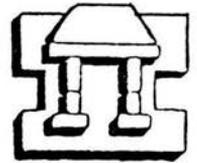




UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA



IZTACALA

**Evaluación del efecto de *Azospirillum* sobre el
rendimiento de *Lycopersicon esculentum* (bajo
condiciones controladas).**

BO 1343/97
Ej. 1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :
MARIA DEL CARMEN URZUA HERNANDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

U.N.A.M.

CAMPUS IZTACALA

**Evaluación del efecto de *Azospirillum* sobre el rendimiento de *Lycopersicon
esculentum* (bajo condiciones controladas).**

María del Carmen Urzúa Hernández

8711014-8

Generación 92-95

Domicilio:

Calle 15 # 146 colonia Pro-Hogar

Vo. Bo. M. en C. Rosa María Ramírez Gama
Director de tesis.

GRACIAS:

A los sinodales de este trabajo por revisar y contribuir para el mejoramiento de este trabajo. Sus sugerencias y correcciones fueron muy útiles en mi formación.

A la M. en C. Rosa María Ramírez Gama por todo el entusiasmo y esfuerzo puesto en este trabajo, por su apoyo y por la confianza que me brindó en todo momento.

A mis padres porque sin ellos nada hubiera sido posible, por ser mis guías, mis primeros maestros y ante todo mis amigos.

A mis hermanos Ariadna, Jovita, Alfredo, Jacqueline y Héctor, a mis cuñados Angel y Fausto así como a Maribel por compartir mi vida, desesperaciones y triunfos.

A la M. en C. Martha Salcedo Álvarez por sus consejos y ayuda brindada a lo largo de la carrera por ser más que una maestra, gracias por su amistad.

A todos mis compañeros del grupo 91 con quienes compartí el difícil camino para llegar a nuestra meta.

A Alonso Vilches por toda tu ayuda para las consultas en Internet, por tu tiempo para enseñarme a usar la computadora y por ser mi amigo.

Al Sr. Javier Aragón y su esposa Alfonsina por facilitarme el insecticida empleado y por la información del cultivo de jitomate en el campo al cual ha dedicado gran parte de su vida.

A la M. en C. Ma. Eugenia Ceballos por su asesoría en la parte estadística, una parte fundamental en mi trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio de Microbiología Experimental que dejaron un granito de su trabajo y esmero en la realización de este trabajo.

GRACIAS:

A Valentín por todos los momentos compartidos, por tu ayuda siempre incondicional y ante todo por ser mi amigo en todo momento.

A Rosalba porque juntas compartimos todo el tiempo de trabajo y la espera para poder obtener el título.

A la M. en C. Ma. Guadalupe Tsuzuki Reyes por aclarar mis dudas y por las aportaciones hechas para la realización de este trabajo y por ser una maestra ejemplar.

A la Q.F.B. Beatriz Luna Millán por su ayuda para mi formación, por sus consejos y por inyectar en mí el espíritu de lucha ante la adversidad.

A el Biól. Gabriel Martínez y al M. en C. Guillermo Ávila Acevedo por ser mis maestros y amigos.

A la UNAM por brindarme un lugar y la oportunidad de superarme y llegar a ser alguien en la vida.

A Miriam Novelo y Gabriel Campos por ser hermanos de andanzas y por compartir el arte del Tunar.

A la Tuna Femenil de la Facultad de Psicología por los momentos tan divertidos y por todas las satisfacciones obtenidas. ¡Aupa Tuna!

INDICE

	Página
1.0 Resumen	3
2.0 Introducción	4
3.0 Antecedentes	6
3.1 <i>Azospirillum</i>	6
3.2 Efecto de la colonización de <i>Azospirillum</i> sobre las plantas	7
3.3 Colonización de las raíces por <i>Azospirillum</i>	7
3.4 Mecanismos de acción	8
3.5 Efecto de la inoculación sobre el desarrollo de las plantas	8
3.6 Especificidad de <i>Azospirillum</i>	9
3.7 <i>Lycopersicon esculentum</i>	10
3.8 Inoculación de <i>Azospirillum</i> en jitomate	12
4.0 Objetivos	14
5.0 Material y Métodos	15
6.0 Resultados y Discusión	24
7.0 Conclusiones	34
8.0 Recomendaciones	35
9.0 Bibliografía	36
Anexo 1	41
Anexo 2	45
Anexo 3	59

1.0 RESUMEN

La pérdida de nitrógeno en el suelo limita el desarrollo de la agricultura, lo cual condujo a la búsqueda de fuentes que provean de este elemento como son los fertilizantes químicos nitrogenados y microorganismos fijadores de nitrógeno.

El empleo de fertilizantes químicos nitrogenados proporciona buenos rendimientos, sin embargo, su costo elevado así como la contaminación de mantos freáticos son una limitante de su aplicación. La aplicación de microorganismos fijadores de nitrógeno simbióticos o de vida libre presenta las siguientes ventajas: No contamina, tiene bajo costo, es de fácil manejo y aprovecha microorganismos que son un recurso renovable.

Uno de los microorganismos que se ha estudiado no solo por ser fijador de nitrógeno, sino también por su capacidad de producir fitohormonas y mejorar la absorción de minerales y agua en la planta es *Azospirillum*. Este microorganismo se asocia con pastos forrajeros y silvestres, gramíneas, cereales y legumbres, lo cual sitúa a *Azospirillum* como un microorganismo con mayores posibilidades de explotación.

La potencialidad de la inoculación de *Azospirillum* condujo a la realización del presente trabajo, en el cual se propone comparar y evaluar el efecto de cinco cepas de esta bacteria sobre el rendimiento de jitomate (*Lycopersicon esculentum* var. bola), dado que en la literatura sólo existen reportes de investigaciones realizadas hasta los 45 días de desarrollo, es decir, antes del inicio de la floración.

Se estudiaron cuatro cepas locales y una cepa de referencia, las cuales se compararon con un testigo. Los parámetros medidos fueron altura de la planta, diámetro del tallo, longitud de la raíz, peso fresco, peso seco, nitrógeno total (en planta), clorofila y rendimiento en diferentes etapas de desarrollo. Por otro lado, se comprobó la presencia de *Azospirillum* en las raíces infectadas.

Los resultados obtenidos indican que : a) no existe especificidad de *Azospirillum* por su hospedero, b) con las cepas VS1, VS9 y C4 se obtuvieron incrementos significativos en la altura de las plantas y longitud de la raíz, c) la cepa de referencia Cd (ATCC 29710) muestra incrementos significativos en los mismos parámetros, sin embargo, dicho incremento es menor al observado con las cepas señaladas anteriormente, d) la cepa VS7 presenta un comportamiento similar al observado con Cd, y e) aún cuando la producción fue escasa, con la cepa VS1 se presentó un incremento del 33.57%, en tanto que con las cepas restantes hubo un decremento respecto al testigo.

2.0 INTRODUCCIÓN

La producción agrícola enfrenta el reto de crecer a un ritmo adecuado para satisfacer la demanda de una población mundial que crece aceleradamente. La FAO anticipa que se debe incrementar la producción, para lo que se debe considerar el aumento de tierras cultivables así como el mejoramiento de técnicas agrícolas, lo cual en conjunto conduzca al mejoramiento en el rendimiento de las cosechas. (Guiller y Cadish, 1995). Esto ha conducido a los investigadores de diversos campos relacionados con la agricultura a buscar alternativas para obtener más y mejores alimentos.

La agricultura se enfrenta a una grave problemática por el continuo agotamiento de las fuentes de nitrógeno del suelo, lo que ha dado lugar a un creciente interés para conservar y aumentar la reserva de este nutrimento. De este modo, para aumentar la producción de los campos de cultivo, éstos se han fertilizado con compuestos inorgánicos de nitrógeno que se obtienen a partir de la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, observándose buenos resultados con ésta práctica. A pesar de ello, los fertilizantes químicos presentan algunos inconvenientes como son: a) requerimientos de una industria sofisticada, b) un alto costo desde el punto de vista energético, c) elevados precios de transporte, d) contaminan el ambiente y e) parte del nitrógeno incorporado se pierde a través de procesos tales como la lixiviación y la desnitrificación (Calderón, 1995).

Debido a los inconvenientes que presentan los fertilizantes químicos, se ha pensado en la utilización de organismos que poseen la facultad de fijar nitrógeno, tales como las algas azul-verdes, bacterias de vida libre y simbióticas para la elaboración de fertilizantes biológicos (Calderón, 1995).

La fijación biológica de nitrógeno contribuye a la productividad en forma directa e indirecta. De forma directa cuando el nitrógeno fijado es almacenado en los granos ó en otro alimento para el consumo animal ó humano. De manera indirecta contribuye al mantenimiento y mejoramiento de la fertilidad del suelo en los sistemas agrícolas (Guiller y Cadish, 1995).

Entre los microorganismos más estudiados y empleados como fertilizantes biológicos se encuentran *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* que fijan nitrógeno atmosférico en simbiosis con plantas de la familia Leguminosae; estos microorganismos son capaces de asociarse con más de 1130 especies de leguminosas, de las cuales 200 especies son cultivadas por el hombre. Este tipo de biofertilizantes se ha empleado con buenos resultados (Calderón, 1995; Stacey *et al.*, 1992).

Sin embargo, dada la especificidad de esta simbiosis, se inició la búsqueda de otros microorganismos que fuesen más “versátiles” tanto en función como en especificidad. Uno de los pasos más importantes en esta búsqueda fue dado por Döbereiner al descubrir la relación de la bacteria *Azospirillum* con las raíces de algunos pastos forrajeros y gramíneas (Tarrand *et al.*, 1978).

A partir de entonces, *Azospirillum* ha sido aislado de gran cantidad de pastos silvestres y cultivados, cereales y legumbres, así como de diferentes suelos ubicados en regiones tropicales, subtropicales y templadas (Döbereiner, 1983).

Dada la amplia distribución de *Azospirillum*, la explotación de cepas aún no descubiertas puede ser una fuente útil de nuevas y mejores asociaciones. De esta forma se ha experimentado con algodón, mostaza, pimienta y jitomate, encontrándose que la presencia de la bacteria favorece la elongación de raíces (Bashan *et al.*, 1991).

Estudios encaminados a encontrar los mecanismos por los cuales *Azospirillum* favorece el desarrollo de los vegetales indican que esta bacteria, además de fijar nitrógeno, produce fitohormonas, produce una nitrato reductasa en el sistema radical, con la consecuente producción de nitritos, mejora el ascenso de minerales y agua y produce otras enzimas que conducen al debilitamiento del tejido cortical (Ramírez-Gama y Luna-Millán, 1995).

El jitomate es un fruto de origen americano que se cultiva en México en gran escala propiciado que al paso de los años y con el surgimiento de una importante industria conservera, se ha convertido en una fuente de comercio constante y de buenas ganancias (Bosso y Serafini, 1981). Como muestra de lo anterior, a continuación se exponen datos de los dos últimos años referentes a la producción y exportación de fruto, así como de las cantidades que se procesan en el país para la obtención de puré.

En el ciclo otoño/invierno 95/96 se produjeron 1,097,913 toneladas y en el ciclo primavera/verano (marzo-septiembre) la producción fue de 311, 359 toneladas, (SAGAR, 1996). De enero a septiembre de 1996, la cotización en dolares para diferentes variedades de jitomate fue: Bola 0.91 dolares/kg, Cherry 0.89 y Saladette 0.91; mediante la exportación de estas variedades se obtuvieron 462,651,000 dólares. En este mismo período, la venta de puré enlatado generó \$428, 624,000 pesos por un volumen de 82, 930 toneladas, (INEGI, 1996; SAGAR, 1996).

Dada la importancia de este cultivo en nuestro país, con este trabajo se busca una alternativa para mejorar el cultivo de jitomate y que a la vez disminuya la contaminación del suelo producida por el uso de fertilizantes químicos. Este trabajo forma parte de un proyecto integral que actualmente (1997) se desarrolla en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química: y que comprende estudios sobre la inoculación de *Azospirillum* en jitomate cultivado en hidroponia y en presencia de suelo, así como la determinación de fitohormonas producidas por esta bacteria.

3.0 ANTECEDENTES

3.1 *Azospirillum*

Las bacterias del género *Azospirillum* son bacilos vibrioides ó rectos, cuyo diámetro es de 0.9 a 1.2 μm , gram negativas o gram variables. Presentan en su interior gránulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB). Los microorganismos se mueven mediante un flagelo polar y con un movimiento típico helicoidal o vibratorio en medio líquido. Su temperatura óptima de crecimiento es de 34-37°C. Algunas cepas crecen bien a un pH de 7, mientras que otras prefieren condiciones más ácidas (Holt *et al.*, 1994)

La primera especie de *Azospirillum* fue aislada por Beijerinck (1925) a partir de suelos pobres en nitrógeno siendo originalmente llamada *Spirillum lipoferum*. Tarrand *et al.*, (1978) propusieron a *Azospirillum* como un nuevo género y distinguieron dos especies: *A. brasilense* y *A. lipoferum*, basándose en diferencias morfológicas y fisiológicas entre varias cepas y experimentos de homología de DNA. Posteriormente, se descubrieron otras tres especies: *A. amazonense*, *A. halopraeferans* y *A. irakense* (Döbereiner, 1983; Stacey *et al.*, 1992).

Azospirillum es un microorganismo fijador de nitrógeno. Crece en condiciones de microaerofilia cuando utiliza al N_2 como fuente de nitrógeno. En condiciones aerobias crece únicamente en presencia de una fuente de nitrógeno fijado como es el caso del cloruro de amonio. Posee un metabolismo respiratorio, utiliza al oxígeno y algunas cepas al NO^3^- como aceptores finales de electrones. Puede presentar una capacidad fermentativa muy débil. Son microorganismos quimioorganotróficos, aunque algunas cepas son autótrofas. Se desarrolla abundantemente con sales de ácidos orgánicos, como malato, succinato, lactato y piruvato; algunos carbohidratos pueden utilizarse como fuente de carbono. Algunas cepas requieren de biotina para su crecimiento. Su hábitat natural es el suelo. Algunas especies son de vida libre y otras viven en asociación con las raíces de cereales, pastos forrajeros y tubérculos (Holt *et al.*, 1994).

La distribución ecológica de *Azospirillum* es muy amplia; ha sido aislada a partir de suelos tropicales, subtropicales y templados en diferentes lugares del mundo como India, Sudáfrica, Brasil, Israel, Filipinas, Egipto, Bélgica, Colombia, Argentina, España, Francia y México entre otros (Flores, 1985; Mascarúa *et al.*, 1988; Vande *et al.*, 1993). Se han aislado cepas de una gran variedad de vegetales, reportándose en asociación con monocotiledóneas tales como maíz, sorgo, arroz, caña de azúcar y algunos pastos forrajeros como *Digitaria*; asimismo se ha aislado de algunas dicotiledóneas como jitomate, algodón y soya (Stacey *et al.*, 1992; Mohandas, 1988).

Dada la amplia gama de vegetales con los cuales *Azospirillum* puede asociarse, actualmente se realiza una gran cantidad de estudios acerca de su fisiología, su interacción con las raíces y su potencial benéfico en la agricultura.

3.2 EFECTO DE LA COLONIZACIÓN DE *Azospirillum* SOBRE LAS PLANTAS.

La inoculación con *Azospirillum* ocasiona cambios significativos en varios parámetros del crecimiento de las plantas, los cuales pueden o no afectar la producción (Bashan *et al.*, 1990).

Estudios sobre la asociación *Azospirillum*-gramínea indican que la inoculación con esta bacteria da lugar a:

- Incrementos significativos en la elongación y diámetro de raíces inoculadas en sistemas hidropónicos (Murphy, 1997).
- Incremento del peso seco de la planta y de la cantidad de nitrógeno en plántulas y granos.
- Floración temprana
- Incremento en el número de espigas y de granos por espiga, número de mazorcas y peso seco de los granos.
- Plantas más altas y hojas más grandes
- Promedios de germinación más elevados (Baldani *et al.*, 1980; Bitton, 1980; O'Hara *et al.*, 1981; Bashan *et al.*, 1989a).

Experimentos en invernadero y campo diseñados para documentar los efectos benéficos de *Azospirillum* sobre el crecimiento de las plantas han dado resultados contradictorios. En algunos estudios se reporta el aumento de uno o varios de los parámetros antes indicados, en tanto que en otros se reporta un efecto detrimental (Bashan y Levanovy, 1990; Ramírez-Gama y Luna Millán, 1995). El efecto de la inoculación con *Azospirillum* sobre la producción de gramíneas en cultivos en campo generalmente es de un aumento del 10 al 30% (Kapulnik, 1987), aunque algunos reportes indican aumentos en producción de hasta 270% en comparación con los controles no inoculados. Otros reportes indican incrementos moderados en la producción (aproximadamente 20%) y algunos otros no han registrado respuesta, razón por la que se requiere de un mayor número de investigaciones para la posible utilización de este tipo de biofertilizantes en la agricultura (Kapulnik, 1987; Bashan y Levanovy, 1990).

En general, se ha puesto mayor atención en el efecto que *Azospirillum* produce en el desarrollo de la raíz, así como en la forma en que la bacteria la infecta.

3.3 COLONIZACIÓN DE LA RAÍZ POR *Azospirillum*.

Azospirillum responde quimiotácticamente a una gran variedad de aminoácidos y ácidos orgánicos y a diferentes concentraciones de mono y polisacáridos, los cuales se presentan de forma natural en los exudados de las raíces (Zaady *et al.*, 1993). Las células de *Azospirillum* son adsorbidas a la raíz en un medio acuoso; éstas colonizan las raíces externa e internamente, en forma de pequeños agregados o de células independientes, lo que depende de la cepa bacteriana, la especie de la planta, las condiciones ambientales y otros factores no identificados (Stacey *et al.*, 1992).

En cereales, la colonización se realiza preferencialmente en la superficie de la raíz y sólo algunas bacterias se adhieren a los pelos radicales. En las raíces de jitomate y soya, *Azospirillum* se distribuye como células aisladas, en tanto que en pimienta forma microagregados (Bashan *et al.*, 1989b). Zaady *et al.* (1993) encontraron que la fuente de carbono empleada en la propagación de *Azospirillum*, influye en la adhesión de las bacterias a las raíces, así como sobre el crecimiento de las mismas.

Respecto a la interacción con las plantas, en todos los casos se reportan: a) grandes cantidades de una sustancia mucilaginosa sobre la superficie de la raíz, b) material fibrilar mediante el cual las células bacterianas se “anclan” a la superficie de la raíz y establecen conexiones con otras bacterias dentro de los agregados que forman (Bashan *et al.*, 1991).

3.4 MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Azospirillum* SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS.

El principal mecanismo de acción por el cual *Azospirillum* mejora el crecimiento de las plantas no ha sido determinado. Sin embargo, se han propuesto varios mecanismos de acción que corresponden a:

- Fijación de nitrógeno, mediante el cual la bacteria contribuye al aporte de nitrógeno para la planta.
- Producción de hormonas que alteran el metabolismo y crecimiento de la planta, lo que probablemente mejora el desarrollo de todo el sistema radical, favoreciendo de este modo, la absorción de minerales y de agua, y consecuentemente el crecimiento general de la planta.
- Síntesis de la nitrato reductasa bacteriana a nivel de la raíz, lo cual incrementa la acumulación de nitrógeno en plantas inoculadas (Kapulnik *et al.*, 1985; Bashan y Levanovy, 1990).

3.5 EFECTO DE LA INOCULACIÓN SOBRE EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS.

El efecto más acentuado de la inoculación de *Azospirillum* en las plantas, se manifiesta a través de cambios morfológicos del sistema radical. La inoculación de cultivos tales como trigo, maíz, sorgo y *Setaria* con varias cepas de *Azospirillum* causa cambios en la morfología radical (densidad de pelos radicales, elongación y área superficial de la raíz) inmediatamente después de la germinación (Okon y Kapulnik, 1986, Vande *et al.*, 1993, Murphy, 1997).

Estos cambios están directamente relacionados con la concentración del inóculo. Concentraciones menores a 10^5 células/g de inoculante no tienen efecto; concentraciones de 10^5 - 10^8 células/g de inoculante ocasionan los cambios antes descritos, en tanto que inóculos de 10^8 - 10^{10} células/g generalmente inhiben el desarrollo de la raíz. (Okon, 1985).

Por otra parte, se tiene que el nivel óptimo de inóculo varía para diferentes plantas, Bashan y Levanovy (1990), citan los niveles óptimos reportados por diferentes autores: 10^5 - 10^6 UFC/ml para diversos cereales, 10^7 UFC/ml* para maíz, y $>10^8$ UFC/ml para jitomate *in vitro*. Es necesario puntualizar que en estos trabajos no se reporta la cantidad de bacterias que quedan adheridas por semilla.

*UFC = Unidades formadoras de colonias. Se asume que cada microorganismo da lugar a una colonia.

El efecto de *Azospirillum* sobre la raíz se manifiesta en varios parámetros de la misma, produciendo el incremento en la longitud, particularmente de las zonas de elongación; aumento en el número y longitud de las raíces laterales, aparición temprana de los pelos radicales, así como un aumento en su número y densidad, lo que en conjunto da lugar al incremento del volumen radical, área superficial y el peso seco de la raíz. Asimismo, se ha observado un aumento de la división celular en el meristemo de la raíz, un cambio en el arreglo celular de la corteza y cierta estimulación del exudado de la raíz (Bashan y Levanov, 1990).

Otro efecto de la inoculación con *Azospirillum* es el incremento en el nivel endógeno de ácido indol acético (IAA) en raíces durante las dos o tres primeras semanas de crecimiento (Zaady *et al.*, 1993). Estudios *in vitro* han permitido demostrar que diferentes cepas de *Azospirillum brasilense* son capaces de producir fitohormonas como citocininas, giberelinas y auxinas. Tien *et al.* (1979) citado por Hartmann indica que el efecto de *Azospirillum* sobre el crecimiento de la raíz y el peso de la planta en pastos es parecido al que se obtiene con la adición de una mezcla de auxinas, giberelinas y cinetinas (Hartmann *et al.*, 1983). Sin embargo, todavía no hay evidencia directa que demuestre que los procesos hormonales tienen lugar en el suelo y la rizósfera, y el efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre los niveles de auxinas endógenas en las raíces de pastos está aún en estudio. En este tipo de investigaciones, los niveles de auxinas son determinados por el método de fluorescencia; los niveles detectados de IAA en raíces es apenas de nanogramos por gramo de peso seco de la raíz, lo que dificulta establecer diferencias en el contenido de IAA entre las raíces inoculadas con *Azospirillum* y los controles no inoculados. Por otra parte, también es conveniente investigar la producción de este tipo de sustancias por las mismas raíces de las plantas como respuesta a la colonización por *Azospirillum* (Okon y Kapulnik, 1986).

3.6 ESPECIFICIDAD DE *Azospirillum*.

Uno de los aspectos más controvertidos de *Azospirillum* es el de su especificidad por hospederos. Al inicio de las investigaciones de *Azospirillum*, se sugirió que las plantas C3 y C4 respondían de diferente manera a la inoculación con esta bacteria, reportando en zonas tropicales a *A. lipoferum* como la especie colonizadora predominante en las plantas C4 y *A. brasilense* como la especie predominante en plantas C3, (Tarrand *et al.*, 1978; Baldani y Döbereiner, 1980). Resultados similares fueron reportados en zonas templadas (Haatela, 1983).

Algunos autores reportan que el aumento de la producción de granos sólo se presenta en los casos en que se inoculan cepas homólogas -aisladas del mismo tipo de vegetal al que serán inoculadas- en tanto que otros (Baldani y Döbereiner, 1980; Boddey, 1986) indican que la inoculación con cepas heterólogas -aisladas de hospederos diferentes a los que se inoculan- se traducen en incrementos significativos en el rendimiento de grano de maíz y aumento en el crecimiento de las plantas de jitomate y berenjena (Bashan *et al.*, 1989b). Por otra parte, existen múltiples estudios en los que se ha empleado como referencia a las cepas Cd y Sp7; en estos casos se ha observado que dichas cepas infectan y afectan positivamente a vegetales de diversos géneros y especies, lo que indica que no hay especificidad por el hospedero, (Bashan y Levanov, 1990).

3.7 PLANTA DE ESTUDIO.

Lycopersicon esculentum

La planta en estudio *Lycopersicon esculentum* es originaria de América, todas las especies silvestres relacionadas con esta planta son nativas de la región de los Andes ubicada actualmente en parte de Chile, Perú, Colombia, Ecuador y Bolivia. Sin embargo, México fue el centro de domesticación, conociéndose en náhuatl como tomatl, este fue utilizado por los aztecas como alimento y medicamento. Con la conquista, el jitomate fue llevado a Europa como un fruto curioso, pero este se consideró no apto para el consumo humano (Rick,1978).

El cultivo del jitomate con fines comerciales y alimenticios se inició en el siglo pasado. Con el surgimiento de la industria conservera, el jitomate alcanzó importancia como cultivo de campo, constituyéndose en una fuente constante de comercio y buenas ganancias (Bosso y Serafini, 1981).

El tallo del jitomate es herbáceo, rastrero por naturaleza, cuando no posee ningún sostén. Los tallos, las hojas y los frutos jóvenes están recubiertos por dos clases de pelos: simples y glandulares, coronados por cuatro células que contienen un aceite volátil (que confiere su olor a la planta). Según las variedades se observan numerosas variaciones en la forma y color de los frutos (Messiaen, 1975).

3. 7. 1 Condiciones de crecimiento

El jitomate se cultiva mayormente en clima semicálido bastante moderado, es muy sensible al frío y moderadamente resistente a la sequía (Bosso y Serafini,1981). El crecimiento de la planta es mayor cuando las temperaturas máximas diarias son superiores a las mínimas en 10°C, pero siempre iguales o inferiores a los 30°C. En los invernaderos del Norte de Europa, se ha demostrado que las temperaturas del orden de 28-30°C durante el día sólo son favorables si el tiempo es soleado; con cielo nublado estas temperaturas provocan un crecimiento irregular (Messiaen, 1975).

Los riegos abundantes aumentan la producción, pero disminuyen la calidad del fruto haciéndolos más acuosos (Bosso,1981).

El jitomate es una planta facultativa, florea tanto en días cortos como en días largos (Salisbury y Ross, 1992). Presenta dos épocas de producción: la primera incluye aquellas siembras realizadas en agosto, cuya producción se obtiene en diciembre y enero; la segunda época comprende las siembras hechas en febrero, cuya cosecha se inicia la primera quincena de junio. Se recomienda la siembra directa desde el 15 de enero hasta el 15 de febrero (SARH, 1984).

3. 7. 2 Requerimientos nutricionales.

El fósforo, calcio, potasio y nitrógeno tienen efectos marcados en el crecimiento y en la producción de la planta de jitomate (Mueller, 1996; Nuez, 1995).

La deficiencia de fósforo puede pasar inadvertida durante algún tiempo. El promedio de crecimiento se ve disminuido y hay una ligera coloración verde. Conforme la deficiencia progresa, se observa una coloración púrpura en el envés de las hojas que se localiza inicialmente en las venas y posteriormente avanza a las áreas comprendidas entre las venas (Mueller, 1996).

La deficiencia de fósforo se manifiesta primero en las hojas más bajas y progresa hacia las hojas más jóvenes de la parte superior. En casos severos se observa la caída de las hojas y la producción de frutos se reduce (Reyes, 1970; Mueller, 1996; Nuez, 1995).

La deficiencia de calcio se observa inicialmente en las hojas más jóvenes. El calcio es considerado como un ión inmóvil debido a que cuando el calcio es insuficiente, no hay transferencia de este elemento de las hojas viejas a las más jóvenes (Reyes, 1970; Mueller, 1996; Nuez, 1995).

La deficiencia de este elemento produce en el jitomate la podredumbre de la corona. Esta enfermedad es común en cultivos de campo y de invernadero; se caracteriza por una lesión en la corona del fruto que se presenta cuando éste tiene una coloración verde o durante la madurez. La lesión aumenta de tamaño hasta alcanzar un diámetro de 3 cm o más, mientras que, simultáneamente, los tejidos enfermos se encogen produciendo una depresión en la superficie lesionada y el fruto afectado detiene su crecimiento. El color se oscurece y en ocasiones alcanza un aspecto negruzco. Las porciones del fruto atacadas quedan delimitadas en forma de zonas deprimidas de aspecto coriáceo y coloración oscura (Walker, 1973; Nuez, 1995).

La deficiencia de nitrógeno en el jitomate reduce el crecimiento, ocasiona amarillamiento uniforme en las hojas inferiores y reducción en la producción. Además, afecta la síntesis de aminoácidos, proteínas, clorofila, ácidos nucleicos y coenzimas (Reyes, 1970; Mueller, 1996).

La deficiencia de potasio se identifica fácilmente por necrosis (muerte del tejido) en el margen de las hojas más viejas. Esta puede ser precedida por pequeñas áreas de amarillamiento. Conforme la deficiencia progresa, las hojas más jóvenes se necrosan (Reyes, 1970; Mueller, 1996).

Pequeñas deficiencias pueden ocurrir durante la maduración del fruto. Esto es una parte normal del ciclo de crecimiento, gran parte del potasio se trasloca al fruto en desarrollo. Cuando el fruto se desarrolla en condiciones de stress de potasio, los frutos son bofos, blandos, bajos en acidez, de forma irregular y susceptibles a enfermedades de la madurez (Mueller, 1996).

3. 7. 3. Plagas que afectan al jitomate.

Las principales plagas que afectan al jitomate son:

Mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) es la plaga más común en el cultivo de jitomate en invernadero. Este insecto excreta una sustancia azucarada y pegajosa sobre la cual crece un hongo de color negro (SARH, 1984; Resh, 1992).

Pulgones: Un gran número de pulgones, entre los que se encuentran los de colores rosas, negros y verde oscuro, se alimentan de casi todas las hortalizas de invernadero. Estos insectos chupan la savia de las hojas, lo que determina el enrollamiento de las mismas, además de cubrirlas con una melaza pegajosa y transmiten diversas virosis (Resh, 1992).

Minador del jitomate (*Liriomyza brioniae*). Esta plaga es especialmente común en los trópicos. Cuando las larvas eclosionan, para alimentarse hacen túneles entre la epidermis del haz y del envés de las hojas, que reciben el nombre de mina (SARH, 1984; Resh, 1992)

3.8 INOCULACIÓN DE *Azospirillum* EN JITOMATE.

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

Mohandas en 1988 aisló bacterias a partir de raíces de jitomate esterilizadas superficialmente durante 20 minutos con cloruro de mercurio al 0.1%, lo cual indica la presencia de *Azospirillum* en la endorrizósfera y que el número de bacterias resultó de 30×10^4 por gramo de peso fresco de tejido. Estudios con microscopía de contraste de fases y electrónica revelan la presencia de bacterias en la epidermis, corteza y haces vasculares (Mohandas, 1988).

Estudios de invernadero con cepas Nif⁺ y una mutante Nif⁻ realizados por Bashan *et al* en 1989 muestran incrementos en altura de la planta en plantas de 34 días y en el diámetro del tallo, en el número de hojas, así como en el peso seco de las mismas, en plantas de 45 días de edad con ambas cepas ($p < 0.05$), por lo cual tales incrementos no se pueden atribuir a la fijación de nitrógeno (Bashan *et al.*, 1989a).

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

Dentro del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM se han realizado diferentes trabajos sobre *Azospirillum* entre los cuales destacan:

1. Aislamiento y caracterización de cepas de *Azospirillum* procedentes de raíces de trigo, maíz, sorgo y pasto Pangola, muestreados en diferentes estados de la República. Los resultados de estos estudios permitieron:

- Integrar una pequeña colección de cepas de *Azospirillum* e identificar la especie a la que pertenecen (Flores, 1985).
 - Establecer que las cepas aisladas, aún cuando pertenezcan a la misma especie, varían en cuanto a su capacidad para fijar nitrógeno y reducir nitratos (Flores, 1985), así como en su sensibilidad a biocidas (Gutiérrez, 1987).
2. Evaluación del efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre el desarrollo de trigo, maíz y sorgo; en experimentos realizados a nivel de invernadero y de campo. Los resultados obtenidos indican:
- Que no existe especificidad entre la bacteria y el hospedero, observándose por ejemplo: que cepas aisladas de maíz fueron capaces de infectar no sólo al maíz, sino también a otros hospederos como el trigo y el sorgo (Jiménez, 1986; Ramos, 1987; Otake, 1985) y que su capacidad para inducir la acumulación de biomasa no está relacionada con la capacidad fijadora de nitrógeno determinada *in vitro*.
 - A pesar de la carencia de especificidad, al inocular seis genotipos de trigo (Salamanca, Saturno, Temporalera, Romana, Marte y Verano) se demostró que existe afinidad entre algunas cepas de *Azospirillum* (C4 y Cd) y ciertos genotipos de trigo (Saturno, Temporalera y Marte), lo que se tradujo en valores más altos respecto al testigo no inoculado, en los siguientes parámetros: altura, peso seco de la parte aérea y de la raíz (Vidal, 1995).
 - En relación a los experimentos con maíz, los resultados son inconsistentes, observándose en cuatro ciclos de cultivo amplias variaciones en el efecto producido por las cepas probadas, de este modo la cepa VT1 durante el primer ciclo indujo un incremento del 13%, con respecto al testigo absoluto; en el segundo ciclo la inoculación tuvo un efecto detrimental, en tanto que en el tercero y cuarto determinó un aumento en el rendimiento de 1 y 6% respectivamente (Otake, 1985).
 - Respecto al sorgo, se evaluó el efecto de la inoculación de cinco cepas sobre el desarrollo en diferentes etapas del cultivo y sobre el rendimiento; en este caso no hubo diferencias estadísticamente significativas en altura ni área foliar determinadas a los 20, 40 y 60 días después de la siembra; en tanto que las cepas VS1, VS7 y VS9 indujeron mayor peso seco de la parte aérea de la planta en anthesis y en grano lechoso y a la cosecha se observó que las cepas VS7 y VS9 determinaron un incremento en el rendimiento de grano de 88 y 66% respectivamente en comparación con el testigo (Valtierra, 1992).
3. Producción de biofertilizantes:
- Selección de materia prima barata y disponible a fin de elaborar un medio de cultivo idóneo que permita obtener poblaciones elevadas de *Azospirillum* en el menor período de tiempo y que a su vez, permita conservar las características agronómicas de las cepas.
 - Selección del soporte que asegure la viabilidad de las cepas por un período prolongado y que sea de fácil manejo en condiciones agrícolas.

Estudios preliminares permitieron establecer la cinética de crecimiento de diferentes cepas de *Azospirillum* en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono (Hernández, 1991; Urzúa, 1995); determinándose además la sobrevivencia de la bacteria con diferentes soportes (Hernández y Ruíz, 1987).

4.0 OBJETIVOS

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

◆ OBJETIVO GENERAL:

Seleccionar cepas de *Azospirillum* que incrementen la producción de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) en cultivo hidropónico e invernadero en un ciclo de producción.

◆ OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Evaluar el efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre germinación.
2. Evaluar el efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre longitud de la raíz, diámetro del tallo, altura de la planta, peso fresco, peso seco, contenido de nitrógeno en planta, área foliar y contenido de clorofila en diferentes periodos de desarrollo.
3. Verificar la infección de raíces de jitomate por cepas heterólogas de *Azospirillum*.
4. Evaluar el efecto de la inoculación de cepas locales sobre el rendimiento en fruto del jitomate (*Lycopersicon esculentum* var. bola) bajo condiciones controladas en cultivo hidropónico con temperatura y humedad controladas.

5. 0 MATERIAL Y METODOS

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

El programa de trabajo desarrollado se esquematiza en la Figura 1.

♦ Preparación de inoculantes. (Figura 2)

Se emplearon cinco cepas del género *Azospirillum* pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM. La clave y procedencia de las mismas se describen a continuación:

Cd *A. brasilense* ATCC 29710 (Cepa de referencia donada por el Doctor Y. Okon). Aislada de *Cynodon dactylon*.

C4 *A. brasilense*. Aislada de trigo en Celaya, Gto.

VS1 *A. lipoferum*. Aislada de sorgo en Valle de Santiago, Gto.

VS7 y VS9 *A. brasilense*. Aisladas de sorgo en Valle de Santiago, Gto.

Las cepas se activaron en medio Nfb semisólido (ss) * y se incubaron a 35°C durante 72 horas. Posteriormente se realizó el primer paso de adaptación, inoculando una asada del cultivo en Nfb ss en un matraz de medio Nfb líquido; la incubación se realizó a 35°C y 200 rpm durante 72 horas. A partir de este cultivo se inculó otro matraz con el mismo medio y se incubó en las condiciones antes indicadas durante 24 horas, tiempo en el que el cultivo estaba en la fase log de crecimiento (Bashan *et al.*, 1986).

El cultivo de 24 horas se ajustó a una DO de aproximadamente 0.02 (aproximadamente 10⁸ UFC/ml**) diluyendo cuando fue necesario con medio de cultivo estéril. La lectura de la DO se realizó con un nefelómetro Klett- Summerson con filtro verde.

♦ Preparación e inoculación de semillas. (Figuras 2 y 3)

Se emplearon semillas de jitomate variedad bola marca Cobo. Para eliminar el recubrimiento de biocida, las semillas se lavaron 10 veces con agua destilada estéril, en cada lavado se agitó vigorosamente.

La inoculación se realizó colocando 50 semillas de jitomate en cada uno de los cultivos de la bacteria con la población microbiana previamente ajustada, en donde se dejaron 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se determinó el número de células viables de *Azospirillum* por mililitro de inóculo y semilla (se emplearon 10 semillas) mediante la técnica de dilución y vertido en placa (Ramírez-Gama *et al.*, 1995).

* Los medios de cultivo y reactivos se describen en el anexo 1.

** UFC= Unidades formadoras de colonias. Se asume que cada microorganismo da lugar a una colonia.

FIGURA 1

PROGRAMA GENERAL DE ACTIVIDADES

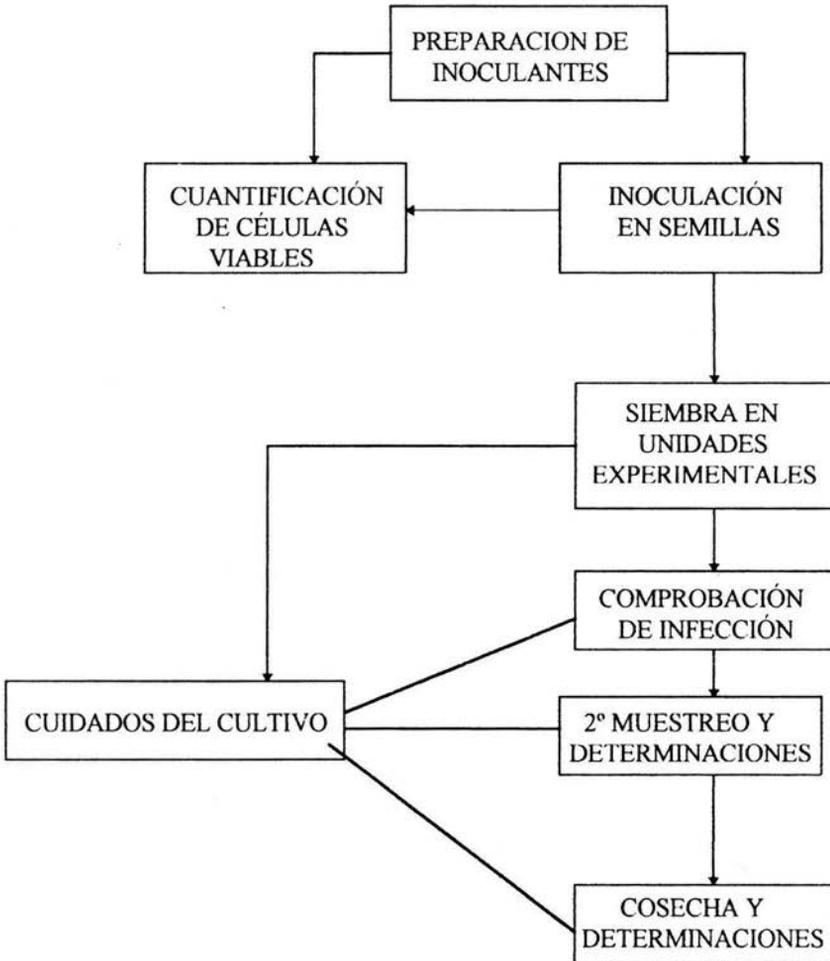


FIGURA 2. PRODUCCIÓN DE INOCULANTE Y PREPARACIÓN DE UNIDADES EXPERIMENTALES

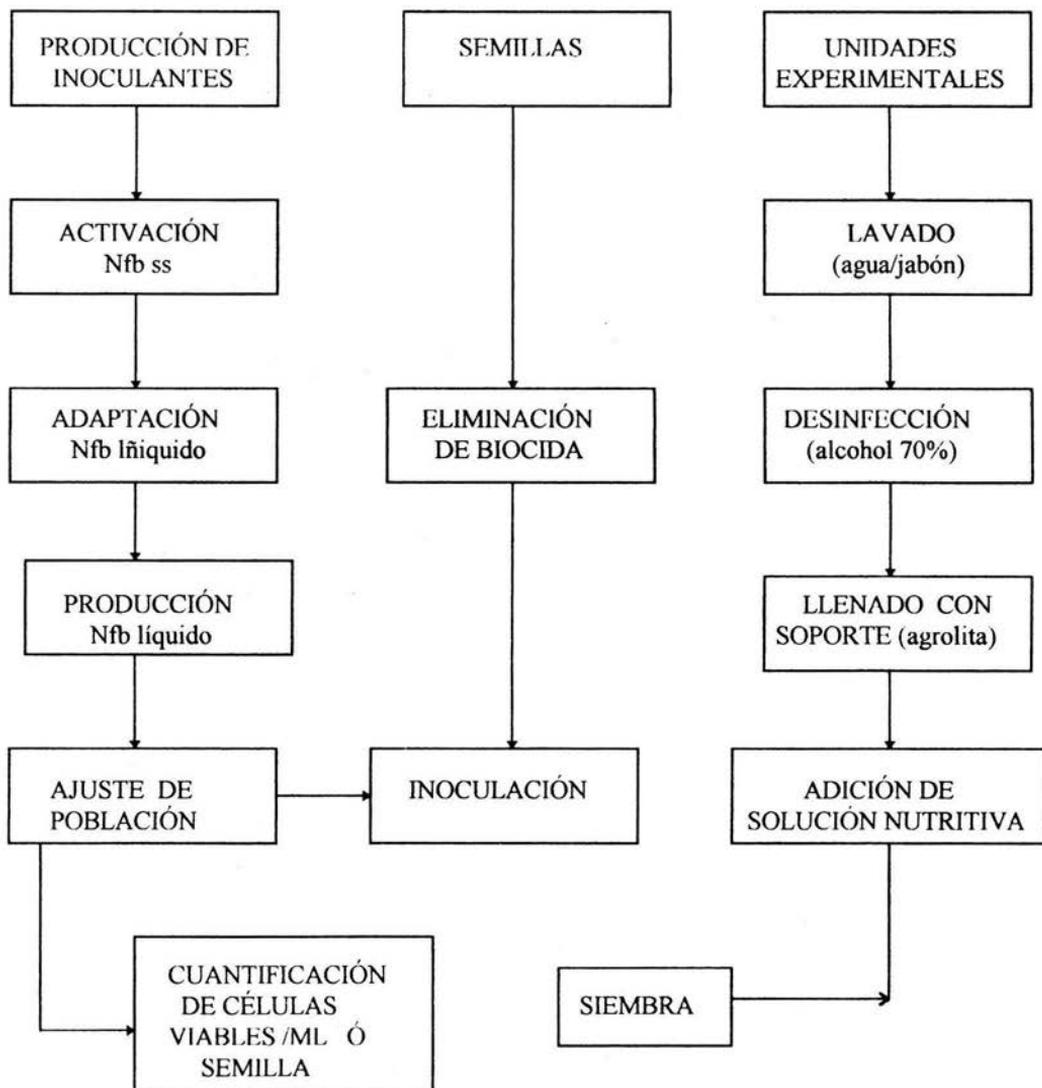


FIGURA 3
CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS VIABLES

◆ Preparación de las unidades experimentales. (Figura 2)

Se emplearon macetas con una capacidad de 10 litros (sin drenaje), desinfectadas con alcohol al 70%; en condiciones de asepsia se llenaron con agrolita estéril con un pH de 7.0. A cada maceta se le agregaron 3 litros de solución nutritiva de Knop y posteriormente se cubrieron con papel kraftin para evitar contaminación. Por cada tratamiento se ocuparon 8 macetas.

◆ Preparación del invernadero:

El invernadero se lavó con agua y jabón, posteriormente las paredes se desinfectaron con cloralex al 5%. Un día antes de introducir las macetas se desinfectó con una mezcla de permanganato con formaldehído. La temperatura se ajustó durante todo el experimento en un rango de 30/18°C (día/noche) y una humedad del 70%.

◆ Siembra. (Figura 2).

La siembra se realizó en condiciones asépticas. En cada maceta se colocaron cinco semillas inoculadas, a una profundidad de 1.5 cm. Esta operación se realizó también con las semillas sin inocular (testigo). Después las macetas se cubrieron con papel kraftin y se colocaron en el invernadero. El número de semillas germinadas se determinó entre los 5 y 15 días.

◆ Labores de cultivo:

Irrigación:

El riego se realizó de acuerdo con el tamaño de la planta, así como con las necesidades de la misma; para lo que se aplicó agua, solución nutritiva de Knop o agua más calcio estériles (v. tabla 1)

TABLA 1. Calendario de riego.

Días de desarrollo de la planta	Frecuencia de riego	Tratamiento de riego alternado
0-30	Cada 7 días	Agua - solución nutritiva
31-60	Cada 3 días	Agua - solución nutritiva
61-90	Cada 3 días	Agua-Solución nutritiva-Agua +calcio
90-180	Cada 3 días	Solución nutritiva (doble concentración)- solución nutritiva-agua)

La TABLA 1 muestra la frecuencia con que se efectuó el riego así como el tratamiento aplicado. El agua más calcio se utilizó para prevenir la podredumbre de la corona.

Aclareo y aporque

Se realizó a los 34 días dejando dos plantas por maceta.

Entutoramiento

A partir de los 70 días (tiempo en el que muchas de las plantas rebasaron los 60 centímetros de altura y dieron origen a los primeros racimos florales) se procedió a colocar a lo largo de las mesas estacas de madera de 1.10 m y cordones de hilaza sobre los que se apoyó el follaje y se evitó que las plantas se doblaran.

Poda

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

Control de plagas

A los 60 días se detectó la presencia *Trialeurodes vaporariorum* (mosquita blanca) por lo que se procedió a aplicar el insecticida Azuflow2, tratamiento que se repitió a los 90, 105 y 120 días.

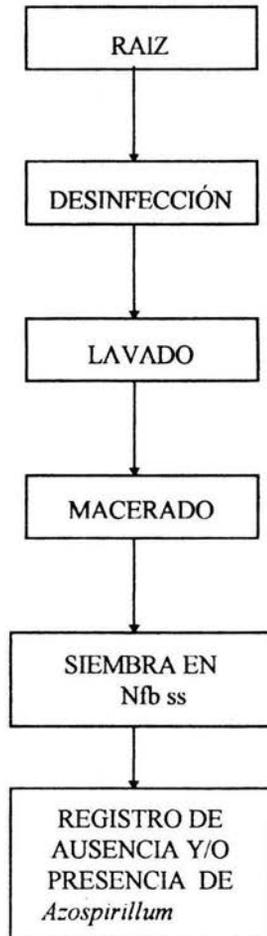
Polinización

Las flores se polinizaron cuando los pétalos de la flor se doblaron hacia abajo (estado receptivo).

◆ Comprobación de infección. (Figura 4).

Esta determinación se realizó a los 60 días, para ello se tomaron tres macetas al azar, las plantas se retiraron del sustrato, las raíces se lavaron con abundante agua corriente. El sistema radical se dividió longitudinalmente en 3 secciones: Corona, media y distal. De cada sección se tomaron varios segmentos, procurando que incluyeran raíces secundarias y pelos radiculares, éstos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% y se lavaron 10 veces con agua destilada estéril. De cada segmento se tomaron 3 fragmentos (uno de la raíz primaria, uno de la raíz secundaria y el tercero de pelos radiculares), estos se maceraron y de cada fragmento se sembraron 3 tubos que contenían el medio de cultivo Nfb ss. Se incubó a 35°C durante 72 horas y se observó la formación de la película blanca y el vire del indicador, procediendo a realizar las observaciones microscópicas correspondientes.

FIGURA 4
PRUEBA DE INFECCIÓN (60 DÍAS)



◆ Efecto de *Azospirillum* sobre el desarrollo de la planta.

Se determinaron los parámetros indicados en la tabla 2.

PARÁMETRO	TIEMPO DE DESARROLLO
Altura	34, 60 y 190 días
Diámetro del tallo	60 y 190 días
Longitud de la raíz	60 y 190 días
Contenido de clorofilas	120 días
Nitrógeno total	190 días
Área foliar, peso fresco y seco	190 días
Rendimiento	96-126 y 153-183 días

Determinación de clorofila:

De cada tratamiento y de cada una de las plantas se pesaron 0.5 g de hojas, el tejido se colocó en un tubo de ensaye de 16 x 150 y se maceró con 10 ml de acetona al 80% (v/v) con un homogeneizador de vidrio de acuerdo con Baker y Hipkiss (1986). Para evitar la pérdida de pigmentos por su descomposición a la luz, los tubos con los extractos se cubrieron con papel aluminio, se guardaron en la oscuridad y posteriormente se midió la absorbancia a 645 y 663 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 D empleando celdas de 10mm.

La concentración de clorofila (chl) se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \text{Chla} &= 12.7 A_{663} - 2.69 A_{645} \\ \text{Chlb} &= 22.9 A_{645} - 4.68 A_{663} \\ \text{Chl total} &= 20.2 A_{645} + 8.02 A_{663} \end{aligned}$$

Los coeficientes dan concentraciones de clorofila en mg/l ó µg/ml.

Determinación de Nitrógeno total en planta. Se realizó mediante la técnica de microkjedhal (Mitchel, 1972). La formulación de las soluciones A, B, C, de EDTA así como del catalizador de la digestión se indican en el anexo 1. En matraces microkjedahl se digirieron 50 mg de muestra con 1 g de catalizador y 1 ml de H₂SO₄ concentrado. El digerido se aforó con agua destilada a un volumen de 250 ml. Se transfirieron 5ml del digerido a un matraz volumétrico de 100ml y se le adicionaron secuencialmente: 1ml de solución de EDTA, 5ml de solución A, 10ml de solución B y 10ml de solución C. Se aforó al volumen y se midió la absorbancia a 625nm después de 1 hora.

La curva patrón se preparó adicionando cantidades variables de la solución estándar de nitrógeno (a base de (NH₄)₂SO₄ y una concentración de 1µg de nitrógeno/ml) al papel filtro digerido, repitiéndose el procedimiento anterior.

Para la determinación de peso seco, las plantas se secaron en horno a 70-80°C durante 3 días hasta peso constante.

Con los datos de peso fresco y peso seco se determinó el área foliar de acuerdo con la ecuación de Hughes, Cockshull y Heath (Evans, 1972).

$$L_A = 0.496 L_{H_2O} \pm 0.223$$

donde: L_A = Área foliar expresada en dm^2

L_{H_2O} = Contenido absoluto de agua en las hojas expresada en gramos (peso fresco menos peso seco)

Esta fórmula se recomienda para trabajos bajo condiciones controladas.

Los frutos se cosecharon cuando estuvieron rojos y se pesaron inmediatamente.

El pH de la agrolita se midió al inicio del experimento y después de sacar las plantas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para la realización del análisis de los resultados, se utilizó un ANOVA completamente alatorizado con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Para aquellos parámetros que presentaron diferencias estadísticamente significativas se utilizó un análisis de Tukey.

6.0 RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 3 se muestran las DO a las cuales se ajustaron los cultivos y las cantidades de células viables por mililitro de inóculo y por semillas.

TABLA 3. Densidad óptica y cuantificación de células viables (UFC)

Cepa	Ajuste del inóculo (DO)	UFC/ml de inóculo	UFC/semilla
Cd	0.019	2×10^8	1.9×10^4
C4	0.020	640×10^8	11.2×10^4
VS1	0.024	540×10^8	18.0×10^4
VS7	0.022	810×10^8	6.4×10^4
VS9	0.020	840×10^8	5.1×10^4

Estos resultados muestran que con todos los inóculos se obtuvo una población mayor a 10^8 UFC/ml, concentración que corresponde a la considerada como el nivel óptimo para jitomate *in vitro* (Bashan y Levanovy, 1990). Respecto a la población por semilla, ésta fue mayor a 10^4 UFC/semilla, en este caso no existe información en la literatura con la que se pueda establecer comparación.

La tabla 4 muestra el número y porcentaje de semillas germinadas por tratamiento. Se observa que el porcentaje de germinación de las semillas inoculadas fue mayor al de las no inoculadas. Es importante hacer notar que las semillas inoculadas germinaron con mayor rapidez (5-8 días) que las testigo (10-15 días). Estos datos coinciden con los reportes de Baldani y Döbereiner (1980), Okon y Kapulnik (1986) y Bashan *et al.* (1989b) entre otros investigadores. Este efecto puede deberse a la acción de las giberelinas producidas por la bacteria (Hartmann *et al.*, 1983), cuyo efecto es estimular y mejorar los promedios de germinación (Rojas y Ramírez, 1993; Nickell, 1994; Mueller, 1996).

TABLA 4 Número y por ciento de semillas germinadas por tratamiento.

CEPA	Número de semillas sembradas	Número de semillas germinadas después de 15 días	% de germinación
Testigo	40	24	60.00
Cd	40	36	90.00
C4	40	35	87.50
VS1	40	38	95.00
VS7	40	37	92.50
VS9	42	41	97.62

Los resultados de la prueba de infección realizada a los 60 días después de la inoculación aparecen en la tabla 5. En todos los tubos en los que se registró crecimiento se observó el vire del indicador y el desarrollo de una película blanca característica de *Azospirillum*. La observación microscópica permitió confirmar la forma, movilidad y la presencia de gránulos de PHB reportados para esta bacteria (Tarrand *et al.*, 1978).

TABLA 5. Infección por *Azospirillum* a lo largo del sistema radical.

Sección de las raíces Cepa	I			II			III		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Testigo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cd	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
C4	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-
VS1	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-
VS7	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
VS9	+++	+	-	-	-	-	-	-	-

I Corona

II Sección media

III Sección distal.

1.-Raíz primaria

2.-Raíz secundaria

3.-Pelos radiculares

+++ = Desarrollo a las 24 horas

++ = Desarrollo a las 48 horas

+ = Desarrollo a las 72 horas

- = No hubo crecimiento

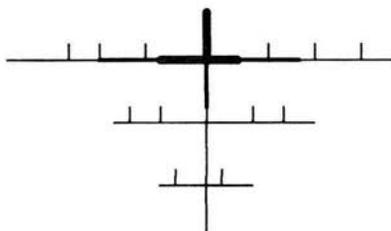
* Resultados de 6 repeticiones

Las características del cultivo en el medio Nfbss así como las observaciones microscópicas indican que:

- Las bacterias que se encontraban infectando las raíces de las plantas inoculadas pertenecen al género *Azospirillum*.
- Considerando que el desarrollo se obtuvo a partir de raíces desinfectadas superficialmente se puede afirmar que la colonización se llevó a cabo en la endorrizósfera y que ésta se presentó únicamente en la zona de la corona, mientras que en la zona de crecimiento de los pelos radiculares, la presencia de la bacteria fue muy escasa, lo que determinó que se requiriera mayor tiempo de incubación para observar el desarrollo característico.

Con los datos de la prueba de infección se realizó un esquema de la raíz en el cual se señalan los lugares de colonización de *Azospirillum*. (fig 5). Es importante mencionar que visualmente es imposible detectar el sitio de colonización de esta bacteria por no formar nódulos como en el caso de *Rhizobium*.

Figura 7



En la figura 7 se observa el esquema de las zonas de: Mayor concentración de microorganismos (**—**), Menor concentración de microorganismos (**—**) y ausencia del microorganismo (**—**) en la raíz.

Estos resultados coinciden con los reportados por Okon y Kapulnik (1986) y Mohandas (1988) respecto a la capacidad de *Azospirillum* de colonizar el interior de las raíces cuando se inocula a semillas de jitomate. Bashan, *et al.*, (1989b y 1991) observaron que la colonización superficial por *Azospirillum* en jitomate se lleva a cabo en la raíz principal y prácticamente su presencia es nula en la zona de los pelos radiculares.

A partir de los 70 días después de la siembra se detectó la presencia de protuberancias en los tallos de las plantas inoculadas. Messiaen (1975) indica que protuberancias de 1mm de largo son características de la enfermedad conocida como marchitez bacteriana, causada por la especie *Pseudomonas solanacearum*. Este mismo autor también indica que la planta hospedera presenta una hiperauxiniasis como reacción tardía de defensa, originando síntomas de “esbozos de raíces” así como de epinastia, la planta se marchita y no se recupera aún con la adición de agua y si se corta al tallo transversalmente la planta secreta una sustancia grisácea. Por lo anterior en este estudio se investigó la presencia de bacterias que pudieran causar éstos síntomas mediante la inoculación de fragmentos de tallos y raíces en diferentes medios de cultivo selectivos y diferenciales para los géneros *Azospirillum*, *Agrobacterium* y *Pseudomonas* (figura 6). Esta prueba se hizo por triplicado.

Se utilizaron tres cepas de referencia, una de cada género y se comparó el crecimiento de estos microorganismos en cada medio de cultivo con el desarrollo de los microorganismos aislados, además se realizó la observación microscópica correspondiente (Figura 6).

Los resultados de la siembra de fragmentos de raíces se muestran en la tabla 6 y éstos indican que:

- El desarrollo de las cepas de referencia coinciden con lo reportado en la literatura (Gibbs y Shapton, 1974; Barrios y Tsuzuki, 1980; Tarrand, *et al.*, 1978; Merck, 1982; Rhode, 1971).
- *Pseudomonas* en glucosa-peptona se comporta de manera similar a *Agrobacterium*.

SIEMBRA EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

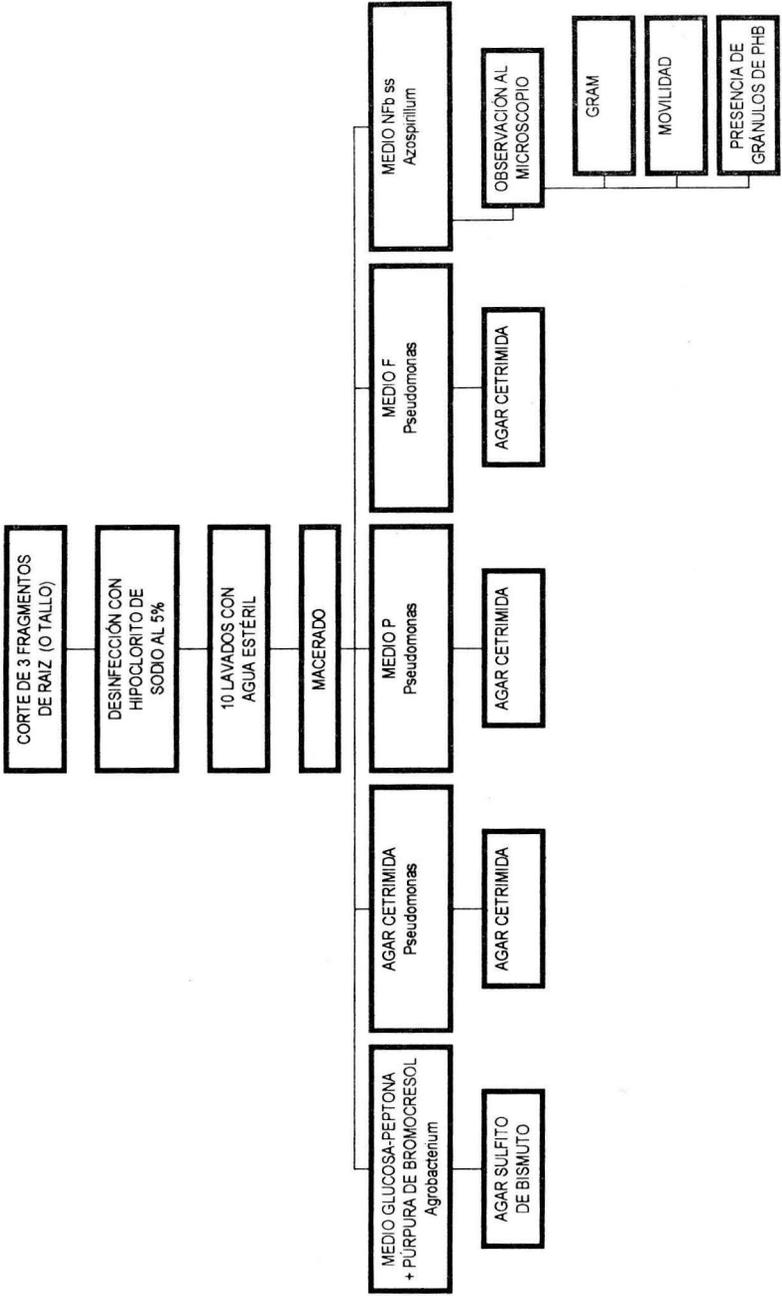


TABLA 6. Resultados de la inoculación de fragmentos de raíz en diferentes medios de cultivo.

Cepa	Nfb ss	Agar cetrimida	Agar P	Agar F	Glucosa Peptona	Agar sulfito de bismuto
<i>Agrobacterium</i>	-	-	-	-	*Crecimiento a las 24h y acidificación del medio	*Colonias negras con brillo metálico
<i>Pseudomonas</i>	-	*Colonias blancas	*Colonias de color azul	*Colonias amarillentas	Crecimiento a las 24h y acidificación del medio.	-
<i>Azospirillum</i>	** ^a	-	Colonias blancas translúcidas	Colonias blancas translúcidas	Colonias moradas sin cambio en el medio.	-
Testigo	-	Colonias blancas	Colonias de color crema	Colonias blancas translúcidas	Crecimiento a las 24h y acidificación del medio	-
Cd	^a	-	Colonias blancas translúcidas	Colonias blancas translúcidas	Colonias moradas sin cambio en el medio	-
C4	^a	-	Colonias blancas translúcidas	Colonias blancas translúcidas	Colonias moradas sin cambio en el medio	-
VS1	^a	-	Colonias blancas translúcidas	Colonias blancas translúcidas	Colonias moradas sin cambio en el medio	-
VS7	^a	-	Colonias blancas translúcidas	Colonias blancas translúcidas	Colonias moradas sin cambio en el medio	-
VS9	^a	-	Colonias blancas translúcidas	Colonias blancas translúcidas	Colonias moradas sin cambio en el medio	-

-Sin crecimiento

^a Formación de la película característica y alcalinización del medio.

* Desarrollo característico

- *Azospirillum*, dada su gran versatilidad metabólica, es capaz de crecer en la mayoría de los medios empleados, desarrollando características diferentes a los otros géneros, en tanto que,
- Las cepas de *Agrobacterium* y *Pseudomonas* empleadas no fueron capaces de desarrollarse en un medio carente de nitrógeno.

La comparación del desarrollo de las cepas de referencia con el crecimiento obtenido a partir de los fragmentos de raíces permitió:

- 1) Confirmar la infección por *Azospirillum*, comparando el crecimiento de las cepas de referencia con el de los microorganismos aislados de las raíces en el medio Nfb, agar P y F para *Pseudomonas* y glucosa-peptona, (medios en los que creció la cepa de referencia) dando lugar a características coloniales similares. Además de la comprobación de movilidad y presencia de gránulos de PHB característicos del género *Azospirillum*.
- 2) Descartar la presencia de *Agrobacterium* y *Pseudomonas* en los tratamientos inoculados comparando la morfología colonial y microscópica de los microorganismos aislados con las cepas de referencia para estas dos especies.
- 3) Detectar contaminación en una de las macetas testigo, ocasionada presumiblemente por bacterias del género *Pseudomonas*.

En la maceta testigo contaminada se observó que las plantas no presentaron esbozos de raíces, sin embargo, en todas las plantas inoculadas la cantidad de primordios aumentó conforme avanzó el tiempo. Este comportamiento se puede deber a cualquiera de las siguientes causas: 1) la cantidad de microorganismos del género *Pseudomonas* fue tan baja que no desató en la planta la aparición de protuberancias, 2) que *Pseudomonas* no sea capaz de producir auxinas, 3) la presencia de *Azospirillum* en un número elevado (aunque esto debe confirmarse por medio de la cuantificación y de un seguimiento poblacional) que propició la hiperauxiniasis. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de protuberancias las plantas nunca presentaron síntomas de marchitez y al momento de hacer cortes tampoco secretaron la sustancia grisácea característica de la marchitez bacteriana.

Es conveniente hacer notar que en ninguno de los casos se registró crecimiento de microorganismos en los tubos inoculados con los macerados de tallos, lo cual indica que *Azospirillum* únicamente es capaz de infectar la raíz en jitomate.

Considerando la información bibliográfica acerca de la capacidad de *Azospirillum* para producir auxinas *in vitro* se presenta la posibilidad de que algunas de las auxinas sean de origen microbiano. Sin embargo, no hay evidencias para apoyar la premisa de que la síntesis de hormonas tenga lugar *in situ*. Por otro lado, se carece de información acerca del efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre los niveles endógenos de auxinas en la raíz, además de que la cantidad de este tipo de hormonas en la raíz es tan baja que dificulta su detección en las raíces inoculadas y no inoculadas (Okon y Kapulnik, 1986) y no se puede diferenciar entre la auxina vegetal y la de origen microbiano.

En la tabla 7 se muestran los resultados del desarrollo de las plantas a diferentes períodos de tiempo (los resultados obtenidos por cada planta aparecen en el anexo 2 en las tablas 10 a 16). La comparación entre el testigo y los tratamientos que contenían a las cepas en estudio indica que la inoculación provocó un incremento en la altura de las plantas, diámetro de los tallos y longitud de las raíces. Este efecto fué más marcado a los 60 días, en tanto que a los 190 días, período en el que se realizó la cosecha, las diferencias disminuyeron considerablemente en todos los parámetros evaluados.

TABLA 7. Promedios del crecimiento de las plantas a los 34, 60 y 190 días.

Días	34	60	190	60	190	60	190
Tratamiento	*Altura de planta (cm)			*Diámetro de tallo (mm)		*Longitud de raíz (cm)	
Testigo	6.4 C	9.10	104	2.00	5.00	7.56	39.88
Cd	10.3 C	28.48	108	3.75	7.71 A	20.37	51.25 A
C4	12.8 AB	24.17	119	3.70	7.71 A	16.27	60.44 A
VS1	16.1 A	34.80	102	5.00	9.16 A	19.70	55.66 A
VS7	10.5 BC	31.83	114	4.17	8.34 A	28.27	54.96 A
VS9	16.3 A	27.00	104	4.17	8.75 A	18.11	54.13 A

*Los datos que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (anexo 3). Las tablas de ANOVA aparecen en el anexo 2 con los números 10.1, 11.1, 12.1, 13.1, 14.1, 15.1 y 16.1 respectivamente.

El incremento en altura de las plantas, fluctuó entre 60 y 154% a los 34 días de desarrollo y de 196 a 282% a los 60 días, en tanto que a los 190 días los valores registrados resultaron muy similares. Respecto al diámetro del tallo, el incremento obtenido a los 60 y 190 días va de 85 a 150% y de 54 a 83% respectivamente. En tanto que en la longitud de las raíces, el aumento fluctuó de 115 a 280% y de 28 a 51%.

Bashan, *et al* (1989a), al inocular jitomate con la cepa Cd (*A. brasilense*) reportan un incremento superior al 25% en la altura de las plantas a los 34 días y un aumento en el diámetro del tallo a los 45 días de desarrollo. En este sentido, es necesario hacer notar que en este trabajo, aún cuando los valores promedio de cada uno de los parámetros evaluados indican un marcado efecto (en porcentaje) de cada una de las cepas probadas; al aplicar el análisis estadístico (ANOVA completamente aleatorizado), sólo se registraron diferencias significativas en la altura de plantas de 34 días de desarrollo y en el diámetro y longitud de raíces de plantas de 190 días de desarrollo como se observa en la tabla 7.

En lo que respecta a la altura de las plantas de 34 días de crecimiento se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas locales C4, VS1 y VS9 con respecto al testigo, así como de las cepas VS1 y VS9 respecto a la cepa de referencia (Cd) y a la cepa VS7. Entre la cepa Cd y el testigo no se encontró diferencia significativa lo cual coincide con lo reportado por Bashan (1989a).

En cuanto al diámetro del tallo, se encontraron diferencias significativas a los 190 días. En este caso tanto las cepas locales como la cepa de referencia fueron diferentes al testigo, pero entre ellas no se presentan diferencias significativas, sin embargo, se observa que las cepas VS1 y VS9 presentan promedios más altos.

Por lo que se refiere a la longitud de la raíz, únicamente se encontraron diferencias a los 190 días. Al igual que en el caso de diámetro del tallo, el testigo presenta diferencias respecto a las cepas las cuales resultan ser iguales. La cepa que presenta una mejor respuesta en este parámetro es la C4, seguida de las cepas VS1, VS7 y VS9.

Con los tres parámetros estudiados encontró que la cepa de referencia Cd (*Azospirillum brasilense*) tuvo los valores medios más bajos y que la cepa más consistente fue la VS1 (*A. lipoferum*) seguida por las cepas VS9 y C4 (*A. brasilense*). Estos resultados indican que la especie *A. lipoferum* presenta una mejor afinidad hacia el jitomate.

La literatura indica que el aumento de la longitud de la raíz, es ocasionado por auxinas presentes en la planta y que este efecto puede ser producido por las auxinas bacterianas (Hartmann, *et al.*, 1983; Mascarúa, 1997; Murphy, 1997). Audus en 1956, reportó que la exposición de raíces de jitomate en ácido indol-butírico a una concentración de 20-50 ppm favorece el enraizamiento de las planta (Rojas y Ramírez, 1993).

Castro y Malvolta (1976), en estudios con jitomate, reportaron que las giberelinas determinan el incremento en la altura de las plantas, pero también la variabilidad entre individuos, este último efecto también lo atribuyen a las auxinas (Rojas y Ramírez, 1993). Existen evidencias de que *Azospirillum* "in vitro" produce estos dos tipos de fitoreguladores (Hartmann, *et al.*, 1983; Mascarúa, *et al.*, 1988; Reynders y Vlassak, 1979; Bottini, *et al.*, 1989). Por otra parte Bashan y Levanov (1990) mencionan que en algunos casos la inoculación con *Azospirillum* no tiene efecto sobre el desarrollo de la planta.

La información anterior concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo en donde la comprobación de la presencia de *Azospirillum* en las raíces permite afirmar que el aumento registrado en los diferentes parámetros se debió a la presencia de las bacterias inoculadas. Por otro lado con base en la literatura se plantea la posibilidad de que dichos resultados se deban al efecto de auxinas y otras hormonas producidas por *Azospirillum*, sin embargo, esto no fue confirmado.

En la tabla 8 se muestran los resultados de las determinaciones que se realizaron después de cosechar las plantas, estos se deben tomar con cierta reserva por las siguientes razones:

1. Las mediciones de peso fresco, peso seco, área foliar y nitrógeno total se deben realizar en el periodo vegetativo, sin embargo, éstas determinaciones no se efectuaron en el periodo adecuado.
2. Las plantas mostraron un comportamiento inesperado en cuanto a su floración y fructificación, mostrando desplazamiento en las fechas de aparición de racimos florales y

maduración del fruto, así como una gran variabilidad entre individuos de un mismo tratamiento.

TABLA 8. Efecto de la inoculación de *Azospirillum* sobre diferentes parámetros de la parte aérea de las plantas a los 190 días.

Cepa	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Área foliar (dm ²)	Nitrógeno total (µg/mg)	Rendimiento total (g) y (# de frutos) / tratamiento.	Peso promedio de frutos (g)
Testigo	164.43	21.14	69.77	19.13	128.9 (8)	16.11
Cd	179.33	26.13	75.99	22.22	16.8 (6)	2.80
C4	183.46	26.78	77.72	16.83	162.5 (15)	10.83
VS1	175.41	24.95	74.57	20.74	193.7 (9)	21.52
VS7	189.96	29.93	80.85	16.24	26.6 (8)	3.33
VS9	187.05	28.81	84.50	13.80	194.8 (19)	10.25

Los datos de peso fresco, peso seco, área foliar y nitrógeno total son los promedios de 8 repeticiones (v tablas 17-20 del anexo 2).

El rendimiento total es la suma de los pesos del número de frutos indicado en el paréntesis.

En cuanto a peso fresco, peso seco y área foliar no existen diferencias significativas entre el testigo y las plantas inoculadas, sin embargo se observa que los datos promedio de los tratamientos inoculados son mayores al del testigo.

En el caso del nitrógeno no existen diferencias significativas entre las plantas testigo y las inoculadas. Las cepas VS1 y Cd son las que tienen un mayor contenido de Nitrógeno. En este caso las plantas no inoculadas tuvieron mejores promedios que las cepas C4, VS7 y VS9.

Respecto al rendimiento, la producción fue escasa. El peso promedio de los jitomates osciló entre 2.8 y 21 gramos, la décima parte del peso reportado en la literatura para esta variedad (180.230g/fruto). Sin embargo, se observa que con la cepa VS1 hay un incremento en el peso de los frutos del 33.57% respecto al testigo, mientras que con el resto de las cepas hay decrementos que van del 32 al 83%.

Este resultado confirma que *Azospirillum lipoferum* infecta al jitomate y le permite incrementar la producción, en tanto que cepas de *Azospirillum brasilense* son capaces de infectar pero producen efectos detrimentales en la producción de este hospedero.

Aún cuando en la literatura se reporta que el exceso de auxinas determina la abscisión de flores y frutos, este efecto no puede ser relacionado con los resultados obtenidos en este trabajo, debido a que el desfase en la producción y el rendimiento escaso se produjo en todos los tratamientos.

Considerando que algunos desórdenes fisiológicos de las plantas se reflejan en el contenido de clorofilas, se procedió a efectuar esta determinación. Los resultados de las mismas se presentan

en la tabla 9 (los resultados por planta aparecen en el apéndice 2 tablas 21-23); estos indican que la proporción clorofila a/clorofila b estuvo muy por debajo del valor normal reportado para jitomate (2.8 ± 0.4), lo que probablemente redujo la capacidad fotosintética de las plantas. El contenido de clorofila b con respecto a de clorofila a indica un posible efecto de sombra.

TABLA 9. Contenido de clorofilas a y b y proporción de clorofilas a/b..

Tratamiento	Clorofila a ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Clorofila b ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Chla/Chlb
Testigo	63.1056	109.9323	0.5705
Cd	59.8395	115.3349	0.5554
C4	48.7951	74.0973	0.6515
VS1	64.7455	138.1534	0.4803
VS7	65.1309	135.4872	0.5271
VS9	75.1977	172.8171	0.4447

La disminución en la proporción de chla/chlb puede ser el factor que afectó en mayor forma el rendimiento debido a que en el caso de cultivos en invernadero de jitomate el factor limitante para el desarrollo vegetativo es la iluminación total, mientras que la calidad de la luz y el fotoperíodo desempeñan un papel secundario (Nuez, 1995). Por otro lado, en invernadero la luz siempre llega atenuada y las plantas están prácticamente siempre en condiciones de luz limitante (Alpi y Tognoni, 1991).

En el caso del invernadero ocupado en este experimento, la cubierta filtra del 50% al 90% de la radiación solar, oscilando ésta entre 50 y 350 lux, valores sumamente bajos que ocasionaron descenso en la fotosíntesis, con el consiguiente decremento en la producción.

La luz influye en la asimilación fotosintética de un cultivo no sólo con una acción directa sobre la capacidad fotosintética sino también indirectamente por medio de importantes efectos morfogénéticos y modificando la distribución de los asimilados. Al disminuir la irradiación, por ejemplo, la superficie de las hojas aumenta mientras se reduce el espesor, las plantas son más altas y tienen tallos más delgados (Alpi y Tognoni, 1991).

Las hojas de las plantas de este trabajo eran muy delgadas, mientras que los tallos de las plantas fueron menores a 1cm, muy delgados en comparación con el diámetro reportado en la literatura (2-4cm), y que coincide con lo anteriormente señalado por Alpi y Tognoni (1991) y Salisbury (1992).

Es importante insistir en que, en los tratamientos inoculados, a partir de los 70 días de desarrollo se inició la aparición de protuberancias en la base de los tallos, las que fueron aumentando hasta el momento de la cosecha, localizándose a lo largo de todos los tallos y en la base de los retoños, lo que probablemente se debió a la producción de un exceso de fitohormonas.

De este modo los desórdenes fisiológicos y consecuentemente el escaso rendimiento se puede atribuir a la baja luminosidad y posiblemente al exceso de fitohormonas.

7.0 CONCLUSIONES

1. La comprobación de infección en las raíces de jitomate por cepas aisladas de raíces de sorgo, trigo y *Cynodon*, permitió confirmar que no existe especificidad de *Azospirillum* por el hospedero.
2. Asimismo se comprobó que la inoculación con *Azospirillum* acelera la germinación de semillas (en 2 a 7 días), incrementa la altura de las plantas a los 34 días de desarrollo, del diámetro de los tallos y longitud de las raíces a los 190 días.
3. La cepa VS1 fue la más consistente en cuanto al incremento en altura de las plantas, diámetro de los tallos y longitud de las raíces y la única que aumentó la producción. Esto indica una mayor afinidad entre la especie *A. lipoferum* y *Lycopersicon esculentum*.
4. Todas las cepas experimentales fueron superiores a la cepa de referencia Cd en los parámetros altura de plantas, diámetro de tallos y longitud de las raíces.

8.0 RECOMENDACIONES

La aparición de protuberancias en los tallos de las plantas indica posibles desequilibrios hormonales causadas probablemente por auxinas producidas por la planta como mecanismo de defensa ó por hormonas de origen bacteriano, por lo que se recomienda cuantificar el contenido de dichos reguladores en la planta a diferentes periodos de crecimiento.

Considerando que los estudios en jitomate se han realizado en plantas hasta los 45 días de desarrollo, se recomienda continuar con el estudio de la cepa VSI de *Azospirillum lipoferum* respecto al rendimiento de este cultivo.

Con el objeto de realizar un seguimiento a través del desarrollo vegetativo y reproductivo, es recomendable incluir un mayor número de repeticiones.

De acuerdo con los resultados del trabajo y después de analizar los diferentes factores que impidieron la fructificación así como el hecho de que de los sistemas de cultivo empleados en México es a base de almácigos, se recomienda efectuar pruebas de inoculación a nivel de almácigo para su posterior trasplante a otro sustrato, o incluso de utilizar las fitohormonas bacterianas aisladas.

9.0 BIBLIOGRAFÍA

- Alpi, A. y F. Tognoni. 1991. Cultivo en Invenadero. Ediciones Mundi-Prensa. España. 347pp.
- Baker, N. R. & M. F. Hipkiss. 1986. Photosynthesis: Energy transduction: A practical approach. Edit. IRL Oxford. pp. 199.
- Baldani, V. D. & J. Döbereiner. 1980. Host- plant specificity in the infection cereals with *Azospirillum* spp. Soil. Biol. Biochem. 12: 433-439.
- Barrios, M. T. y M. G. Tsuzuki. 1980. Selección de cepas efectivas de *Rhizobium japonicum* para frijol soya variedad "jupiter". Tesis de Licenciatura. FQ, UNAM.
- Bashan, Y. 1986. Enhancement of wheat roots colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd following temporary depression of the rhizosphere microflora. Appl. Environ. Microbiol. 51: 1067-1071.
- Bashan, Y., M. Singh, & H. Levanovy 1989a. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. Can. J. Bot 67:2429-2434.
- Bashan, Y., Y. Ream, H. Levanovy & A. Sade. 1989b. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. Can. J. Bot. 67: 1317-1324.
- Bashan, Y. & H. Levanovy. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36: 591-608.
- Bashan, Y., H. Levanovy & R. Whitmoyer. 1991. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. J. Gen. Microbiol. 137: 187-196.
- Bitton, G. 1980. Adsorption of microorganisms to surfaces. John Wiley & Sons. Inc.
- Boddey, R.M., V. L. D. Baldani, J. I. Baldani & J. Döbereiner. 1986. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. Plant and Soil 95: 109-121.
- Bosso, B. & C. Serafini. 1981. El experto horticultor. A.G.T. Editor. México. pp. 172 .
- Bottini, R., M. Fulcheri, D. Pearce & R. P. Pharis. 1989. Identification of Gibberellins A₁, A₃ and Iso-A₃ in Cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Pshysiol 90: 45-47.
- Calderón, J. 1995. La fijación biológica de Nitrógeno en la fertilización de plantas. Curso La biotecnología y su vínculo con la industria. FQ, UNAM.

Döbereiner, J. 1983. Ten years *Azospirillum*. *Experientia Supplementum* 48: 9-23

Evans, G. C. 1972. *The Quantitative Analysis of Plant Growth*. University of California Press. *Studies in Ecology*. Vol. 1.

Flores, A. A. 1985. Aislamiento y caracterización de *Azospirillum* sp de la rizósfera de sorgo en Valle de Santiago, Guanajuato. Tesis de Licenciatura, F.Q. UNAM.

Gibbs, B. M. & D. A. Shapton. 1974. *Identification Methods for Microbiologists*. Academic Press. Great Britain. pp. 212.

Giller, K. E. & G. Cadish. 1995. Future benefits from biological nitrogen fixation: An ecological approach to agriculture. *Plant and Soil* 174: 255-277.

Gutiérrez, C.R. 1987. Estudio del efecto de pesticidas de uso común en el cultivo de gramíneas en el crecimiento "in vitro" de *Azospirillum* spp. Tesis de Licenciatura, ENEP-Zaragoza, UNAM.

Haatela, K., K. Kari & V. Sundman. 1983. Nitrogenasa Activity (Acetylene Reduction) of root-associated, cold-climate *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas* species during growth on various carbon sources and various partial pressures of oxygen. *Appl. and Environ. Microbiol.* 45 (2): 563- 570.

Hartmann, A., M. Singh & W. Klingmüller. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants, excreting high amounts of indolacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29: 916-923.

Hernández, P. S. y M. C. Ruiz. 1987. Evaluación del comportamiento de cepas de *Azospirillum* en turba. Tesis de Licenciatura. FQ, UNAM.

Hernández, J. 1991. Estudio preliminar para la producción industrial de inoculante de *Azospirillum*. Tesis de Licenciatura. FQ, UNAM.

Holt, J. G. ; N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley & S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9º de. William & Wilkins. pp. 754.

INEGI. 1996. BIOSA. Núm.129.

Jiménez, M. 1986. Efecto de la inoculación de *Azospirillum* sp en dos variedades de trigo, realizado a nivel invernadero. Tesis de Licenciatura. FQ, UNAM.

Kapulnik, Y., M. Feldman, Y. Okon & Y. Henis. 1985. Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to the nitrogen nutrition of spring wheat in Israel. *Soil. Biol. Biochem.* 17(4): 509-515.

- Kapulnik, Y. 1987. Yield response of spring wheat cultivars (*Triticum aestivum* and *T. turgidum*) to inoculation with *Azospirillum brasilense* under field conditions. *Biol. Fertil. Soils*. 4: 27-3
- Mascarúa, M. A., J. Caballero y M. Caracaño. 1997. Tecnologías ambientales para el desarrollo sustentable. Biofertilización en gramíneas. <http://dell.ieco.conacyt.mx/ta/tae.htm>
- Mascarúa-Esparza, M.A., R. Villa & J. Caballero-Mellado. 1988. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. *Plant and Soil* 106: 91-95.
- Merck, E. 1982. Manual de Medios de Cultivo. Merck. México. pp. 190.
- Messiaen, C. M. 1975. Las hortalizas. Blume Distribuidora, S. A. México. pp. 455.
- Mitchell, H. L. 1972. Microdetermination of Nitrogen in Plant Tissues. *Journal of the AOAC* 55(1):1-3.
- Mohandas, S. 1988. Nitrogen fixation in tomato. (*Lycopersicon esculentum* Mill 'Pusa Ruby'). *Plant and Soil* 107: 219-225.
- Mueller, K. 1996. Tomatoes and Horticultural Therapy Info. Keith Mueller's page. <http://www4.ncsu.edu/eos/users/k/kdmuelle/public/ho.html>
- Murphy, S.C. 1997. 1997. Non-leguminous Nitrogen Fixation in a Hydroponic System and Evaluation of Potential Association Methods. <http://www.public.iastate.edu/~smurfdog/Azospirillum.html>
- Nickell, L.G. 1994. Plant Growth Regulators in Agriculture and Horticulture. En *Bioregulators for crop protection and pest control*. American Chemical Societ: 1-14.
- Nuez, F. 1995. El cultivo del tomate. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp. 793.
- O'Hara, G. W., N. R. Dorey & J. A. Lucas. 1981. Effect of inoculation of *Zea mays* with *Azospirillum brasilense* strains under temperate conditions. *Can. J. Microbiol.* 28: 871-877.
- Okon, Y. 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends in Biotechnology*. 3(9): 223-228.
- Okon, Y. & Y. Kapulnik. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and Soil* 90: 3-16.
- Otake, H. G., R. M. Ramírez y A. Echegaray. 1985. Evaluación de la fijación de nitrógeno en la asociación *Azospirillum*-maíz, bajo condiciones de temporal, en el Valle de Toluca. *Memorias 3ª reunión sobre fijación biológica de nitrógeno*. pp. 131-133.

- Ramírez-Gama, R. M. y B. Luna-Millán. 1995. Simbiosis asociativas. En Ferrera-Cerrato, R. y J. Pérez Moreno (eds). Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México. pp. 143- 165.
- Ramos, V. S. 1987. Estudio del efecto de la inoculación de algunas cepas de *Azospirillum* sp, en el maíz en cultivo de temporal en Palmar Chico, Edo de México. Tesis de Licenciatura. ENEP-Zaragoza, UNAM.
- Reyes, A. 1970. Hidroponia. Guía para el principiante. Corporación Hidropónica de México, S.A. de C. V. México. pp. 99.
- Resh, H. M. 1992. Cultivos Hidropónicos. Ediciones Mundi Prensa. España. pp. 351.
- Reynders, L. & K. Vlassak. 1979. Conversion of tryptophan to indolacetic acid by *Azospirillum brasilense*. Soil. Biol. Biochem. 11: 547-548.
- Rick, Ch. M. 1978. The tomato. Scientific American 239 (2): 67-76.
- Rhode, P. A. 1971. Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos BBL. Becton, Dickinson and Company. México. pp. 213.
- Rojas, M. R. y H. Ramírez. 1993. Control hormonal del desarrollo de las plantas. LIMUSA. México. pp. 263.
- SAGAR. 1996. Boletín Mensual de Información Básica del Sector Agropecuario y Forestal. Avance a septiembre de 1996.
- Salisbury, F. B. & C. W. Ross. 1992. Plant Physiology. Ed. Wadsworth. USA. pp. 657.
- SARH. 1984. Guía para la asistencia técnica agrícola. Área de influencia del campo agrícola experimental "Valle del Mayo". pp. 272.
- Stacey, G., R. Burris & H. Evans. 1992. Biological Nitrogen Fixation. Chapman & Hall. USA.
- Tarrand, J. J., N. R. Krieg & J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study for *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus. *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24:1010-1016.
- Urzúa, M. C. 1995. Conservación del suelo mediante el uso de biofertilizantes. XIX Simposio de Biologías de Campo y XII Coloquio Estudiantil 3ª etapa.

Valtierra, L. M. 1992. Potencial de *Azospirillum* sp. como biofertilizante biológico de *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Tesis de licenciatura Universidad Autónoma de Chapingo.

Vande, A., J. Michels, S. M. De Faria & J. Venderleyden. 1993. Colonization and penetration of wheat roots by *Azospirillum brasilense* and expression of the nifH gene during the association. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol 17. New horizons in nitrogen fixation; 9th International Congress in Nitrogen Fixation. pp. 260

Vidal, F.C., G. Tsuzuki y R. M. Ramírez. 1995. Rendimiento y calidad de seis genotipos de *Triticum aestivum* (L.) biofertilizados con *Azospirillum* sp.. Memorias I Reunión Internacional de Ecología Microbiana pp. 80.

Walker, J. Ch. 1973. Patología Vegetal. Omega. España. pp. 818.

Zaady, E., A. Perevolotsky & Y. Okon. 1993. Promotion of plant growth by inoculum with aggregated and single cell suspensions of *Azospirillum brasilense* Cd. Soil. Biol. Biochem. 25(7): 819-823.

ANEXO 1

SOLUCION NUTRITIVA DE KNOP (Messiaen, 1975).

Esta solución es una de las más antiguas (1865) aunque permanece siempre vigente y tiene la ventaja de ser rica en calcio y no tener amonio, dos condiciones básicas para tener éxito en el cultivo del jitomate:

Formulación:

Ca (NO ₃) ₂	100 g
Mg SO ₄	40 g
K NO ₃	40 g
KH ₂ PO ₄	38 g

Cantidades para 100 litros de agua.

Según Messiaen se obtiene un mejor resultado si a la solución de Knop se le adiciona otra con microelementos. Se utilizaron las soluciones A y B recomendadas por Reyes, para el cultivo hidropónico de jitomate:

Formulación:

Solución A:		Solución B:	
Hierro quelatado	4.0 g	CuSO ₄	0.5 g
Mn Cl ₂ ·4H ₂ O	1.0 g	Zn SO ₄	1.0 g
Polvo de H ₃ BO ₃	2.5 g		

Los componentes de la solución A se disolvieron en 3.7 litros de agua. Se agregaron 150 ml a cada 40 litros de solución nutritiva. La solución B se disolvió en 3.7 litros de agua y se agregaron 10 gotas por cada 40 litros.

Las fórmulas anteriores deben mantenerse a un pH entre 6.5 y 6.8 nunca permitir un pH inferior a 5.5 ó superior a 7.0.

MEDIO Nfb SEMISÓLIDO (NITROGREN FREE BIOTIN).

Este medio fue recomendado por Tarrand y colaboradores (1978) para el aislamiento y caracterización primaria de *Azospirillum*.

El crecimiento típico de *Azospirillum* se observa por la formación de una película blanca a las 24 horas a 2 ó 3 milímetros abajo de la superficie. Entre las 48 y 72 horas la película de crecimiento migra hacia la superficie y se observa vire del indicador de verde a azul.

Composición:	
Ácido succínico	5.0000 g
NaCl	0.1000 g
K ₂ HPO ₄	0.5000 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2000 g
CaCl ₂	0.0200 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.2350 g
H ₃ BO ₃	0.2800 g
Na ₂ MoO ₄ · H ₂ O	0.0020 g
Cu SO ₄	0.0080 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.0240 g
Biotina	0.0001 g
FeEDTA (Sol. 1.64%)	4.0000 ml
KOH	4.0000 g
Azul de bromotimol (Sol. acuosa 0.5%)	2.0000 ml
Agar	1.7500 g

MEDIO Nfb LÍQUIDO (ADICIONADO CON NH₄Cl).

Medio utilizado para la propagación de *Azospirillum*. Se adiciona el cloruro de amonio debido a que *Azospirillum* fija nitrógeno en condiciones microaerofilicas, pero es incapaz de crecer aerobícamente en ausencia de este elemento.

Este medio presenta la misma composición del medio Nfb ss sin agar ni indicador, además de contener 1g/l de cloruro de amonio.

MEDIO GLUCOSA PEPTONA AGAR + PÚRPURA DE BROMOCRESOL.

Medio para diferenciar a *Agrobacterium* de *Rhizobium*. *Agrobacterium* crece en 24 horas en el medio provocando un vire a amarillo del indicador. *Rhizobium* no crece y si lo hace es muy lento, además de no cambiar el pH del medio (Gibbs y Shapton, 1974; Barrios y Tsuzuki, 1980).

Composición:	
Glucosa	10 g
Peptona	20 g
NaCl	5 g
Púrpura de bromocresol al 1% sol. alcohólica	10 ml
Agar	15 g

El pH se ajusta a 7.2, coloración púrpura del indicador

MEDIO AGAR SULFITO DE BISMUTO.

En este trabajo se usó para diferenciar a *Agrobacterium*, el cual produce colonias de color negro por la producción de H₂S (Rhode, 1971).

Composición:

Peptona de carne	10.000 g
Extracto de carne	5.000 g
Dextrosa	5.000 g
Na ₂ HPO ₄	4.000 g
Fe SO ₄	0.300 g
Indicador de sulfito de bismuto	8.000 g
Verde brillante	0.025 g
Agar	20.000 g
pH final	7.500 g

Hacer una suspensión con 52 gramos del polvo en 1 litro de agua destilada, Mezclar bien. Cuando se logra una suspensión uniforme, calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante 1 minuto. Dejar enfriar a 45°C y vaciar en placas.

AGAR CETRIMIDA

Medio selectivo para aislamiento de *Pseudomonas* (Merck, 1982).

Composición:

Peptona de gelatina	20.0 g
MgCl ₂	1.4 g
K ₂ SO ₄	10.0 g
Bromuro de n acetil-N,N,N-trimetil amonio (cetrimida)	0.3 g
Agar	13.6 g

Pesar los ingredientes, agregar 10ml de glicerina, ajustar el pH a 7.2 ± 0.2, fundir y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

MEDIO F PARA *Pseudomonas*.

El agar F estimula la formación de fluoresceína y disminuye la piocianina. En este medio *Pseudomonas aeruginosa* forma colonias con zona amarilla hasta amarillo-verdosa (por formación de fluoresceína). *Ps. fluorescens* presenta una reacción similar (Merck, 1982).

Composición:

Peptona de caseína	10.0 g
Peptona de carne	10.0 g
K ₂ PO ₄	1.5 g
MgSO ₄	12.0 g

Disolver 35 g de agar F con 10 ml de glicerina en 1 litro de agua. Esterilizar y verter en placas y dejar solidificar. La incubación se realiza durante 7 días a 37°C, pero las observaciones se realizan cada 24 horas.

MEDIO P PARA *Pseudomonas*.

El agar P favorece la formación de piocianina y disminuye la de fluoresceína. Solamente *Ps. aeruginosa* forma colonias con una zona de pigmentación azul (hasta verde) por formación de piocianina o de color rojo (hasta pardo oscuro) por formación de piorrubina (Merck, 1982).

Composición:

Peptona de gelatina	20.0 g
MgCl ₂	1.4 g
K ₂ SO	10.0 g
Agar-agar	12.6 g

Disolver 44g de agar P con 10 ml de glicerina en 1 litro de agua, esterilizar en autoclave. Verter en placas y dejar solidificar.

Incubación durante 7 días a 37°C. Las lecturas se realizan cada 24 horas.

SOLUCIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO (Mitchel, 1972).

Solución A. Disolver 4.8 g de NaOH en agua y aforar a 1 litro.

Solución B. Disolver 5 g de fenol y 25 mg de nitroprusiato de sodic en agua y diluir a 500 ml.

Solución C. Disolver 2.5 g de NaOH, 1.87 g de Na₂HPO₄ anhidro, 15.9 g de Na₃PO₄·12H₂O y 5 ml de clorox en agua y llevar a 500ml.

Solución EDTA. Disolver 1 g de EDTA en 100 ml de agua, agregar NaOH concentrado hasta obtener un pH 10 utilizando pHmetro.

Catalizador de digestión. Macerar 2 g de CuSO₄ ·5H₂O y 30 g de K₂SO₄ en un mortero hasta su homogenización.

ANEXO 2

Efecto de la inoculación sobre la altura de las plantas (34 días).

TABLA 10 Altura (cm) de la planta a los 34 días.

TESTIGO	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
8.0	17.0	18.0	22.7	14.0	17.5
7.0	11.0	12.0	20.0	16.8	20.0
7.7	7.5	14.5	17.5	8.7	14.0
2.0	15.0	16.0	16.0	10.0	18.2
6.0	6.5	10.0	13.0	13.5	14.5
8.0	9.5	13.0	13.5	11.4	17.5
	8.0	11.4	9.5	8.8	15.0
	10.0	10.0	17.0	8.0	15.0
	6.5	14.5	15.3	7.0	17.0
	12.5	9.5	17.0	7.5	15.0

10.1 Tabla de Análisis de varianza.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de la varianza
Entre grupos	587.5326	5	117.5065	12.6061
Dentro de grupos	466.0714	50	9.3214	
Total	1054.1258	55		

$$F_{\text{tablas}} = 2.41$$

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$$

Si Razón de la varianza es $>$ que F entonces rechazo H_0 .

Si $12.6061 > 2.41 \Rightarrow$ rechazo H_0 .

Búsqueda de la diferencia verdaderamente significativa según Tukey.

$$DVS = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{CM/n} = 4.01 \sqrt{9.3214/6} = 4.99$$

TABLA 11. Altura de las plantas a los 60 días.

Testigo	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
6.00	23.20	14.10	45.30	45.00	16.00
12.00	63.20	17.40	26.60	12.60	20.60
9.50	27.30	40.20	24.30	13.70	15.60
8.50	21.10	48.30	46.60	52.00	28.80
9.50	19.20	11.50	31.20	17.20	35.00
	16.90	13.50		50.50	46.00

11.1 Tabla de Análisis de varianza.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	Razón de la varianza
Entre grupos	2082.0157	5	416.4031	2.0135
Dentro de grupos	5790.4349	28	206.8012	
Total	7872.4406	33		

$$F_{\text{tablas}} = 2.56$$

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$$

Si $RV > F_{\text{tablas}} \Rightarrow$ Rechazo H_0 .

$2.0135 < 2.56 \Rightarrow$ No rechazo H_0 .

TABLA 12 Altura (m) de las plantas a los 190 días

Testigo	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
1.29	1.03	1.25	1.07	1.14	1.13
1.03	1.20	1.34	0.78	0.84	1.08
0.95	1.39	1.03	0.95	1.25	1.12
0.92	1.13	1.06	1.29	1.10	0.76
1.13	1.09	1.24	0.79	1.18	1.01
1.13	1.14	1.13	0.95	1.11	1.18
1.03	0.73	1.23	1.01	1.24	0.94
0.87	0.95	1.26	1.29	1.23	1.08

TABLA 12.1 Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de la varianza
Entre grupos	0.1830	5	0.0366	1.5508
Dentro de grupos	0.9892	42	0.0236	
Total	1.1722	47		

$H_0: \mu_1 = \mu_2 \dots = \mu_n$

Si $RV > F_{tablas} \Rightarrow$ Rechazo H_0 .

$1.5508 < 2.45 \Rightarrow$ No rechazo H_0 .

TABLA 13 Diámetro (mm) de las plantas a los 60 días.

Testigo	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
2.50	7.00	3.50	5.00	6.00	4.00
2.00	4.00	4.20	5.00	2.00	3.00
2.00	3.50	5.50	6.00	6.00	5.00
2.00	3.00	3.00	4.00	2.50	5.00
	2.00	3.00		5.50	5.50

TABLA 13.1 Análisis de varianza.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de la varianza
Entre grupos	20.4673	5	4.0935	2.2620
Dentro de grupos	50.5833	28	1.8065	
Total	71.0506	33		

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$$

Si $RV > F_{tablas} \Rightarrow$ Rechazo H_0 .

$2.26 > 2.56 \Rightarrow$ No rechazo H_0 .

TABLA 14 Diámetro del tallo (mm) años 190 días.

Testigo	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
6.00	7.20	7.90	8.20	8.20	8.80
6.00	7.00	7.80	9.70	9.00	8.30
5.00	8.00	9.00	10.20	8.50	9.50
5.00	8.40	6.00	10.20	6.00	8.00
4.00	9.80	8.00	6.70	8.70	8.00
5.00	7.80	8.00	9.70	8.70	10.00
4.00	6.20	7.00	8.20	8.10	8.90
5.00	7.30	8.00	10.40	9.50	8.50

TABLA 14.1 Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de Grados libertad	de Cuadrados medios	Razón de la varianza
Entre grupos	78.1842	5	15.6368	6.0948
Dentro de grupos	107.7550	42	2.5656	
Total	185.9392	47		

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$

Si $RV > F_{tablas} \Rightarrow$ Rechazo Ho.

$6.0948 > 2.45 \Rightarrow$ Rechazo Ho.

$$DVS = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{CM/n} = 4.01 \sqrt{2.5656/6} = 2.3898$$

TABLA 15 Longitud de la raíz (cm) a los 60 días

Testigo	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
4.80	18.00	9.00	23.00	45.00	10.00
8.30	43.50	12.00	15.00	11.00	15.00
9.50	18.20	24.00	11.50	8.00	14.60
8.70	14.00	31.00	28.00	42.00	19.60
6.50	15.00	10.00	21.00	13.60	23.00
	13.50	11.60		50.00	26.50

TABLA 15.1 Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de la varianza
Entre grupos	1288.8022	5	245.7604	2.0819
Dentro de grupos	3305.2402	28	118.0443	
Total	4530.04	33		

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$

Si $RV > F_{tablas} \Rightarrow$ Rechazo Ho.

$2.0819 < 2.56 \Rightarrow$ No rechazo Ho.

TABLA 16. Longitud (cm) de la raíz a los 190 días.

Testigo	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
43.00	57.00	64.00	51.80	48.00	61.00
46.00	54.00	72.00	51.50	49.00	62.00
42.00	55.00	52.00	52.00	73.50	58.00
41.00	52.00	54.50	54.00	60.00	51.00
40.00	46.00	65.00	65.00	44.00	52.00
30.00	43.00	57.00	67.00	59.00	46.00
37.00	54.00	60.00	56.00	59.00	43.00
40.00	49.00	59.00	48.00	47.20	60.00

TABLA 16.1 Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de la varianza
Entre grupos	1939.0069	5	387.8014	8.3014
Dentro de grupos	1962.0263	42	46.7149	
Total	3901.0332	47		

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$$

Si $RV > F_{\text{tablas}} \Rightarrow$ Rechazo H_0 .

$$8.3014 > 2.45 \Rightarrow \text{Rechazo } H_0.$$

$$DVS = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{CM/n} = 4.01 \sqrt{46.7149/6} = 10.19$$

TABLA 17. Peso fresco (g) a los 190 días.

Testigo	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
195.95	157.40	266.30	107.95	190.65	190.70
265.15	153.10	197.90	94.05	170.85	211.90
144.30	214.70	165.60	211.80	209.30	251.15
172.40	188.60	131.10	245.50	165.00	122.55
141.70	214.00	203.30	169.55	212.65	115.80
93.60	169.80	153.20	257.50	188.25	319.60
144.70	171.30	185.10	190.00	145.20	182.60
157.60	165.70	165.20	126.95	237.80	202.10

TABLA 17.1 Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de la varianza
Entre grupos	5863.7688	5	1172.7538	1.0437
Dentro de grupos	47191.8343	42	1123.6151	
Total	53055.6028	47		

Ho: $\mu_1 = \mu_2 \dots = \mu_n$

Si $R_v > F_{tablas} \Rightarrow$ Rechazo Ho.

$1.0437 < 2.45 \Rightarrow$ No rechazo Ho.

TABLA 18. Peso seco (g) de las plantas a los 190 días

Testigo	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
24.50	22.35	34.70	16.30	11.55	27.05
22.90	22.85	28.30	14.30	24.25	28.95
19.40	31.90	27.00	31.05	30.35	32.30
22.80	26.60	18.60	28.55	26.75	23.10
24.55	29.15	28.90	26.25	33.60	15.30
16.85	21.45	29.10	19.55	30.40	48.70
13.20	29.70	21.00	35.95	22.10	18.95
24.90	25.00	26.60	27.65	36.40	36.15

TABLA 18.1 Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de la varianza
Entre grupos	5863.7688	5	1172.7583	0.5085
Dentro de grupos	96856.5163	42	2306.1075	
Total	102720.2851	47		

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$

Si $Rv < F_{tablas} \Rightarrow$ Rechazo Ho

$0.5085 > 2.45 \Rightarrow$ No rechazo Ho.

TABLA 19. Área foliar de las plantas a los 190 días. (dm²/g).

Testigo	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
85.04	66.98	114.87	45.46	88.68	82.31
120.16	64.60	84.12	39.56	72.71	81.17
51.50	90.67	68.75	89.65	88.76	90.74
73.33	80.35	55.80	107.17	68.57	108.55
66.86	91.69	67.60	71.08	88.81	49.33
61.93	7358	86.40	53.27	78.29	48.36
39.88	70.23	65.57	109.89	61.06	134.37
59.42	69.79	78.62	80.53	99.89	81.17

TABLA 19.1 Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	de Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de la varianza
Entre grupos	905.2786	5	181.0557	0.4015
Dentro de grupos	18938.2806	42	450.9114	
Total	19843.5592	47		

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$

Si $RV > F_{tablas} \Rightarrow$ Rechazo Ho.

0.4015 $\not>$ 2.45 \Rightarrow No Rechazo Ho.

TABLA 20 Nitrógeno total en plantas a los 190 días.

Testigo	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
39.93	13.99	36.03	50.44	13.80	24.55
17.27	33.31	8.64	15.43	16.41	20.85
12.86	15.99	12.02	11.92	18.61	16.66
15.26	17.48	17.31	21.61	15.50	11.38
15.57	10.14	14.79	17.82	21.05	3.14
29.55	35.16	12.18	18.06	13.97	5.86
9.34	15.26	18.64	12.52	19.49	12.86
13.23	36.42	11.41	18.13	11.10	15.06

TABLA 20.1 Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de la varianza
Entre grupos	399.2128	5	79.8426	0.9344
Dentro de grupos	3588.8539	42	85.4489	
Total	3988.0667	47		

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$

Si $RV > F$ tablas \Rightarrow Rechazo Ho.

$0.9344 \not> 2.45 \Rightarrow$ No Rechazo Ho.

TABLA 21. Contenido de clorofila a en las plantas ($\mu\text{g/ml}$)

Testigo	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
75.3940	65.0650	23.8598	41.3355	72.8083	87.5440
43.2370	82.2560	133.3200	65.6323	82.2700	95.0433
51.1303	69.3710	31.8233	55.5577	102.5873	91.4980
44.7760	40.9617	39.5417	59.3280	85.9446	85.3230
81.0663	48.5963	51.5890	63.0288	40.3090	66.9273
85.9140	59.4280	54.7563	93.2300	86.9663	65.2340
61.6240	72.1013	38.2663	64.5413	56.5895	82.6140
40.0693	64.6350	40.1338	82.8683	75.9700	76.8873
100.3500	3909320	26.3810	58.7073	8.6043	73.2567
47.4953	56.0482	48.2795	63.2260	39.2595	57.6493

TABLA 21.1 Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de la varianza
Entre grupos	4463.7052	5	892.7410	1.9164
Dentro de grupos	25155.0362	54	465.8340	
Total	29618.7414	59		

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$

Si $R_v > F_{\text{tablas}} \Rightarrow$ Rechazo H_0

$1.9164 < 2.38 \Rightarrow$ No Rechazo H_0 .

TABLA 22 Contenido de clorofila b en plantas a los 190 días. (µg/ml)

Testigo	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
127.0387	151.6213	39.9545	68.7513	159.3940	202.8933
87.0380	118.4300	140.7467	134.2873	196.0733	242.4867
76.7527	207.3980	39.3933	113.1700	102.4120	217.5027
84.2800	146.4200	84.0180	105.2080	226.8520	194.2180
137.3633	61.5860	88.3420	138.3505	70.5900	130.1587
163.3280	68.9967	97.5815	206.4313	200.9153	130.7827
102.9013	90.5653	54.3635	148.7475	125.9350	182.8013
81.8173	135.0200	64.1525	170.2927	191.0920	155.7000
93.3173	60.8700	41.7640	131.1795	15.0133	155.5793
145.5933	112.4415	90.6570	165.1160	66.5950	116.0507

TABLA 22.1 Análisis de resultados.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de la varianza
Entre grupos	54755.9232	5	10951.1846	5.3134
Dentro de grupos	111297.6238	54	2061.0671	
Total	166053.5470	59		

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$$

Si $RV > F_{tablas} \Rightarrow$ Rechazo H_0 .

$5.3134 > 2.38 \Rightarrow$ Rechazo H_0 .

$$DVS = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{CM/n} = 4.00 \sqrt{2061.0671/10} = 57.4257$$

TABLA 23. Proporción de clorofila a/b

Testigo	Cd	C4	VS1	VS7	VS9
0.5935	0.5494	0.5972	0.6012	0.4568	0.43154
0.4967	0.3966	0.9472	0.4887	0.4196	0.3920
0.6688	0.4738	0.8078	0.4909	1.0017	0.4207
0.5313	0.6651	0.4706	0.5639	0.3789	0.4393
0.5902	0.7043	0.5840	0.4556	0.5710	0.5142
0.5261	0.6562	0.5611	0.4516	0.4329	0.4988
0.5989	0.4755	0.7039	0.4339	0.4494	0.4519
0.5805	0.4787	0.6785	0.4866	0.3976	0.3306
0.4294	0.6560	0.6319	0.4475	0.5731	0.4709
0.6892	0.4985	0.5326	0.3829	0.5895	0.4968

ANEXO 3

TABLA 24 . Diferencias verdaderamente significativas. Altura a los 34 días.

DVS= 4.99	x_t	x_{Cd}	x_{C4}	x_{VS1}	x_{VS7}	x_{VS9}
$x_t = 6.45$	-	3.9	<u>6.44</u>	<u>9.70</u>	4.12	<u>9.92</u>
$x_{Cd} = 10.35$	-	-	2.54	<u>5.80</u>	0.22	<u>6.02</u>
$x_{C4} = 12.89$			-	3.26	2.32	3.48
$x_{VS1} = 16.15$				-	<u>5.58</u>	0.22
$x_{VS7} = 10.57$					-	<u>5.80</u>
$x_{VS9} = 16.37$						-

TABLA 25. Diferencias verdaderamente significativas. Diámetro de tallo a los 190 días.

DVS= 2.38	x_T	x_{Cd}	x_{C4}	x_{VS1}	x_{VS7}	x_{VS9}
$x_T = 5.00$	-	<u>2.71</u>	<u>2.71</u>	<u>4.16</u>	<u>3.34</u>	<u>3.75</u>
$x_{Cd} = 7.71$		-	0.00	1.45	0.63	1.04
$x_{C4} = 7.71$			-	1.45	0.63	1.04
$x_{VS1} = 9.16$				-	0.82	0.41
$x_{VS7} = 8.34$					-	0.41
$x_{VS9} = 8.75$						-

TABLA 26. Diferencias verdaderamente significativas. Longitud de raíz a los 190 días.

DVS=10.19	x_T	x_{Cd}	x_{C4}	x_{VS1}	x_{VS7}	x_{VS9}
$x_T = 39.88$	-	<u>11.37</u>	<u>20.56</u>	<u>15.78</u>	<u>15.08</u>	<u>14.25</u>
$x_{Cd} = 51.25$		-	9.19	4.41	3.71	2.88
$x_{C4} = 60.44$			-	7.48	5.48	6.31
$x_{VS1} = 55.66$				-	0.70	1.53
$x_{VS7} = 54.96$					-	0.83
$x_{VS9} = 54.13$						-