte dependencia de insumos externos (fertilizantes) (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2001). Por lo tanto, es necesario implementar técnicas de producción enfocadas al uso eficiente de los recursos que tiendan hacia la agricultura sostenible.

Existe la propuesta de relacionar la diversidad microbiana edáfica con la agricultura y la biotecnología sostenibles, esto es, un buen manejo integrado de un cultivo que contemple: el uso de prácticas adecuadas de manejo del suelo, la selección de la planta, las características del suelo y las demandas de agua y nutrientes.

La biotecnología sostenible debería ser una biotecnología ecológica que considerara caracterizar extensivamente la microbiota presente en suelos agrícolas, ya que estos inciden, favorablemente en el crecimiento de la planta y la protección contra parásitos y enfermedades (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2001; Xoconostle y Medrano, 2002).

En este sentido, se ha empleado la inoculación de plantas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) y hongos micorrízicos arbusculares (HMA), los cuales promueven una mejor absorción de minerales y favorecen el incremento de biomasa durante diferentes etapas del desarrollo de las plantas.

Estos microorganismos son usados para la elaboración de biofertilizantes, abonos elaborados a base de elementos minerales, sustancias orgánicas y microorganismos (Portugal y Aguilera, 1998). Esto ha sido una alternativa viable en la producción agrícola sostenible (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2001; Peralta, 2009).

### **3.2 Bacterias del género *Azospirillum* sp.**

#### **3.2.1 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)**

La mayoría de los microorganismos que se encuentran en el suelo están en la rizosfera (región del suelo alrededor de la raíz de la planta), una característica de esta zona es que existe la presencia de muchas sustancias orgánicas como los aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos, enzimas, ácidos nucleicos, que estimulan el crecimiento. En la rizosfera se establecen asociaciones entre plantas y microorganismos, en las que el efecto puede ser benéfico o perjudicial para las plantas (Lynch, 1990). Las rizobacterias capaces de estimular el crecimiento y rendimiento de numerosas especies de plantas, de interés agrícola y ecológico, son consideradas PGPR (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Bashan et al., 2004). Las PGPR de vida libre, según Jiménez y colaboradores (2001) se caracterizan porque:

- No invaden internamente los tejidos de las plantas, como ocurre con los hongos micorrízicos, formando arbusculos.

- Colonizan eficientemente la superficie de la raíz influyendo en el crecimiento de manera positiva de la planta.
- Presentan una capacidad competitiva elevada, asegurando su establecimiento en la rizosfera después de la inoculación.
- No dañan al hombre ni a otros organismos.

Las PGPR favorecen el crecimiento de las plantas de forma directa e indirecta. La forma directa repercute en la nutrición y crecimiento de la planta, por ejemplo: la fijación de nitrógeno, la síntesis de sideróforos, la solubilización de minerales principalmente del fósforo, la producción de fitohormonas y la síntesis de enzimas que modulan el crecimiento o reducen los niveles de etileno en la planta como el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa (Ghosh et al., 2003).

En la forma indirecta las PGPR suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, mediante la producción de antibióticos, de metabolitos antagónicos, de sideroforos, a través de la acción de enzimas líticas (glucanasas, quitinasas) e inducción de mecanismos de resistencia (Penrose y Glick, 2003).

Uno de los géneros bacterianos mejor caracterizados como PGPR es *Azospirillum* (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Bashan et al., 2004).

### 3.2.2 Características generales de *Azospirillum*

En 1925 Beijerinck descubrió la bacteria *Spirillum lipoferum*, caracterizada como una bacteria fijadora de nitrógeno de vida libre (Becking, 1982). Fue en 1973 que se inició el estudio intensivo de esta bacteria por la Dra. Döbereiner y posteriormente se reclasificó en un nuevo género: *Azospirillum* (Tarrand et al., 1978).

El género *Azospirillum* pertenece al Phylum Proteobacteria, Clase alfaproteobacteria, Orden Rhodospirillales y Familia Rhodospirillaceae, siendo *A. lipoferum* la especie tipo (Tarrand et al., 1978). Las bacterias del género *Azospirillum* se caracterizan microscópicamente por ser vibroides o bacilos curvos, miden de 0.9-1.2  $\mu\text{m}$  de largo; son Gram negativas (**Figura 3**); presentan movimiento helicoidal o vibratorio en medio líquido, debido a su flagelo polar.

Para su cultivo en laboratorio, necesita una temperatura de 34 a 37°C para su óptimo desarrollo, a un pH de 6.8-7.0, en medio de cultivo Agar Nutritivo las colonias típicas presentan un color rosado, con bordes crenados o dentados, de aspecto seco (**Figura 4**). Es un microorganismo quimiorganotrófico; algunas cepas son autótrofas facultativas (Tarrand et al., 1978).

Aún cuando las especies de *Azospirillum* difieren en su capacidad para utilizar diferentes compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno, estas bacterias usan mono y disacáridos así como alcoholes polihidroxilados, y principalmente diversos ácidos orgánicos tales como málico y succínico; y algunos aminoácidos (Domínguez, 2006).



**Figura 3. Morfología microscópica de *Azospirillum* vista con tinción Gram. Foto de Dra. Ma. del Carmen Urzúa Hernández.**



**Figura 4. Colonia de *Azospirillum* en Agar Nutritivo. Foto de Dra. Ma. del Carmen Urzúa Hernández.**

Actualmente se conocen 16 especies incluidas en el género *Azospirillum*, incluyendo las dos especies originales, *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Tarrand et al., 1978). Las restantes han sido descritas en los últimos 25 años: *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. zae* (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), *Azospirillum formosense* sp. (Lyn et al., 2011).

*Azospirillum* se encuentra en el suelo, viviendo de forma libre y asociada a las raíces de una gran variedad de plantas. Las bacterias de este género se caracterizan por: carecer de efecto fitopatológico, fijar nitrógeno atmosférico, producir fitohormonas, sideroforos y bacteiocinas; colonizar la rizosfera y la superficie e interior de las raíces de diversos vegetales, producir señales moleculares que activan diferentes funciones de las plantas, su actividad quimiotáctica elevada y su respuesta aereotáctica (Jain y Patriquin, 1985. Fallik et al., 1989. Tien et al., 1979).

*A. brasilense* se multiplica preferentemente a concentraciones baja de oxígeno ya que esta bacteria fija el nitrógeno con la enzima nitrogenasa en condiciones de microaerofilia , se propone que la respuesta quimio y aerotáctica contribuyen al proceso de colonización y asociación con las raíces de las plantas, sin embargo la colonización de la rizosfera y de la superficie e interior de la raíz será determinada por las sustancias secretadas dando selectividad a la especie o cepa (Tarrand et al., 1978).

La producción de sideróforos (agentes quelantes del hierro) por algunas cepas de *A. brasilense* da una ventaja competitiva a la cepa, siendo de vital importancia para ayudarla a adaptarse al medio ambiente. Asimismo la producción de bacteriocinas (sustancias proteicas y antigénicas elaboradas por ciertas cepas capaces de lisar otras cepas no virulentas) por algunas cepas como *A. brasilense* y *A. lipoferum*, debido al efecto antagónico que estos compuestos ejercen contra otros miembros de la comunidad microbiana, incluyendo a microorganismos

fitopatógenos que sean sensibles a estas biomoléculas (Bashan y Carrillo, 1996; Caballero-Mellado, 2005).

Las fitohormonas que principalmente produce *Azospirillum* son las auxinas, de las cuales se han identificado: el ácido indol acético, ácido indol piruvico, indol láctico, indol acetamida, indol acetaldehído, indol etanol e indol metanol, triptamina, antranilato y otros compuestos indolicos. De estos compuestos el más estudiado es el ácido indol acético (AIA) ya que induce la aparición temprana de pelos radicales así como un incremento de la longitud de las raíces y el contenido de fitohormonas de las plantas estimulando el crecimiento de las mismas (Aguilar-Piedras et al., 2008). También, se han identificado giberelinas y citocininas, ésta última en *A. brasilense* (Cassán et al., 2008).

### **3.2.3 Asociación planta-*Azospirillum***

La asociación de *Azospirillum* con las raíces de las plantas se desarrolla en dos etapas completamente independientes. La primera consiste en una adsorción rápida, débil y reversible, la cual es dependiente de proteínas de la superficie bacteriana del tipo de las adhesinas en conjunto con la participación del flagelo polar (Caballero-Mellado, 2005). La segunda fase consiste de un anclaje lento pero firme e irreversible que alcanza su máximo nivel 16 horas después de la inoculación, la cual parece ser dependiente de un polisacárido extracelular de *Azospirillum*. Se ha reportado la aparición de material fibrilar que constituye el

anclaje de *Azospirillum* a las raíces de diversas plantas (Zaady y Okon, 1990; Michiels et al., 1991).

La inoculación de diversas plantas con *Azospirillum* ha mostrado que los principales sitios de colonización son las áreas de elongación celular y las bases de los pelos radicales. Sólo algunas células de *Azospirillum* llegan a adherirse a la cofia o a los pelos radicales (Micheil et al., 1991).

#### **3.2.4 Mecanismos de acción que promueven el crecimiento vegetal**

El mecanismo de acción que emplea *Azospirillum* para promover el desarrollo vegetal aún está en discusión; sin embargo se ha reportado que se atribuye a la fijación de nitrógeno, y principalmente a la producción de fitohormonas, tales como:

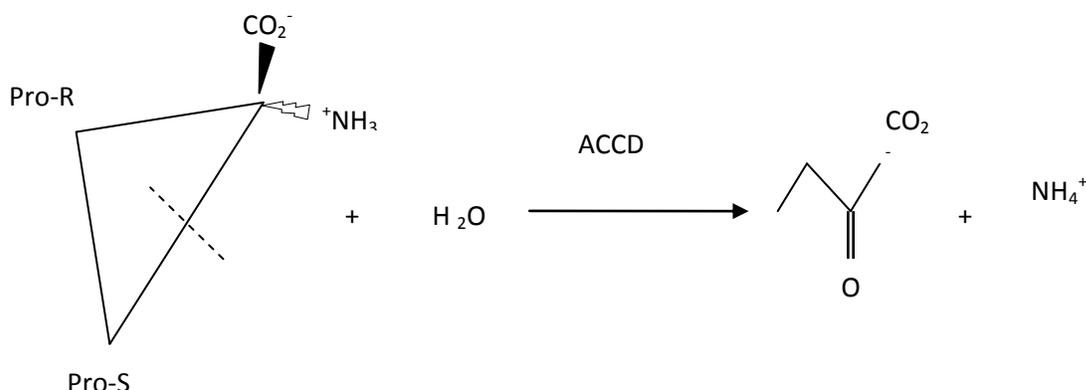
- a) Auxinas: las cuales estimulan el crecimiento de la radícula y raíces adventicias, previene la caída de flores y frutos, además de retrasar la senescencia y el tropismo (Bartel, 1997; Patten y Glick, 1996).
- b) Gliberelinas: que ocasionan la estimulación del crecimiento del tallo, activan la germinación, la inducción de brotes (yemas) y el incremento del desarrollo de los frutos (Rademacher, 1994).
- c) Citocininas: que estimula la división celular, retraso en el envejecimiento de los órganos vegetales, promueve la organogénesis en los callos celulares, el desarrollo de los cloroplastos, entre otros (Rojas y Ramírez, 1993).

La inoculación de plantas con *Azospirillum* promueve tanto el desarrollo radicular como la absorción de agua y minerales, que eventualmente, se traduce en muchos casos la productividad de la planta (Bashan et al., 2004).

En muchos países desarrollados y subdesarrollados se ha empleado a *Azospirillum* como el inoculante de elección en muchos tipos de cultivos agrícolas como en cebolla, maíz, sorgo (Bashan et al., 2004). Dicho inoculo se aplica solo o en combinación con otros microorganismos, como PGPR (por ejemplo *Rhizobium*) y hongos micorrízicos arbusculares (HMA),

### 3.3 La enzima ACC desaminasa

En 1998 se propuso que muchas PGPR pueden estimular el desarrollo vegetal a través del mecanismo de la enzima ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa. Esta enzima hidroliza el ACC, precursor inmediato del etileno, produciendo amonio y  $\alpha$ -cetobutirato (Glick et al., 1998; Collados, 2006) (**Figura 5**).



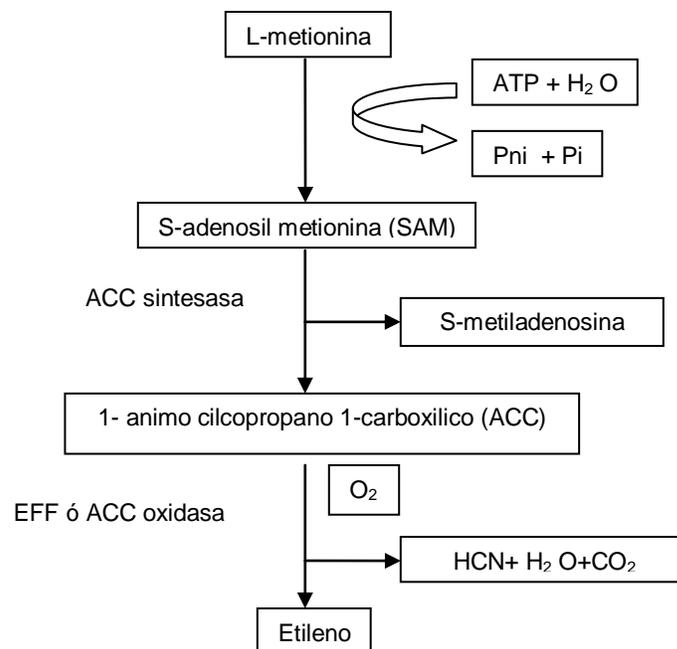
**Figura 5. Hidrólisis de la ácido 1 –amino-cicliopropano-1-carboxílico (ACC) mediante la intervención de la enzima ACC desaminasa (ACCD) (Hontzeas et al., 2004).**

### 3.3.1 Importancia del etileno en plantas

El etileno, es una de las fitohormonas de estructura más simple, al ser un hidrocarburo gaseoso, es muy diferente a otras hormonas vegetales naturales. Deriva de los C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> de la metionina, que pasa con gasto de ATP, a S-adenosilmetionina (SAM), por acción de una enzima se transforma en ACC y por oxidación de éste y por la ACC oxidasa se forma etileno (**Figura 6**).

Una característica de esta hormona es que posee acción autocatalítica, esto se debe a que la presencia de etileno activa la acción del gen que codifica la enzima que transforma ACC en etileno (Penrose y Glick, 2001). La aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa es una enzima que hidroliza el ACC el cual es el principal precursor inmediato de la biosíntesis de etileno en plantas (Collados, 2006).

El etileno inhibe la elongación de las raíces y posiblemente de la parte aérea, provocando así la disminución del desarrollo vegetal, efecto que se incrementa en condiciones de estrés ambiental (salinidad, anegamiento, presencia de metales pesados, etc.) (Traut e Iglesias, 2006).



**Figura 6. Biosíntesis de etileno en plantas**

### 3.3.2 Bacterias que sintetizan la enzima ACC desaminasa

Las bacterias del suelo que contienen a la enzima ACC desaminasa juegan un papel muy importante en el desarrollo de plantas expuestas al estrés ambiental: facilitan la absorción de nutrimentos y agua, incrementan la biomasa (peso seco de tejido vegetal) y el rendimiento de los cultivos (Belimov et al., 2002; Castro-Sowinski et al., 2007). Además, promueven el crecimiento vegetal, no sólo por la disminución en el contenido de etileno, sino también por la producción de amonio en la rizosfera a partir del ACC (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.

La enzima ACC desaminasa es codificada por el gen *acdS*, el cual actualmente, ha sido identificado en 36 géneros bacterianos (Esquivel-Cote et al., artículo en imprenta), entre los cuales se encuentra *Azospirillum lipoferum*. En el Laboratorio de Microbiología Experimental, en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, se cuenta con una colección de cepas de *A. lipoferum* capaces de sintetizar la enzima ACC desaminasa (Camarillo, 2006; Esquivel-Cote et al., 2010), entre las que destaca la cepa AZm5, la cual ha sido reportada como promotora del crecimiento de plantas de jitomate (Esquivel-Cote 2002).

### 3.4 Hongos Micorrízicos Arbusculares

#### 3.4.1 Características generales

El término micorriza (*Mykes*= Hongo y *Rhiza*= Raíz) fue utilizado por primera vez en 1885 por el fitopatólogo alemán A. B. Frank y se refiere a la asociación de hongos con árboles y desde entonces se han descubierto que la mayoría de las plantas superiores forman asociaciones simbióticas con estos hongos (Moncayo, 2005); y se define como una asociación de un grupo específico de hongos con las raíces de las plantas y cuya función repercute en beneficios nutrimentales y fisiológicos para ambos organismos; de esta forma se constituye una simbiosis mutualista entre ambos componentes (Alfonso y Galan, 2006).

Los hongos que forman las micorrizas arbusculares pertenecen principalmente a los géneros *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Sclerocystis* y *Scutellospora*; se caracterizan por la formación de hifas vesículas y arbusculos en el parénquima radical. El género *Glomus* puede formar vesículas intra o extraradicalmente (Sieverding, 1991).

El nombre arbuscular se deriva de la estructura principal de intercambio formada en la micorriza llama arbusculo, la cual se presenta en las células corticales de las raíces siendo esencial para el intercambio de nutrimentos. El HMA tiene componentes importantes en su estructura, las intraradicales como son: esporas, vesículas, micelio intramatricial, arbusculos; también el micelio extraradial y las esporas exteriores formadas en este (Segura, 2008).

Los HMA tienen como función principal incrementar la elongación de las raíces en el suelo, lo que provoca un proceso de absorción más eficiente, especialmente en ambientes desfavorables ya que presentan una mayor resistencia a la sequía, a altas temperaturas, a metales pesados, a la salinidad, a toxinas y a la acidez del suelo (Cuenca et al., 2007).

### 3.4.2 Asociación planta-HMA

**Precolonización y colonización primaria:** El proceso de simbiosis comienza con la germinación de las esporas de resistencia en el suelo, tras la emisión del tubo o tubos germinativos, el micelio del hongo crece hasta encontrar una raíz hospedera donde forma una estructura similar a un apresorio y penetra entre las células epidérmicas a través de los pelos radicales. Después comienza la colonización del tejido parénquimático de la raíz (Arroyo Ávila, 2006).

**Formación de arbuscúlos y vesículas:** En la capa interna del tejido se forman los arbuscúlos provenientes de una hifa produciéndose ramificaciones bifurcadas de diámetro menor a 1 micrómetro que penetran la membrana celular en una trama de invaginaciones de esta, provocando que los gránulos de almidón desaparezcan, el núcleo aumente su tamaño y aumente la cantidad de mitocondrias, retículo endoplasmático y proplastidos que viven de 4 a 15 días y se degeneran siendo digeridos por la célula del huésped (Guzmán y Ferrera, 1990).

Cuando los arbusculos aparecen, el micelio empieza a acumular reservas de carbono y lípidos, por lo tanto estas estructuras incrementan la actividad metabólica de la célula del huésped, la cual es principalmente por la transferencia bidireccional de metabolitos y nutrimentos desde y para el hongo (Arroyo-Ávila, 2006).

**Extensión del hongo en la raíz y la rizosfera:** Durante la extensión del hongo existen tres fases: 1) Fase inicial durante la cual se lleva a cabo la colonización primaria; 2) Fase exponencial en donde el hongo crece y se expande rápidamente en la raíz, desarrollándose tanto intra como extracelularmente especialmente en las raíces finas y 3) Fase de reposo donde la raíz y el hongo crecen a la misma velocidad (Genre et al., 2008).

**Extensión del hongo en el suelo:** Cuando la interacción interna está bien establecida, las hifas del hongo pueden crecer externamente desde la raíz de la planta hacia el suelo (micelio exterior: en este se llevan a cabo la absorción de nutrientes y desarrollo de estructuras reproductivas) y explorar un volumen del suelo inaccesibles a las raíces, con ello la planta aumenta considerablemente la superficie de absorción de 100 a 1000 veces (Gil,1995) y por tanto su capacidad de captación de nutrientes y de agua, permitiendo un mecanismo alterno para su nutrición.

Los HMA no producen cambios visibles en la morfología de la raíz de sus hospederos. Su presencia puede ser detectada mediante observaciones al microscopio óptico. Los HMA producen normalmente esporas a partir del micelio

externo y también en algunos casos, las forman en el interior de la raíz a partir del micelio externo. Las esporas de resistencia pueden permanecer inalteradas en el suelo por mucho tiempo, mientras que las hifas del hongo se colapsan tras una permanencia en el suelo de 2 a 4 semanas si no encuentra una raíz hospedera (Bolan y Aboott, 1983).

También el hongo al extender el área radical, facilita que la planta incremente su capacidad de sostenerse físicamente en el suelo, mejorando su resistencia y adaptabilidad, a cambio el hongo recibe hidratos de carbono que necesita para su alimentación provenientes de la fotosíntesis de la planta; así, se ven favorecidos el crecimiento y desarrollo de la planta y del hongo (Alarcón et al., 2002).

### **3.4.3 Beneficios de la simbiosis micorrízica para la planta**

Los beneficios que recibe la planta de la micorriza es que tiene una mejor asimilación de los nutrientes, mayor tolerancia a factores de estrés, mayor resistencia frente a microorganismos patógenos, mayor desarrollo vegetal, se presenta un incremento en los proceso de absorción y translocación de nutrientes como N, P, K, Ca, Mg, S, Zn, Cu entre otros (Cuenca y Caceres, 2007). Los beneficios que una planta recibe al establecer una asociación conjunta con hongos micorrízico arbusculares y bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico: incrementan la eficiencia de absorción de nutrientes, especialmente de N y P (Holguin y Bashan, 2003).

También se produce un aumento en el contenido de agua, debido a un aumento de la conductividad hídrica de la planta o a una disminución de la resistencia al flujo de agua a través de ella. La planta hace mejor uso del agua y es capaz de recuperarse más rápidamente en caso de estrés hídrico (Cooper, 1984).

Los HMA alteran el nivel de sustancias reguladoras del crecimiento en los tejidos de las plantas y su transporte de unos tejidos a otros. Parece existir un efecto hormonal, pero es extremadamente difícil diferenciar los efectos producidos por las hormonas del hongo y los producidos por las hormonas vegetales y los producidos indirectamente por el estado nutricional de las plantas como consecuencia de la micorrización (Allen et al., 1982).

#### **3.4.4 Beneficios de la simbiosis micorrízica para el agricultor**

Beneficios de la simbiosis micorrízica para el agricultor: Los cultivos requieren menor adición de fertilizantes ya que se aprovechan mejor los nutrientes del suelo; en promedio se reduce la adición de fertilizantes en 25% y de fósforo en 50%. La reducción del uso de fungicidas y bactericidas es también importante, considerando que la planta es menos susceptible a infecciones. En cuanto a la calidad y cantidad de flores o frutos, ésta es mayor, ya que la planta ha tenido una inducción en su crecimiento (Xoconostle y Ruiz, 2002).

Los niveles de etileno que estimulan el desarrollo de los HMA pueden estar relacionados con la resistencia de la planta hospedadora a factores de estrés del suelo, bajos niveles de etileno producido por estrés en la planta, parecen inhibir

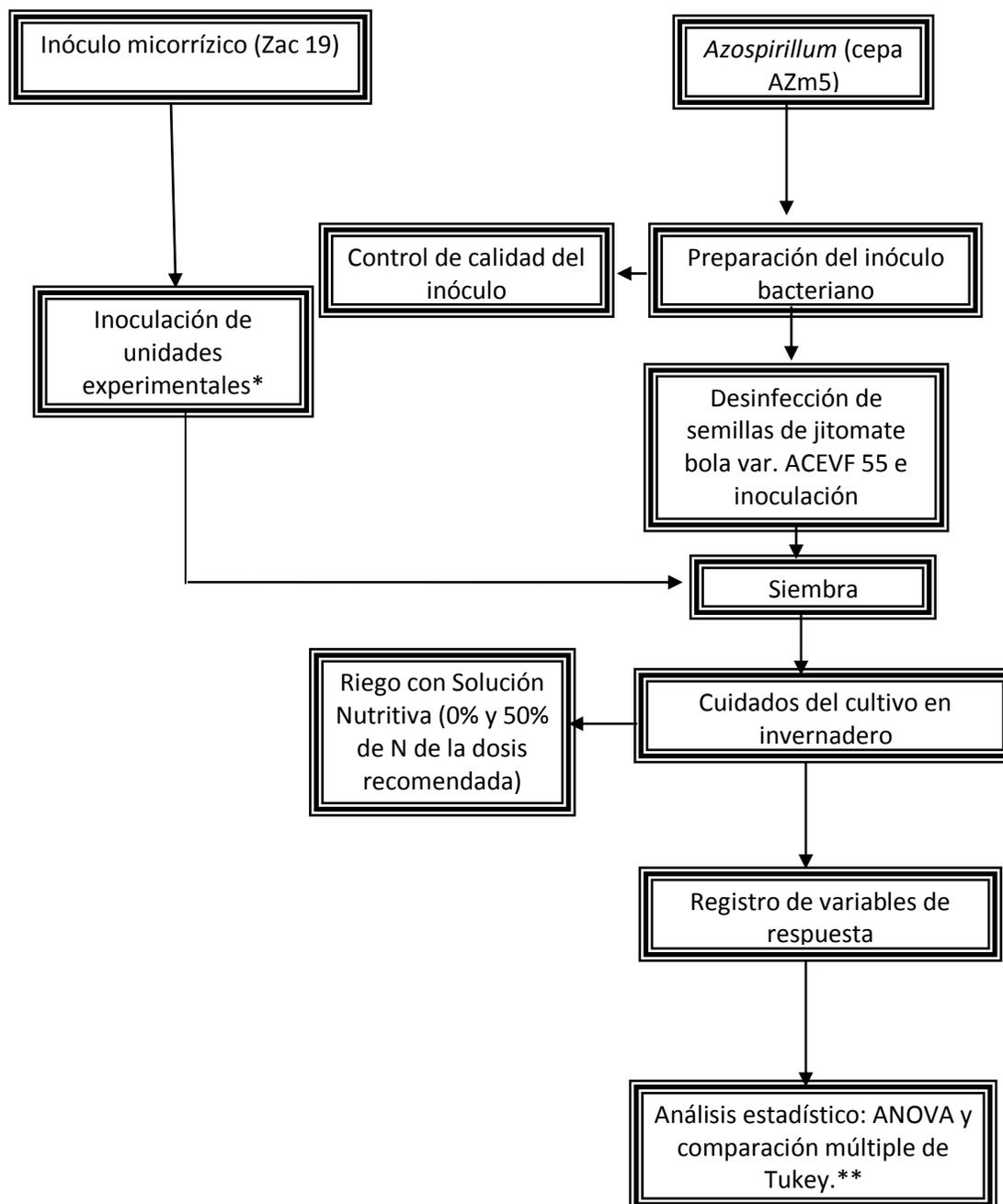
temporalmente el crecimiento de las raíces, pero al mismo tiempo se promueve la actividad de HMA en la rizosfera con lo que se minimiza el efecto estresante sobre la planta. La consecuencia del hongo es una alteración positiva del equilibrio hormonal de la planta que favorece su estado fisiológico y nutricional (Ishii y Kayoya, 1994).

### **3.5 Interacción de *Azospirillum* y HMA**

La micorrizosfera es la rizosfera de una planta micorrizada y es en ella donde se producen las siguientes interacciones: interacciones con microorganismos beneficiosos y funciones específicas e interacciones con patógenos (Smith y Read, 1997).

La relación entre el HMA y la rizobacteria promotora del crecimiento vegetal no está bien definida, aunque se sabe que la inoculación de *Azospirillum* sp en combinación con hongo HMA, producen un incremento significativo en el crecimiento de algunos cultivos, específicamente cereales, pero el mecanismo responsable no se define con exactitud (Alfonso y Galan, 2006). Algunos incrementos sobre el desarrollo ocurren sin la evidencia de incrementos en la fijación de nitrógeno en las plantas, y se puede relacionar con la producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (Blanco y Salas, 2004).

## DIAGRAMA DE TRABAJO:



\*Sustrato: mezcla de agrolita (sustrato de origen mineral a partir de perlita expendida) y suelo estéril (2:1)

\*\*Diseño experimental: Factorial totalmente aleatorizado ( $p < 0.05$ )

## IV. MATERIAL Y MÉTODO:

### 4.1 Obtención de inóculos:

*Inoculante bacteriano: Azospirillum lipoferum cepa AZm5*

El inoculante se obtuvo en la fase logarítmica del cultivo. Se preparó de acuerdo a los siguientes pasos:

a) Activación de cepa AZm5: se realizó la siembra en medio Nfb semisólido (ver anexo) a 34 °C por 72 horas.

b) Adaptación: se incubó la cepa en Medio Mínimo (MM) (ver anexo) con 50 mL, de ACC (300 mM) como única fuente de nitrógeno, en agitación a 200 rpm a 34°C por 48 horas.

c) Propagación: se transfirió 1 mL del cultivo de adaptación a un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de MM y se incubó con las condiciones anteriores durante 24 horas.

d) Ajuste del Inóculo: Se ajustó la población a una D.O = 0.02 ( $A_{560nm}$ ) mediante la adición de MM estéril, utilizando un espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec modelo 3000. Como blanco se usó el Medio Mínimo estéril sin inocular.

*Control de calidad del inóculo:*

Se determinaron las UFC por mililitro de inóculo, mediante la técnica de dilución y vertido en placa, empleando como medio de cultivo Gelosa Nutritiva, a una temperatura de 34°C por 72 horas.

*Inoculante micorrízico:*

El inóculo micorrízico Zac19 fue donado por el Dr. Ronald Ferrera-Cerrato del Área de Microbiología del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo, México, con la característica de tener aproximadamente  $1800 \pm 136$  esporas / g. Dicho inóculo fue adicionado al sustrato previo a la siembra, colocando 10 g para cada unidad experimental.

**4.2 Desinfección, inoculación y siembra de semillas***Desinfección de semillas:*

Se utilizaron semillas de jitomate bola de crecimiento indeterminado, variedad ACEVF 55, lote 434 4132, con 85% de germinación y 99% de pureza; marca Westar Seed International Inc. California, EU. Las semillas se desinfectaron con 10 mL de alcohol etílico 96% por 10 min en agitación. Se drenaron y se les adicionó 5 mL de hipoclorito de sodio al 3%, se drenaron nuevamente y se lavaron 7 veces con 10 mL de agua estéril en cada ocasión; el último lavado fue con 10 mL de  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.3 M).

*Inoculación de semillas:*

Las semillas, ya desinfectadas, se sumergieron en 10 mL del inóculo bacteriano en medio mínimo estéril (testigo), por una hora a temperatura ambiente.

*Siembra de semillas:*

En condiciones de asepsia se tomaron 6 semillas para cada tratamiento y se colocaron en cajas Petri estériles con papel filtro húmedo; estas se incubaron bajo condiciones de luz natural y temperatura ambiente (28-30°C) por 5-6 días. Se realizó el trasplante de 4 semillas por unidad experimental correspondiente y se colocaron en invernadero (10/45°C Min/Max), por un periodo de 6-7 semanas.

**4.3 Labores del invernadero:***Preparación de unidades experimentales:*

Se utilizaron vasos de unicel de 250 ml de capacidad, los cuales fueron llenados con el siguiente sustrato: suelo y agrolita estériles en una relación de 2:1. Las características del suelo antes de mezclar fueron: pH 6.5, materia orgánica 6.3%, nitrógeno total 0.03%, fósforo total 1.61 mg/kg y calcio 1447 mg/kg (el análisis de suelo se realizó en el Laboratorio de Análisis Químicos de Suelo y Material Vegetal de la Universidad Autónoma Chapingo). El sustrato se humedeció con la solución nutritiva estéril previo al trasplante.

*Preparación de solución nutritiva:*

La solución nutritiva se preparó de acuerdo con la formulación de Hazera Seeds<sup>MR</sup> (**Cuadro 2**), la cual nos proporciona una concentración al 100% de 350 kg N / ha.

*Limpieza y acondicionamiento del invernadero:*

Se empleó un invernadero rústico perteneciente al laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, con cubierta de plástico nuevo, y se acondicionó con una malla sombra de color verde. Antes de colocar las unidades experimentales se realizó la limpieza y desinfección con QRY (1%).

*Riego:*

Después de la siembra, a todas las unidades experimentales se les controló la humedad mediante la adición de la solución nutritiva correspondiente. El riego se realizó con 40-80 mL de solución nutritiva cada dos o tres días (según las necesidades del cultivo). Para evitar la concentración de sales, cada 15 días se procedió al riego con 80 mL de agua corriente estéril.

**Cuadro 2. Composición de solución nutritiva de acuerdo a la formulación de Hazera Seeds<sup>MR</sup> (1) y una concentración al 50% de Nitrógeno y 0% de Fósforo (0 kg P/ha),**

<b>Fertilizante</b>	<b>50%N</b>	<b>100%</b>
Nitrato de Potasio	0.075 g	0.15 g
Nitrato de Calcio	0.425 g	0.85 g
Fosfato mono amónico	0.02 g	0.04 g
Sulfato de potasio	0.25 g	0.5 g
Sulfato de magnesio 7 H <sub>2</sub> O	0.4 g	0.8 g
Sulfato de amonio	0.0125 g	0.025 g
Sulfato Ferroso	0.0075 g	0.015 g
Sulfato de manganeso	0.0015 g	0.003 g
Ácido Fosfórico	0 g	1 g

El pH de las soluciones se ajustó a  $6.8 \pm 0.2$ , empleando HCl (1N) o KOH (1N)

#### 4.4 Registro de variables de respuesta

##### *Evaluación de altura*

La altura de las plantas fue monitoreada a las dos, cuatro y seis semanas después de la siembra (15 días, 30 días y 45 días después del transplante, respectivamente). Se midió con una regla de 30 cm a partir de la base del tallo y hasta el meristemo apical<sup>1</sup>.

##### *Colonización de *Azospirillum lipoferum* (AZm5) en raíces:*

A las 6 semanas de desarrollo, bajo condiciones de asepsia, se extrajo el sistema de la raíz, se eliminó el exceso de agrolita y se tomó una muestra de 1 g, el cual se maceró en un tubo de ensayo (16x150 mm) con solución salina isotónica estéril. Se realizaron diluciones por triplicado de acuerdo al método del Número Más Probable (NMP). Se utilizaron las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , de donde se tomó 1 mL y se sembraron en tubos de ensayo (16x150 mm) con medio Nfb semisólido y se incubaron a 34°C por 1 a 3 días. Se consideraron como tubos positivos aquellos que presentaran vire del indicador y la formación de una película blanca en la zona microaerofílica del medio (Döbereiner et al., 1976; Tarrand et al., 1978).

---

<sup>1</sup> El meristemo apical del tallo, situado en el ápice de las plantas, es la zona de división y expansión celular.

*Evaluación de peso seco de parte aérea (biomasa) y peso fresco de raíz:*

Al término de las 6 semanas se evaluó el peso seco de parte aérea y peso fresco de la raíz. La raíz fresca y libre del exceso del sustrato se pesó directamente en una balanza analítica (Zurich Mettler H31AR, D=0.1 mg). Para obtener el peso seco de la parte aérea o biomasa, se separó el tallo y las hojas de la planta, se colocaron en bolsas de papel kraftin y se secaron en una estufa a 60°C por 48 h o hasta peso constante; el peso se registró en una balanza analítica (Zurich Mettler H31AR, D=0.1 mg).

*Determinación de nitrógeno en plántulas por método de Kjeldhal:*

Se pesaron en papel Kraft entre 10 y 100 mg de la plántula seca y molida y se depositaron en el tubo de digestión, se agregaron 0.5 g de sulfato de potasio y 8 mL de mezcla digestiva (3 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  en 20 mL de agua destilada se agregaron 50 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y 430 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado) se colocó en el digestor a un temperatura de 320°C durante 15 min. Se dejó enfriar y se le agregaron 3 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 %. Nuevamente colocamos el tubo en el digestor a 370°C hasta el término de la digestión (el líquido debe quedar translucido, incoloro o verde azulado) se dejó enfriar el tubo antes de destilar. Destilación: Se diluyó la muestra digerida con 10 mL de agua destilada, colocando el tubo en el destilador, se descargó la solución de NaOH al 36% hasta que viro a un color verde oscuro, inmediatamente se inició la corriente de vapor para destilar el amoniaco generado, que se atrapa en la solución de ácido bórico. Se continuó la destilación hasta tener aproximadamente un volumen de 100 mL.

Titulación: El amoníaco atrapado en la solución de  $H_3BO_3$  se tituló con solución de HCl 0.01 N hasta el vire el indicador a un tono rosado (Alcántara-González y Sandoval-Villa, 1999).

*Determinación de fósforo por el método del Vanadato- Molibdato:*

Se transfirieron de 10-100 mg de muestra seca a un matraz volumétrico de 100 mL; se adicionaron unas gotas de solución de amoníaco (0.88) y se acidificó con ácido nítrico (1:2). Se agregaron 25 mL del reactivo de vanadato-molibdato, se diluyó hasta la marca con agua destilada y se mezcló. Se dejó en reposo por 10 min y se midió la densidad óptica a 470 nm en una celda de 2.5 mm (Alcántara-González y Sandoval-Villa, 1999).

*Diseño experimental y análisis estadístico:*

Se empleó un diseño factorial  $2 \times 2 \times 7$ , de 2 factores (2 inóculos bacterianos: AZm5 y control), 2 niveles de fertilización micorrízica (con y sin inocular), con 7 repeticiones por tratamiento, para un total de 28 unidades experimentales. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un  $\alpha=0.05$ . Las medias fueron comparadas mediante una comparación múltiple de Tukey, empleando el paquete estadístico Statistica versión 8 (StatSoft, Inc. (2006), New York, EU).

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Control de calidad del inoculante bacteriano:

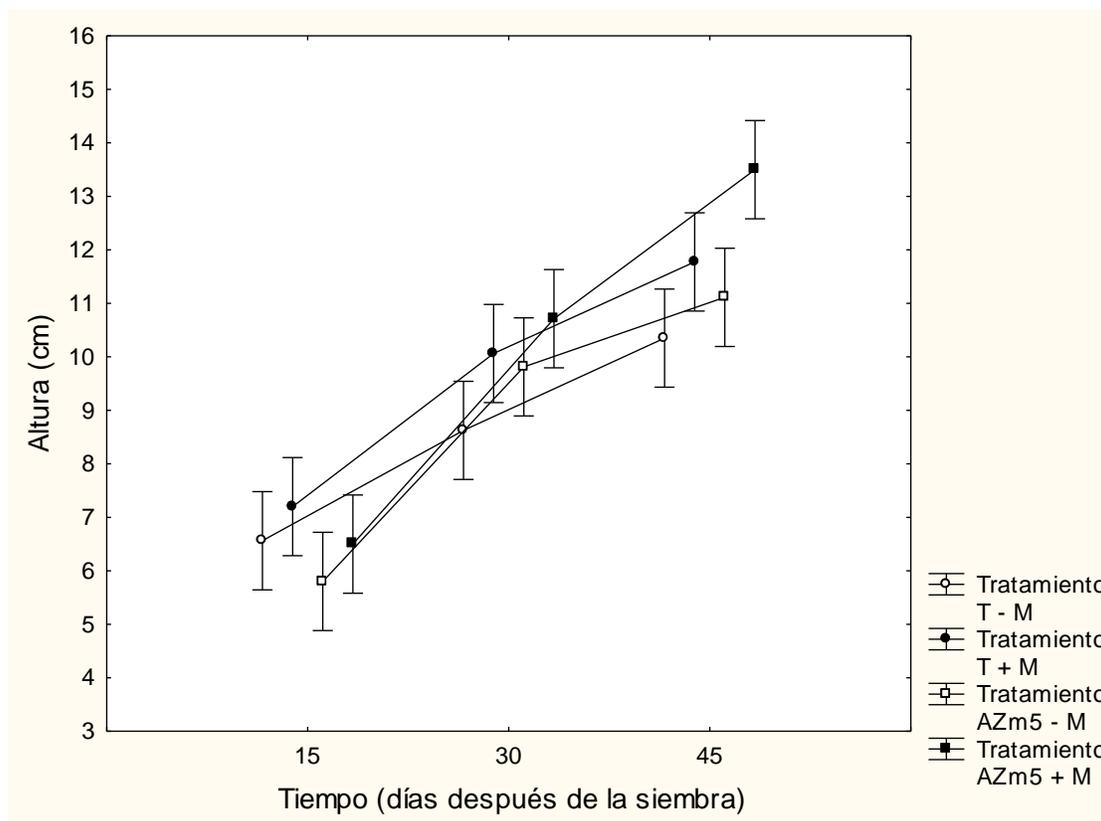
El inóculo empleado en este estudio presentó una concentración de  $7.5 \times 10^6$  células / mL de inóculo a una densidad óptica ( $A_{560}$ ) de 0.02. Efectos benéficos de bacterias de *Azospirillum* en el desarrollo de plantas de jitomate han sido reportados con una concentración óptima de  $10^5$  a  $10^6$  células / mL de inóculo causando un efecto benéfico en las plantas. En tanto que, se ha reportado que la inoculación con  $10^8$  a  $10^9$  células / mL causan la inhibición del crecimiento de la planta (Urzúa, 2001; Esquivel-Cote, 2002; Terry et al., 2005; García-Olivares et al., 2006).

### 5.2 Registro de variables de respuesta

#### 5.2.1 Altura de la parte aérea

El efecto de la co-inoculación con *Azospirillum lipoferum* (AZm5) y el inóculo micorrízico Zac 19, se evidenció en la altura de la parte aérea de las plantas de jitomate a los 45 días después del transplante, donde observamos diferencias estadísticamente significativas, respecto a los tratamientos inoculados con sólo *Azospirillum lipoferum* (AZm5) o con sólo el inóculo micorrízico Zac 19 y al tratamiento sin inocular (**Figura 6**).

Así mismo, se observó que la presencia de la micorriza favoreció la altura de las plantas independientemente del inóculo bacteriano. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores en jitomate y otros cultivos.



**Figura 6.** Efecto de *Azospirillum lipoferum* (AZm5) y la micorriza Zac 19 (M) en la altura de plantas de jitomate a diferentes días de desarrollo (15, 30 y 45 días después del transplante), fertilizadas con el 50% de N y el 0% de P de la dosis recomendada. Las barras representan el error estándar.

González-Salmerón (2001) reporta que la co-inoculación de *Azospirillum brasilense* (VS9) y *Glomus intraradices* incrementa la altura de plantas de jitomate. Pulido y colaboradores (2003), reportan que la co-inoculación con *Azospirillum brasilense*, *Glomus clarum* y *G. fasciculatum* favorecen el crecimiento de jitomate en la altura de la planta. Uribe (2006), reporta que la co-inoculación con *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices* favorece la altura y el área foliar de plantas de maíz (*Zea mays* L.). Díaz-Franco y colaboradores (2008), reportan que la co-inoculación con *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices* favorece la altura y el rendimiento de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* L.).

### **5.2.2 Evaluación del peso seco de parte aérea (biomasa) y peso fresco de raíz**

En el **Cuadro 3** observamos que las plantas de jitomate co-inoculadas con *Azospirillum lipoferum* AZm5 y la cepa micorrízica Zac 19, y fertilizadas con el 50% de N y 0% de P de la dosis recomendada, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el peso seco de la parte aérea, ni en el peso fresco de raíz. A este respecto se ha reportado que, los hongos micorrízicos arbusculares favorecen a las plantas al producir mayor biomasa gracias a un mejor aprovechamiento del agua y nutrientes del suelo, ya que las hifas extrarradicales incrementan la zona de captación de agua (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007; Gianinazzi et al., 2010).

**Cuadro 3.** Respuesta de plántulas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) var. ACEVF 55 a la co-inoculación de la cepa AZm5 de *A. lipoferum* y a la cepa micorrízica Zac 19 en el crecimiento vegetal, en un cultivo de 52 días de desarrollo (45 días después del transplante), fertilizado con el 50% de nitrógeno y el 0% de fósforo de la dosis completa recomendada. Los valores entre paréntesis ( $\pm$ ) indican el error estándar de la media de siete réplicas.

Inóculos microbianos		Peso seco de parte aérea o biomasa (g)	Peso fresco de raíz (g)	N en parte aérea (%)	P en parte aérea (ppm)	Colonización bacteriana ( $10^6$ NMP células g raíz)	Colonización micorrízica		
							H <sup>1</sup> (%)	V <sup>1</sup> (%)	A <sup>1</sup> (%)
AZm5	Zac 19	2.623 (0.0472)	0.2266 (0.0336)	1.817 a (0.1089)	0.512 a (0.00005)	5.6 a (0.7815)	100 a (0.0)	96.66 a (1.6817)	100 a (0.0)
AZm5	-	2.533 (0.0498)	0.185 (0.0336)	1.428 b (0.1089)	0.508 b (0.00005)	5.16 a (0.8561)	0 b (0.0)	0 b (1.6817)	0 c (0.0)
-	Zac 19	2.541 (0.0472)	0.190 (0.0336)	1.817 b (0.1089)	0.511 a (0.00005)	0 b (0.7815)	100 a (0.0)	95.95 a (1.6817)	100 a (0.0)
-	-	2.525 (0.0498)	0.2067 (0.0336)	0.0 c (0.1089)	0.506 b (0.0005)	0 b (0.7815)	0 b (0.0)	0 b (1.6817)	0 c (0.0)

Los datos que comparten letras no presentan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al análisis estadístico

<sup>1</sup> H=hifas, V=vesículas, A=arbusculo

Sin embargo, en este estudio no se evidenció tal efecto en la producción de biomasa, debido probablemente a que en las plantas con menor altura hayan absorbido mayor contenido de agua (peso fresco).

De acuerdo a lo anterior, Esquivel-Cote y colaboradores (2010) reportaron que la inoculación de plantas de jitomate con AZm5 de *Azospirillum lipoferum* y HMA incrementaron la altura de las plantas y no así la biomasa. Por otro lado, estos mismos autores reportaron que este tratamiento favoreció el área foliar (cantidad de superficie de hoja) de la parte aérea de las plantas y no la biomasa de las hojas, lo cual puede ser atribuido a la capacidad de la cepa AZm5 para producir las fitohormonas citocininas (Esquivel-Cote et al., 2010), las cuales contribuyen en la expansión foliar de las hojas (Taiz y Zeiger, 2002).

Cabe mencionar que cuando las plantas se encuentran en condiciones de estrés ambiental como es la limitación de nutrientes elevan la biosíntesis de etileno (Abeles et al., 1992; Lynch y Brown, 1997); no obstante, la acción de la enzima ACC desaminasa de las bacterias permite reducir las concentraciones de etileno e incrementar el crecimiento vegetal, como ocurre posiblemente con el incremento en la altura de las plantas de jitomate inoculadas con la cepa AZm5, además de que aquellas planta inoculadas con HMA mejoran la absorción de agua (peso fresco). Lo anterior, puede ser una condición importante para las plantas en etapas más avanzadas de su desarrollo, ya que plantas con mayor altura son ecológicamente más competitivas (ejemplo captación de luz) respecto a otras menos altas (Lambers et al., 2008).

### 5.2.3 Determinación de nitrógeno y fósforo en parte aérea

Las plantas de jitomate co-inoculadas con *Azospirillum lipoferum* AZm5 y la cepa micorrízica Zac 19, y fertilizadas con el 50% de N y 0% de P de la dosis recomendada, presentaron diferencias significativas en el contenido de nitrógeno y fósforo en parte aérea, respecto a las plantas no inoculadas (**Cuadro 3**).

En la literatura se encuentra que los hongos micorrízicos arbusculares que están presentes en las raíces, incrementan la movilización del nitrógeno presente en los residuos orgánicos en descomposición siendo de gran importancia también en la recirculación del nitrógeno en el suelo (Atul-Nayyar et al., 2009).

Por otra parte, se ha reportado que las plántulas inoculadas con *Azospirillum*, presentan un mayor contenido en nitrógeno foliar respecto a plantas no inoculadas (Pereira et al., 1988; Raverker y Konde, 1988; Bashan y Levanony, 1990; Rodríguez-Barrueco et al., 1991; Rodelas et al., 1996; Hernández-Bautista, 2001; Gadagi et al., 2004; Esquivel-Cote et al., 2010).

Así mismo, se ha reportado que los HMA juegan un papel muy importante en el crecimiento vegetal y en el incremento de fósforo foliar en plantas (Smith y Read, 1997), y que este efecto es más significativo cuando poco fosfato está presente en el suelo (Harley y Smith, 1983). Tal efecto se diferencio en este estudio, donde observamos que las plantas inoculadas con la cepa micorrízica Zac 19 presentaron significativamente los valores más altos en el contenido de P foliar respecto a aquellas plantas no inoculadas con este microorganismo (**Cuadro 3**).

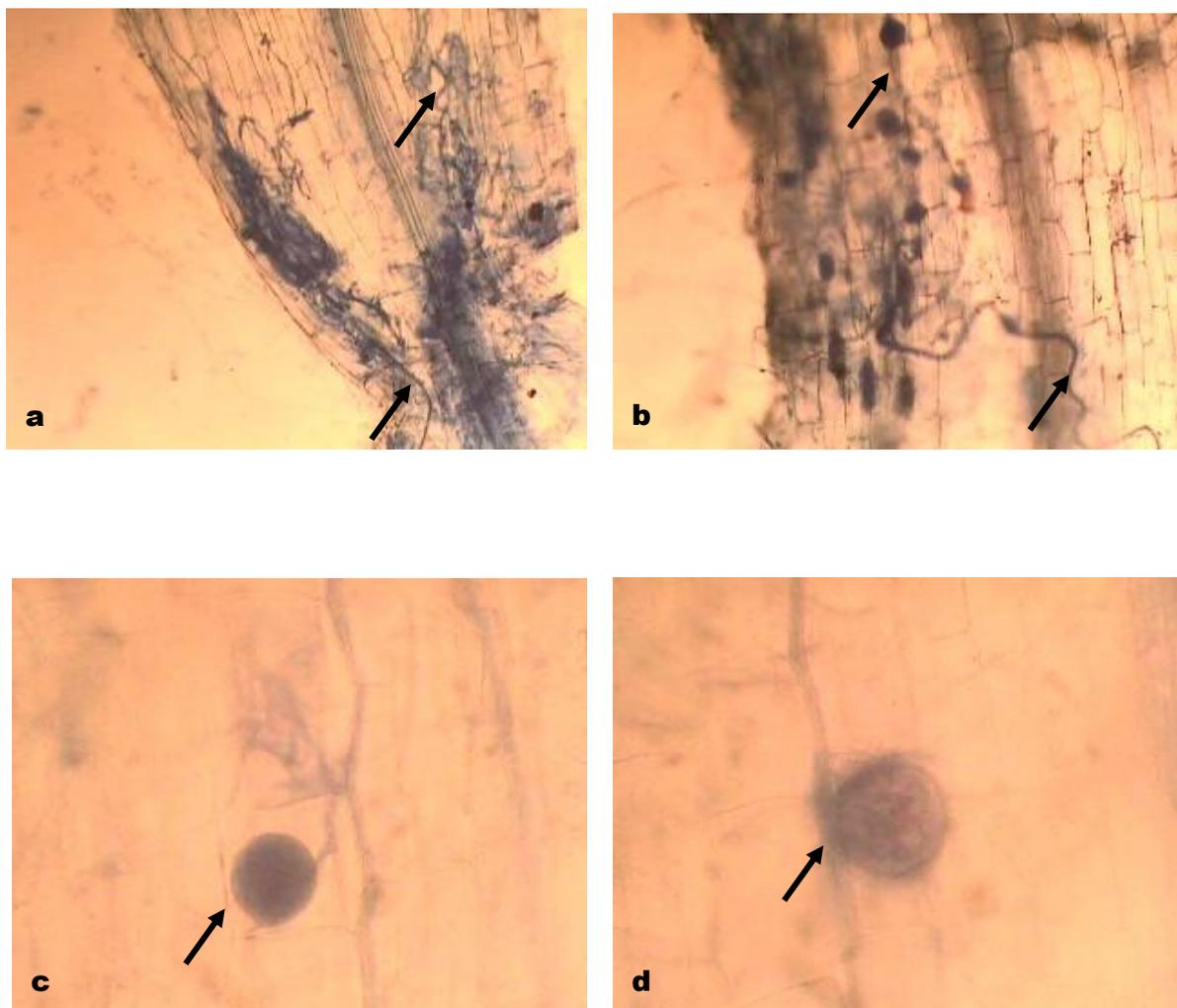
Aunque existen reportes donde indican que *Azospirillum* es capaz de solubilizar fósforo (Rodríguez et al., 2004), lo cierto es que en este estudio la inoculación con *Azospirillum lipoferum* AZm5 no contribuye a la absorción de P del suelo.

#### **5.2.4 Colonización microbiana (*Azospirillum lipoferum* AZm5 y hongo micorrízico arbuscular Zac 19) en raíz**

Las raíces de jitomate fueron colonizadas por las células de *Azospirillum* en una población de  $6.080 \times 10^6 \pm 1.5073$  células / g raíz, en los tratamientos inoculados con hongos micorrízicos, y de  $5.160 \times 10^6 \pm 2.8986$  células / g raíz, en los tratamientos sin hongos micorrízicos. Nuestros resultados confirman la capacidad de *Azospirillum lipoferum* AZm5 para colonizar endofíticamente plantas de jitomate (var. ACEVF 55), en presencia o no de otros microorganismos. En cuanto a la colonización micorrízica, observamos que las raíces de jitomate fueron colonizadas significativamente por la cepa Zac 19, donde se logró observar la presencia tanto de hifas, arbusculos y vesículas en más del 95% de los segmentos observados. La presencia de la cepa AZm5 no influyó significativamente la colonización micorrízica de las raíces de jitomate. Estos resultados confirman que el efecto que se observó en las plantas co-inoculadas fue producto del efecto de los inóculos microbianos empleados en este estudio.

A este respecto, se ha reportado que algunas bacterias tiene la función de “ayudar” a la germinación, desarrollo y colonización de los hongos micorrízicos, por lo que se les considera bacterias ayudadoras de micorriza (MHA, mycorrhiza helper bacteria) (Garbaye, 1994; Frey-Klett, 2007). Existen reportes donde exponen que algunas cepas de *Azospirillum* son consideradas MHA de algunos hongos micorrízicos, tales como el género *Glomus* sp.

En la **Figura 7** se muestra la presencia de los hongos micorrizicos arbusculares, Zac 19, en algunas de las raíces de las plántulas jitomate a las 6 semanas de desarrollo.



**Figura 7.** Raíz de jitomate bola (var. ACEVF 55), inoculada con *Azospirillum lipoferum* AZm5 y la cepa micorrízica Zac 19, donde se muestra la presencia de hifas (a) vesículas (b). Imágenes observadas con un aumento de 10x. En c y d, se muestra un detalle de estas vesículas, indicadas con la flecha. Imágenes observadas con un aumento de 40x.

En este estudio se observó que, la concentración microbiana de cada uno de los inóculos fue la adecuada para lograr la colonización de las raíces de jitomate (var. ACEVF 55), en un cultivo de 6 semanas de desarrollo.

La co-inoculación con *Azospirillum lipoferum* AZm5 y la micorriza Zac 19 favorece el crecimiento y nutrición vegetal de plantas de jitomate (var. ACEVF 55), ya que incrementó la altura, el nitrógeno y el fósforo foliar, en un cultivo fertilizado con sólo el 50% de nitrógeno y el 0% de fósforo de la dosis completa recomendada. Los resultados coinciden con Guerra-Sierra (2008) quienes reportan que PGPR y HMA estimulan positivamente el crecimiento de las plantas, y contribuyen al mejoramiento del estado nutricional de las mismas, generando incrementos en el rendimiento y en la eficiencia de la fertilización nitrogenada.

En la **Figura 8** se observa un aspecto de las plantas co-inoculadas con *Azospirillum lipoferum* AZm5 y la cepa micorrízica Zac 19.



**Figura 8.** Aspecto de las plántulas de jitomate bola (var. ACEVF 55) inoculada con *Azospirillum lipoferum* AZm5 y con la cepa micorrízica Zac 19, fertilizadas con 0% de nitrógeno (AZm5+0+M) e Inoculada sólo con *Azospirillum lipoferum* AZm5, fertilizadas con 0% de nitrógeno (AZm5+0)

Los resultados de este trabajo sugieren que la co-inoculación favoreció el crecimiento de plantas de jitomate (var. ACEVF 55), debido a que:

a) La presencia de *Azospirillum* produce fitohormonas como las auxinas, las cuales tienen un papel muy importante en la elongación celular vegetal (Bashan et al., 2004; Aguilar-Piedra et al., 2008), además la cepa AZm5 produce la enzima ACC desaminasa, la cual pudo ser el mecanismo para incrementar el contenido de nitrógeno foliar en las plantas que se encontraban en condiciones nutrimentales desfavorables, en este estudio limitante en el contenido de nitrógeno en el suelo, lo cual coincide con lo reportado por Esquivel-Cote y colaboradores (2010)

b) La presencia de hongos micorrízicos arbúsculares en el suelo son muy importantes por su asociación con las plantas que se encuentran en ambientes desfavorables (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007), además la cepa micorrízica Zac 19 ha sido empleada exitosamente como promotor del crecimiento vegetal de una gran variedad de cultivos hortícolas y frutales, debido entre otras causas, a que, favorece la absorción de fósforo del suelo (Gardezi et al., 1999; González-Chávez y Ferrara-Cerrato, 2000).

Adicional a lo anterior, se ha documentado que el efecto sinérgico de *Azospirillum* y hongos micorrízicos arbusculares en el incremento del crecimiento vegetal, incrementa cuando éstos microorganismos se aplican en consorcio con otros microorganismos promotores del desarrollo vegetal (Berg, 2009).

## VI. CONCLUSIONES

- La cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum* es capaz de colonizar las raíces de jitomate bola (var. ACE VF 55), empleando un inóculo con una concentración de  $7.57 \times 10^7$  UFC/mL inóculo.
- El inóculo Zac 19 de *Glomus* sp coloniza, con una eficiencia del más del 95%, formando estructuras vesiculares, en las raíces de jitomate bola (var. ACE VF 55).
- La co-inoculación con *Azospirillum lipoferum* (AZm5) y la cepa micorrízica Zac 19, favorece la altura e incrementa el contenido de nitrógeno y fósforo foliar en plantas de jitomate bola (var. ACE VF 55), en un cultivo fertilizado con el 50% de nitrógeno y el 0% de fósforo de la dosis completa recomendada, a las 6 semanas de desarrollo.
- El inóculo bacteriano (*Azospirillum lipoferum* AZm5) y el micorrízico (Zac 19) se proponen para la biofertilización de plantas de jitomate bola (var. ACE VF 55), en un cultivo fertilizado con el 50% de nitrógeno y el 0% de fósforo de la dosis completa recomendada,

## VII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar el efecto en el crecimiento vegetal de la co-inoculación con la cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum* y el inóculo micorrízico Zac 19, de plantas de jitomate fertilizadas con dosis más bajas al 50% de nitrógeno, respecto a la dosis al 100% recomendada.
2. Evaluar el efecto en las características morfológicas y nutrimentales de los frutos de plantas de jitomate co-inoculadas con la cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum* y el inóculo micorrízico Zac 19, fertilizadas con el 50% de la dosis de N, respecto a la dosis al 100% recomendada.
3. Evaluar el efecto en el crecimiento vegetal de otras variedades de jitomate y otras hortalizas de importancia económica como pepino, chile serrano y calabacita, co-inoculadas con la cepa AZm5 de *Azospirillum lipoferum* y el inóculo micorrízico Zac 19, tanto en hidroponía como en suelo y en campo.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME Jr (1992) Ethylene in plant biology. 2nd edn. Academic Press, New York
- Aguayo E. y Artes. F. (2004). Elaboración del tomate mínimamente procesado en fresco. Compendios de Horticultura. 15. Ediciones de Horticultura S.L. Reus, España.
- Aguilar-Piedra J.J., Xiqui-Vasquez M.L.,Garcia-Garcia S., Baca B.E. (2008) Produccion de ac. Indiol 3-acetico en *Azospirillum*. Articulo en revisión R.V. Lat.Microbiol 50:29-37
- Alarcón A, Frederick T. Davies Jr,Egilla JN. (2002) Efectos a corto plazo de *Glomus claroideum* y *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento y actividad de la fosfatasa acida en raíz de Carica papaya bajo condiciones de limitación de fósforo. Rev. Latiniam.Microbid.; 44 (1):31-37.
- Alcántar-González G., Sandoval-Villa M. (1999) Manual de análisis químico de tejido vegetal. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C., Chapingo, México, 156 pp.
- Alfonso T. Elein, Galan L. Ángel (2006) Evaluación agro biológica de la co-inoculación micorrizas-rizobacterias en tomate. Agronomía Costarricense 30(1):65-73. ISSN: 0377-9424
- Allent M. (1982). Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on water movement through *boute lovagracilis* (H.B.K.).Lax ex steud. New Phytol,91:191-196
- Artes, F., Conesa, M.A., Hernandez, S. y Gil, M.I. (1999). Keeping quality of fresh-cut tomato.Postharvest Biology and technology.17: 153-162
- Arroyo Ávila V. (2006) Respuesta de la asociación maíz-micorrizas VA-*Azospirillum* a la aplicación de diferentes fuentes de fósforo en un andisol. Tesis de Posgrado en Ciencias biológicas, Facultad de Ciencias. UMAN

- Atul-Nayyar A., Hamel C., Hanson K., y Germida J. (2009) The arbuscular mycorrhizal symbiosis links N mineralization to plant demand. *Mycorrhiza*. 19: 239-246.
- Bashan Y. (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*. 16:729-770.
- Bashan Y. y Carrillo A. (1996) Inoculantes microbianos para la agricultura sostenible. In: Perez- Moreno J: y Ferrera- Cerrato (eds). *Nuevos horizontes en agricultura: Agroecología y Desarrollo sostenible*. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Mexico pp 125-115.
- Bashan Y. y Levanony H. (1990) Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agricultura. *Can J Microbiol* 36: 591-608.
- Bashan Y., Holgín G., de-Bashan L. E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50: 521-577.
- Bautista M. N. (2001) Producción de jitomate en invernadero. Ed. Colegio de Postgraduados.
- Barea, J. and Azcon, C. (1983).Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. En: *Advances in Agronomy*. Vol. 3:1-54.
- Bartel B. (1997). Auxin Biosynthesis. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol. Biol.* 48
- Banco de Mexico (2006) disponible en línea <http://www.banxico.org.mx>
- Becking I. H. (1982) *Azospirillum, lipoferum*-A reappraisal. En Klingmúler, W *Azospirillum* Genetics, physiology, ecology, Berk Háuser Verlag, basel. pp130-149.
- Belimov A.A., Hontez N., Satronova V.I., Demchinskaya S.V., Piluzza G., Bullitta S. (2002) Cadmiun- tolerant plant-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 Bitechol* 84: 11-18.

- Blanco A., Salas A. (2004) Micorrizas en la agricultura contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 21:55-67.
- Bolan N. S. y Abott L.K. (1983). Seasonal variation in infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to plant response to applied phosphorus. *Aust. J. of Soil Res.* 21, 208-210.
- Campos, J., Hita, E., Romero, J., Melgosa, M., Artigas, J.M., Capilla, P., Felipe, A., Verdu, F. M., Pujol, J., Nagueruela, I., y Jiménez Del Barco, L. (1997). Avances y tendencias recientes en colorimetría. *Óptica Pura y Aplicada*.
- Caballero-Mellado Jesús. (2005) El género *Azospirillum* Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Ap. P. 565-A, Cuernavaca, Mor., México.
- Camarillo C.A.M. (2006). Determinación de la actividad de la ACC deaminasa en cepas de *Azospirillum*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM
- Cassán, F., Sgroj, V., Perrig, D., Masciarelli, O. and Luna, V. 2008. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal In: *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. F. D. Cassan and I. Garcia de Salamone (Eds.). Published by: Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. Chapter 4. pp. 61-86
- Castilla, N. (1995) Manejo del cultivo intensivo con suelo. En Nuez, F. (Coord.). *El cultivo del Tomate*. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp190-225.
- Castro-Sowinski S., Herschkovitz Y., Okon Y. y Jurkeyitch E. (2007) Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 276: 1-11.
- Chamarro, J. (1995). Anatomía y Fisiología de la planta. En Nuez F. (Coord.). *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundi-Prensa. España. Pp 47-91.

- 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.
- Collados Carlos (2006) Impacto de inoculantes basados en *Azospirillum* modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizosfera de trigo y maíz. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias.
- Cooper K. 1984. Physiology of VA mycorrhizal associations. *In*: VA mycorrhiza. C. Ll. Powell, D. Bagyaraj(eds.). CRC. Boca Raton, Florida. p. 155-203
- Cuenca G., Caceres A., Oirdobro G., Hasmy Z., U-rdaneta C. (2007) Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia* Vol 32: No.1 : 22-29
- 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.
- Döbblelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vandereleyn, J., Dutto, P., Labandera Gonzalez, C., Caballero Mellado, J., Aguirre, J. F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Varing, S. y Okon, Y. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiology* .28:871-879
- Döbereiner, J. (1983) Ten years of *Azospirillum* En W.Klingmüller, *Azospirillum* II: Genetics physiology, and ecology. Birkhauser, Basel Switzerland (Experientia supplementum 48. pp. 9 -23.
- Döbereiner, J. y Day, J. M. (1976). Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. *In*proceedingas of the first international Symposium on Nitrogen Fixation. 2:518-538.

- Domínguez Calderón I. (2006). Producción y calidad de jitomate inoculado con tres biofertilizantes a base de *Azospirillum brasilense*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Eckert B., Weber O.B., Kirchof 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.
- 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 en Edafología, UNAM.
- Esquivel-Cote R., Jiménez-Flores F., Jiménez-Olivares P., Tsuzuki-Reyes G., Ramírez-Gama R.M. (2004). Reducción de la fertilización nitrogenada química en jitomate mediante la biofertilización de *Azospirillum*. XXXII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. León Gto. México.
- 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.
- Fallik E., Okan Y., Epstein E., Goldman A. y Fisher M. (1989). Identification and quantification of IAA and IISA in *Azospirillum brasilense*- inoculated maize root. Soil Biol. Biochem; 21:147-153
- FAO (2008) Despinible en línea : <http://www.fao.org/faostat>
- Faxsa (2010). Disponible en línea: <http://www.faxsa.com.mx/semhort1/c60tf001.htm>
- Fernández, C., Piitre, A., Lobregat, M. L., y Rodon, Y. (2007). Determination of the lycopene content in different commercial tomato pastes. Information Technological. 18 (3): 31-38

- Ferrera-Cerrato R. y Alarcón A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum.* 8: 175-183.
- Ferrera-Cerrato R. y Alarcón A. (2007). *Microbiología agrícola*. Trillas. 568pp.
- Frey-Klett P., Garbaye J. y Tarkka M. (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*. 176: 22-36.
- Financiera rural (2009) disponible en línea [www.financierarural.gob.mx](http://www.financierarural.gob.mx)
- Gadagi R; Krishnaraj P.U. Kulkarni J.H. (2004) The effect of combined *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of the blanket flower *Gaillardia pulchella*. *Scientia Horticulturae*. 100: 323-232.
- Gamalero E, Berta G, Massa N, Glick BR, 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(1):236-45
- 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.
- Gardezi A. K., Ferrera-Cerrato R., Aguilar Acuña J.L. y Larqué Saavedra M. (1999) Crecimiento de *Sesbania emerus* (Aubl) Urban inoculada con *Glomus* sp. en presencia de vermicomposta. *Terra Vol* 17 (2)
- 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.
- Gianinazzi S., Gollotte A., Binet M., Van Tuinen D., Redecker D., Wipf D. (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*
- Gil, M. F. 1995. *Elementos de fisiología vegetal*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

- 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.
- Guerra-Sierra B.E. (2008) Micorriza arbuscular. recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología en Marcha* 21: 191-201.
- Ghosh A. M. J. N., Little R. D., Chavez 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.
- Glick B.R., Cheng Z., Czarny J., Duan J. (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology* , 119, 329-339.
- 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
- González Chávez M.C. y Ferrera-Cerrato R. (2000) Roca fosfórica y *Glomus* sp. en el crecimiento de naranjo agrio. *Terra* 18 (4)
- 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
- Guzmán R.A.P., Ferrera-Cerrato R. (1990). Las endomicorrizas Vesiculo-Arbusculares en las leguminosas. Estado de México, México. Centro de edafología. Colegio de Postgraduados.
- Harley I. y Smith S.E. (1983) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. London
- Hernández-Bautista M.A. (2001) Evaluación del efecto de dos grupos de rizobacterias productoras de fitohormonas: *Azospirillum* y solubilizadoras de fósforo, sobre el crecimiento del jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

- Holguin Gina, Bashan Yoav, Puente Esther, Carrillo Angel, Bethlenfalva y Gabor, Rojas Adriana, Vázquez Patricia. (2003) Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizosfera. Agricultura Técnica en México Vol. 29 Núm. 2 Julio- Diciembre p. 201-211
- Holguín G y Glick B. (2001). Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. Microbial Ecology. 41: 281-288.
- Hontzeas N., Zoidakis J., Glick B.R. y Abu-Omar M.M.(2004) Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomona putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. Biochem Biophys Acta, 1703: 11-19.
- INEGI. 2002. El sector Alimentario en México, Edición 2002, INEGI; con los datos del sistema de información Agropecuaria de consulta (SIACON, 1980-2001) [www.inegi.gob.mx/difusion/espanol/fmetodologias.html](http://www.inegi.gob.mx/difusion/espanol/fmetodologias.html)  
[www.inegi.gob.mx/difusion/espanol/fiest.html/](http://www.inegi.gob.mx/difusion/espanol/fiest.html/)
- Infoacerca (2008) despinible en línea [www.infoaserca.gob.mx/hortalizas\\_nacional/](http://www.infoaserca.gob.mx/hortalizas_nacional/)  
[www.infoaserca.gob.mx/hortalizas\\_internacional/](http://www.infoaserca.gob.mx/hortalizas_internacional/)
- IPNI (2010). Disponible en [www.ipni.net/ppiweb/iaecu.nsf/](http://www.ipni.net/ppiweb/iaecu.nsf/).
- Ishii T. y Kadya K. (1994).Effect of charcoal as a soil conditioner on citrus growth and vesicular mycorrhiza development. J. Japan.Soc.Hort.Sci.63(3):529-535
- Jain D. K. y Patriquin D.G. (1985) Characterization of substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat roots hairs. Can.J.Microbiol., 31: 206-210
- Jimenez D.R., Virgen C.G.,Tabares F.S. y Olalde P.V. (2001) Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología Avance y prespectiva., 20:395-400
- Kende H. (1993). Ethylene biosynthesis. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 44: 283-307.

- Khammas, K. M., Ageron, E., Grimont, P.A.D. y Kaiser, P. (1989). *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbiol. 140: 679-693.
- Lambers H., Chapin III F. S. y Pons T.J. 2008. 2a. ed. Plant Physiological Ecology. Springer. 610 pp.
- Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V., Kuever J., Lysenko A. y Grabovich M. (2010) *Azospirillum thiophilum* sp. n 1 ov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 2832-2837.
- 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.
- Lynch M. (1990) The ryzosphere. Wiley-Interscience, Chicester England.
- Lynch J.M. y Brown K.M. 1997. Ethylene and plant responses to nutritional stress. Physiol Plant 100: 613-619.
- Lin SY, Shen FT, Young LS, Zhu ZL, Chen WM, Young CC. (2011) *Azospirillum formosense* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from agricultural soil. Int J Syst Evol Microbiol. 2011 Jul 8. En prensa.
- Magalhães, F. M., Baldani, J. I., Souto S. M., Kuykendall, J. R. y Döbereiner, J. (1983). A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An Aces. Brasil. Cienc. 55: 417-430.
- Martínez E.R. (2005) Sistema de riego localizado: Elección y manejo del agua. Colegio de postgraduados. Producción de Jitomate en Invernadero pp31-71
- Medina-Morales y Cano-Ríos. (2001). Contaminación por nitratos en agua, suelo y cultivos en la comarca lagunera. Revista Chapingo Serie Zonas Áridas 2
- 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 zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2805-2809
- Meredith, F.I. y Pucell, A. E. (1996). Changes in the concentrations of carotenes of ripening Homestead tomatoes, Proc. Am. Soc. Hort. Sci.89:544
- Michelis, K. W., Croes, C. L. y Vanderleyden, J. (1991). Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. J. Gen. Microbiology 137: 2241-2246
- Moncayo R. Ignacio. (2005) Micorrizas .Solución para la reforestación y recuperación de suelos contaminados. Bion triton S.A. Chile.
- Nelson L. M. (2004). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New Inoculants. Online. Crop Management doi:10.1094/CM-2004-0301-05-RV. (<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/rhizobacteria/>)
- Nguyen M. y Schawart S. (1999) Lycopene: Chemical and biological properties en "Food Technology".58(2):38-44.
- Patten, C. L. y Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole 3 acetic acid. Can. J. Microbiology 42
- Peng G., Wang H., Zhang G., Hou W., Liu Y., Wang E. y Tan Z. (2006) *Azospirillum melinis* sp. Nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. Int J Syst Evol Microbiol. 56: 1256-1271.
- Penrose M. D. and Glick R. B. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol. Plant. 118: 10-15.
- Peralta H. (2009) Biofertilizantes para la agricultura sostenible en Mexico. Centro de Ciencias Genómicas UNAM.
- 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.

- Portugal O.V. y Aguilera G. L.I. (1998) Microorganismos y biodiversidad. Terra vol 6 (3): 289-292.
- 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.
- Rademacher W. (1994) Gibberellin formations in microorganisms. Plant Growth Regulation. 15: 303-314.
- Ramirez-G. R.,Luna M. B.,Mejia CH. A.,Velásquez M. O.,Tsuzuki R.G.,Vierna G.L.,Hernandez G.L.,Müggenburg. (2011) Manual de Prácticas de Microbiología General. Facultad de Química, UNAM
- 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.
- Reinhold B., T. Hurek, I., Fendrik B., Pot M., Gillis K., Kersters S., Thielemans 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.
- 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. *Viciae* 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.
- Rodríguez H., González T., Goire I. y Bashan Y. (2004) Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. Naturwissenschaften. 91: 552-555.

- Rojas M. C. y Ramírez H. (1993) Control hormonal del desarrollo de las plantas. Fisiología Tecnología Experimentación. Limusa. Noriega editores. México.
- Segura M. L. (2008) Técnicas de microscopia de fluorescencia y análisis de imágenes aplicadas al estudio de hongos micorrizicos. Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias UNAM.
- SAGARPA (2010) Información en línea en <http://www.sagarpa.gob.mx>
- SIAP, SAGARPA. (2005) .Servicio de información agroalimentaria y pesquera. <http://siap.gob.mx>
- SIEA, SAGARPA (2002) . <http://www.siea.sagarpa.gob.mx>
- Sieverdig E. (1991) Vesicular- Arbuscular Mycorrhiza management in tropical agrosystems. Germany: Deutsche Gesellschaft.
- 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.
- Smith S.E. y Read D.J. (1997) Mycorrhizal Symbiosis, 2nd edition, Academic Press.
- Steenhoudt D. y Vanderleyden J. (2000) *Azospirillum* a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Reviews. 24: 487-506.
- Taiz L. y Zeiger E. 2002. Plant Physiology. 4a. ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Mass, USA, 565 pp.
- 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.
- Tien M., Gaskins H. y Hubell 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.
- Traut O.C., Iglesias C.M., Pereira C., Lucrecia (2006) Utilización de inoculante contenido *Azospirillum brasilense* en el cultivo de arroz (*Oryza sativa*) Catedra de microbiol Agrico. Facultad de Ciencias Agrarias- UNNE.
- Trevor V., Suslow S. y Marita C. (2006) Recomendaciones para mantener la calidad postcosecha del jitomate. <http://www.postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Español/Tomate.shtml>
- Tomatada de Canada (2008) <http://lgpolar.com/page/read/561>
- Uribe G. (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 (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. Mexico D.F.
- 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.
- Xoconostle C. Beatriz, Medrano R. Roberto. (2002) Impacto de la biotecnología agrícola en cultivos: el caso de las micorrizas. Avance y perspectiva 21: 263-266

- 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.
- Zaady, E. y Okon, Y. (1990) Cultural Conditions affecting *Azospirillum brasilense* cell aggregation and adsorption to maize roots. *Soil. Biol. Biochem.* 22:1103-1107.
- 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

**ANEXO 1****Medios de Cultivo**

1) Medio Nfb semisólido

<b>Formulación</b>	<b>1000 mL</b>
Acido succínico	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (10%)	10 mL
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (4%)	10 mL
NaCl (2%)	10 mL
CaCl (1%)	4 mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0.002 g
FeCl <sub>3</sub> (4%)	0.002g
Biotina (0.01%)	2 mL
Azul de bromotimol (0.5%)	4 mL
Agar	1.8 g
pH	7.0

2) Medio Minimo (Medio Malato Sales )

<b>Formulación</b>	<b>1000 mL</b>
Acido málico	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (10%)	10 mL
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (4%)	10 mL
NaCl (2%)	10 mL
CaCl (1%)	4 mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0.002 g
FeCl <sub>3</sub> (4%)	0.002g
Biotina (0.01%)	2 mL
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
pH	7.0

3) Gelosa Nutritiva

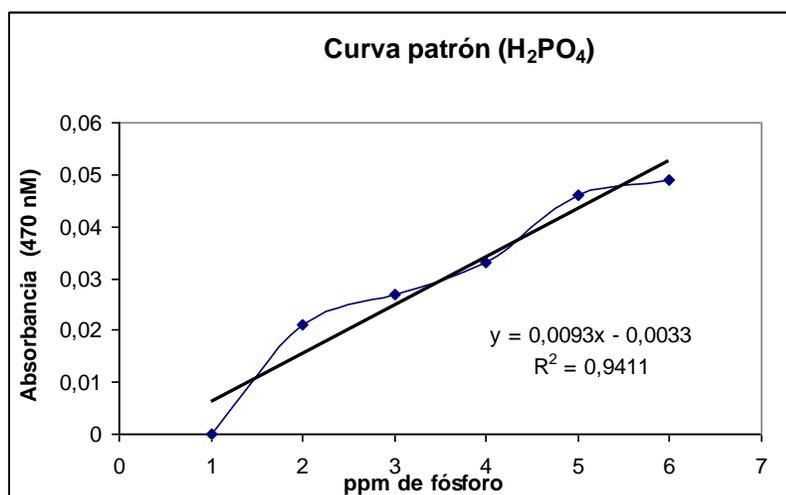
<b>Formulación</b>	<b>1000 mL</b>
Extracto de res	3 g
Peptona de carne	5 g
Grenetina	120 g

## Anexo 2

### Análisis estadístico

Curva Patrón para determinar el contenido de fósforo (ppm) en parte aérea

ppm fósforo	Absorbancia (470nm)
1	0,21
1,5	0,27
2	0,33
2,5	0,46
3	0,49
3,5	0,65



Tukey HSD test; variable ppm P / g tejido vegetal (Análisis estadístico N y P en tejido vegetal) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00000, df = 4.0000

	Tratamiento	{1} - .05070	{2} - .05121	{3} - .05090	{4} - .05129
1	T - M		<b>0.010628</b>	0.199090	<b>0.006503</b>
2	T + M	<b>0.010628</b>		0.057207	0.789274
3	AZm5 - M	0.199090	0.057207		<b>0.028262</b>
4	AZm5 + M	<b>0.006503</b>	0.789274	<b>0.028262</b>	

Los datos en el cuadro sombreado indican diferencia estadísticamente significativa.

Tukey HSD test; variable %N / g tejido vegetal (Análisis estadístico N y P en tejido vegetal) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .02372, df = 4.0000

	Tratamiento	{1} - 0.0000	{2} - 1.8170	{3} - 1.4280	{4} - 2.4550
1	T - M		<b>0.001218</b>	<b>0.002785</b>	<b>0.000527</b>
2	T + M	<b>0.001218</b>		0.194011	<b>0.047367</b>
3	AZm5 - M	<b>0.002785</b>	0.194011		<b>0.009188</b>
4	AZm5 + M	<b>0.000527</b>	<b>0.047367</b>	<b>0.009188</b>	

Los datos en el cuadro sombreado indican diferencia estadísticamente significativa.

Tukey HSD test; variable ppm P / g tejido vegetal (Análisis estadístico N y P en tejido vegetal) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00000, df = 4.0000

	Tratamiento	{1} - .05070	{2} - .05121	{3} - .05090	{4} - .05129
1	T - M		<b>0.010628</b>	0.199090	<b>0.006503</b>
2	T + M	<b>0.010628</b>		0.057207	0.789274
3	AZm5 - M	0.199090	0.057207		<b>0.028262</b>
4	AZm5 + M	<b>0.006503</b>	0.789274	<b>0.028262</b>	

Los datos en el cuadro sombreado indican diferencia estadísticamente significativa.

Tukey HSD test; variable %N / g tejido vegetal (Análisis estadístico N y P en tejido vegetal) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .02372, df = 4.0000

	Tratamiento	{1} - 0.0000	{2} - 1.8170	{3} - 1.4280	{4} - 2.4550
1	T - M		<b>0.001218</b>	<b>0.002785</b>	<b>0.000527</b>
2	T + M	<b>0.001218</b>		0.194011	<b>0.047367</b>
3	AZm5 - M	<b>0.002785</b>	0.194011		<b>0.009188</b>
4	AZm5 + M	<b>0.000527</b>	<b>0.047367</b>	<b>0.009188</b>	

Los datos en el cuadro sombreado indican diferencia estadísticamente significativa.