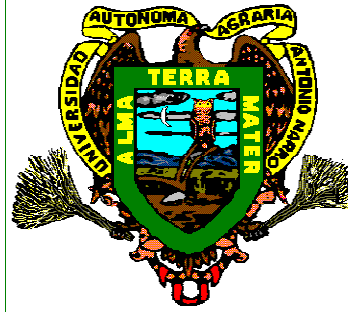


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



EFFECTIVIDAD DE TRES CEPAS DE *Bacillus* EN LA CALIDAD DE PLÁNTULA
DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill).

Por:

Juan José Mendoza Kury

TESIS

Presentada como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:

Ingeniero Agrónomo en Horticultura

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Octubre 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

EFFECTIVIDAD DE TRES CEPAS DE *Bacillus* EN LA CALIDAD DE PLÁNTULA
DE TOMATE (*Lycopersicum esculentum* Mill).

Presentada por:

Juan José Mendoza Kury

TESIS

Que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para
obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

Aprobado por:

Ph. D. Alfonso Reyes López
Presidente del Jurado

Dr. Rubén López Cervantes
Asesor

M. C. Alfonso Rojas Duarte

Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo
Coordinador de la División de Agronomía
Coordinación
División de Agronomía

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Octubre de 2009

DEDICATORIAS

A Dios, por permitirme concluir esta etapa de mi vida. Porque nunca me has dejado solo en mis triunfos y los momentos difíciles.

A mis padres: Maydú Kury Sánchez y Juan José Mendoza Mendoza, por enseñarme a luchar hacia delante, por su gran corazón, pero sobre todo por enseñarme a ser responsable, gracias a ustedes he llegado a esta meta.

A mis hermanas: Maydú Fabiola Mendoza Kury e Ileri Mendoza Kury, ya que ellas han sido un ejemplo a seguir y eso siempre me sirvió para seguir luchando para concluir mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis representa una etapa muy enriquecedora y el camino que el tiempo obliga. En toda la experiencia universitaria y la conclusión del trabajo de tesis, ha habido personas que merecen las gracias porque sin su valiosa aportación no hubiera sido posible este trabajo y también hay quienes las merecen por haber plasmado su huella en mi camino.

A Dios, por ser mi principal guía, por darme la fuerza necesaria para seguir adelante y lograr alcanzar esta meta.

A mis Padres, les agradezco su apoyo, su guía y su confianza en la realización de mis sueños. Soy afortunado por contar siempre con su amor, comprensión y ejemplo.

A mis Hermanas, porque siempre he contado con ellas para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido, por el apoyo y amistad. *¡Gracias!*

A mi Abuelita, por encomendarme siempre con Dios para que saliera adelante. Yo sé que sus oraciones fueron escuchadas.

A mi UAAAN, por darme la oportunidad de aprender y forjarme como profesional.

A mis Maestros, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por su sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

Al Ph. D. Alfonso Reyes López, por su paciencia, dedicación en la realización de este trabajo.

Al Dr. Rubén López Cervantes, por brindarme su tiempo y conocimientos y su gran apoyo en la revisión de esta investigación.

Al M. C. Alfonso Rojas Duarte, por la participación en este trabajo y su amistad.

A la Dr. Reinaldo Alonso Velazco, por su apoyo en la realización de este trabajo.

A Mario Alberto Flores Hernández, por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo de investigación y por su amistad.

A todas aquellas personas que de una forma u otra, participaron en la culminación de este trabajo.

¡Gracias a todos ustedes!

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIAS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE CUADROS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
HIPÓTESIS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Origen del Cultivo.....	4
Importancia del cultivo de Tomate.....	5
Anatomía y Fisiología de la Planta.....	6
Producción de Plántula.....	7
Sustratos.....	7
Recipiente Para Plántulas.....	8
Sistemas de Producción de Trasplante.....	8
Edad de Trasplante.....	8
Hormonas Vegetales.....	9
Función de las Fitohormonas.....	9
Auxinas.....	10
Giberelinas.....	10
Citocininas.....	10
Las Bacterias Benéficas.....	11
Transmisión de Microorganismos en los Cultivos Agrícolas.....	12
¿Qué son las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas (PGPR)?.....	13
Mecanismos de Acción de las PGPR.....	14

Colonización de las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento.....	15
Reguladores de Crecimiento Producidos por Rizobacterias Promotoras del Crecimiento.....	15
Producción de Auxinas por Rizobacterias Promotoras de Crecimiento y su Efecto en el Desarrollo del Sistema Radicular.....	16
Factores Limitantes y Favorables a la Microbiota del Suelo.....	17
Género <i>Bacillus</i>	18
Características de Género <i>Bacillus</i>	18
Aislamiento de Bacterias del Género <i>Bacillus</i>	18
<i>Bacillus Subtilis</i>	19
Forma de Acción de <i>Bacillus Subtilis</i>	20
Antecedentes de <i>Bacillus Subtilis</i>	20
Antecedentes del uso de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Localización del Experimento.....	22
Metodología.....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	33
LITERATURA CITADA.....	34
ANEXOS.....	39

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Análisis de varianza (ANVA) para el peso del tallo de plántula de tomate, con la adición de cepas de <i>Bacillus</i> promotoras del crecimiento.....	24
Cuadro 2.- Análisis de varianza (ANVA) para la longitud del tallo de plántula de tomate, con la adición de biofertilizantes.....	26
Cuadro 3.- Análisis de varianza (ANVA) para el peso de raíz de plántula de tomate, con la adición de biofertilizantes.....	28
Cuadro 4.- Análisis de varianza (ANVA) para la longitud de raíz de plántula de tomate, con la adición de biofertilizantes.....	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Comparación de medias del peso de tallo de plántulas de tomate, con la adición de cepas de <i>Bacillus</i> promotoras del crecimiento.....	25
Figura 2.- Peso de tallo de plántula de tomate, con la adición de cepas de <i>Bacillus</i> promotoras del crecimiento.....	25
Figura 3.- Comparación de medias de la longitud de tallo de plántulas de tomate, con la adición de cepas de <i>Bacillus</i> promotoras del crecimiento.....	27
Figura 4.- Longitud de tallo de plántula de tomate, con la adición de cepas de <i>Bacillus</i> promotoras del crecimiento.....	27
Figura 5.- Comparación de medias del peso de raíz de plántulas de tomate, con la adición de cepas de <i>Bacillus</i> promotoras del crecimiento.....	29
Figura 6.- Peso de raíz de plántula de tomate, con la adición de cepas de <i>Bacillus</i> promotoras del crecimiento.....	29
Figura 7.- Comparación de medias de la longitud de raíz de plántulas de tomate, con la adición de cepas de <i>Bacillus</i> promotoras del crecimiento.....	31
Figura 8.- Longitud de raíz de plántulas de tomate, con la adición de cepas de <i>Bacillus</i> promotoras del crecimiento.....	31
Figura 9.- Tratamientos J1+, J1-,M2+,M2-,BCC+,BCC-,TA.....	39
Figura 10.- Tratamiento J1+ vc. TA.....	39
Figura 11.- Tratamiento J1- vc. TA.....	39
Figura 12.- Tratamiento M2+ vc. TA.....	40
Figura 13.- Tratamiento M2- vc. TA.....	40
Figura 14.- Tratamiento BCC+ vc. TA.....	40
Figura 15.- Tratamiento BCC- vc. TA.....	41
Figura 16.- TA.....	41

RESUMEN

Con el desarrollo de la agricultura sostenible y/o sustentable, el uso de biofertilizantes es cada vez mayor, por su bajo costo y facilidad de aplicación. Con el objetivo de determinar la efectividad de tres cepas de *Bacillus* en la calidad de plántula de tomate, se sembraron semillas del cv. “Floradade”, en charolas germinadoras de poliestireno de 200 cavidades y se les adicionaron dos cepas del *Bacillus subtilis* (Bs), una de *Bacillus amyloliquefacens* (Ba) y exudados de las cepas mencionadas; solo agua como testigo absoluto (TA). A la plántula se le midió el peso fresco de tallo (PFT) y raíz (PFR); la longitud de tallo (LT) y raíz (LR). Se encontró que al adicionar el Ba, se superó al TA en el PFT y PFR en 160 y 200 %, respectivamente; mientras que con la aplicación del exudado del Ba, se adelantó a la LT y la LR en 50 y 94 %, respectivamente. Se concluye que el *Bacillus amyloliquefacens*, realizó efecto positivo en el peso fresco del tallo y peso fresco de raíz de la plántula de tomate; mientras que cuando se adicionó el exudado de este mismo microorganismo, el superior efecto fue en la longitud del tallo y la raíz.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefacens*, PGPR, Hormonas Vegetales, Plántula de Tomate, Microbiota del Suelo, Biofertilizante.

INTRODUCCIÓN

Dada la necesidad de aumentar la respuesta de la agricultura para la alimentación humana disminuyendo el uso de agroquímicos, las investigaciones se han orientado hacia el desarrollo de nuevas tecnologías. En los últimos años ha habido un interés creciente en los microorganismos benéficos del suelo, ya que estos pueden promover el crecimiento de las plantas y en algunos casos también evitar la infección del tejido vegetal por patógenos. Tales microorganismos pueden ser simbióticos o de vida libre. En este último caso están asociados en las partículas del suelo e interactúan con las raíces de las plantas al encontrarse en los gránulos de suelo adheridos a las mismas en la zona de rizosfera, donde son capaces de ejercer un conjunto de interacciones producto de la competencia por nutrientes. Una de las razones principales para esa interacción es la liberación de compuestos orgánicos solubles por exudación de la raíz de la planta (Benizri *et al.* 2001; Bacilo-Jiménez *et al.* 2003). Por su parte los microorganismos de la rizosfera estimulan la exudación de la raíz a través de la liberación de varias sustancias producto de su metabolismo (Lugtenberg *et al.* 2002).

El uso de microorganismos rizosféricos como una biotecnología se ha llevado a la práctica mediante la inoculación de semillas. Los primeros trabajos para la bacterización de semillas fueron realizados en Rusia en 1930. A finales de la década de los 70, Kloepper (1994) utilizó el término **PGPR** (*plant growth promoting rizobacterias*; rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) para referirse a las rizobacterias capaces de provocar un efecto benéfico en las plantas. Recientemente, la denominación se ha extendido a microorganismos **PGP** para incluir hongos y cualquier organismo afín (Vessey, 2003). Sin embargo, en la última década un interés creciente ha sido dirigido hacia los microorganismos endófitos, los cuales al estar menos afectados por el estrés ambiental y más aclimatados con su hospedero (Sturz y Nowak, 2000) podrían representar una mayor ventaja ecológica. Sin embargo, la preferencia de bacterias endófitas y su papel dependen probablemente del cultivar y de su coevolución con la especie microbiana (Yanni *et al.* 2001).

La expresión de la capacidad promotora de crecimiento en las plantas inoculadas en ensayos de laboratorio, invernadero y campo ha sido evaluada a través de diversos parámetros, tales como el incremento de la elongación del tallo y de las raíces, el estado nutricional de las plantas tratadas, la ganancia en materia seca, el contenido de proteínas y el valor nutricional del grano (Yanni *et al.* 2001, Tilak y Srinivasa, 2006). La capacidad para colonizar las raíces es una condición indispensable para que una bacteria sea considerada como una verdadera **PGPR**, siendo por tanto es capacidad un primer paso y un rasgo crucial para la selección de los inóculos microbianos a ser usados como biofertilizantes, biopesticidas, fitoestimuladores o biorremediadores (Lugtenberg *et al.* 2001). Es también un primer inicio de que el microorganismo es capaz de lograr el efecto benéfico esperado. Además de la capacidad de colonización, el éxito en la colonización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal reside en el estudio de cepas compatibles y específicas a los diversos cultivos y a las condiciones ambientales prevalecientes.

En México, el uso de invernaderos ha adquirido auge en la producción de hortalizas en gran escala, específicamente en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Los avances en el trasplante, tales como el uso de sustratos especiales, programas de fertilización para plántulas, charolas de múltiples cavidades, híbridos de alto valor y el uso de invernaderos ha contribuido al crecimiento de la industria, al incrementar la seguridad de los cultivos (Wien, 1997: Orzolek y Lamont, 1999).

OBJETIVOS

Determinar la efectividad de tres cepas de *Bacillus* en la calidad de plántula de tomate (*Lycopersicum esculentum Mill*).

HIPÓTESIS

Al menos una cepa de *Bacillus*, tiene efecto positivo en la calidad de plántula de tomate (*Lycopersicum esculentum Mill*).

REVISIÓN DE LITERATURA

Origen del Cultivo

Las formas cultivadas de tomate derivan de la especie *Lycopersicum esculentum* Mill que al parecer se originó en América, ya que las especies silvestres son nativas de la región andina que comparten Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú, sin embargo, el lugar de domesticación de esta especie fue México. Hallazgos fósiles de frutos de cerámica y la existencia de un nombre nativo xitómalt (fruto con ombligo) fueron sin duda el origen del nombre moderno (Rick, 1974).

Ubicación Taxonómica

Según Flores en (1980) Citado por Centeno (1986) el tomate se encuentra dentro de la siguiente Taxa:

Reino: Vegetal

División: Tracheophyta

Subdivisión: Pteropsidae

Clase: Angiospermae

Subclase: Personotae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Lycopersicum*

Especie: *Esculemtum*

Importancia del cultivo de Tomate

El cultivo de tomate es una de las hortalizas más importantes, no solo para México, sino para una gran parte del mundo, debido a la gran cantidad de divisas que genera a los países donde se cultiva. El tomate es el segundo producto de consumo en el mundo que asociado con la papa aportan el 50% de la producción de hortalizas.

Las exportaciones para enero-septiembre del 2005 de tomate fresco ascendieron a 673, 289, 000 dólares mientras que para enero-septiembre 2006 aumentaron a un 38.4% con un valor de 931, 774,000 dólares (BANCOMEX 2006, Y CNPH).

La producción del ciclo hortícola 2006-2007 se reportaron 71 000 hectáreas a nivel nacional destacando entre los primeros productores de esta hortaliza los estados de Sinaloa, Baja California, San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco, Querétaro, Hidalgo, entre otros.

En el mundo existen alrededor de 280 mil hectáreas dedicadas al cultivo de hortalizas y floricultura de invernadero, y es el continente asiático el de la región más sobresaliente en cuanto a hectáreas destinadas al cultivo bajo esta técnica (BANCOMEXT Y AMPHI, 2001).

En México, el uso de invernaderos ha adquirido auge en la producción de hortalizas en gran escala, específicamente en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Los avances en el trasplante, tales como el uso de sustratos especiales, programas de fertilización para plántulas, charolas de múltiples cavidades, híbridos de alto valor y el uso de invernaderos ha contribuido al crecimiento de la industria, al incrementar la seguridad de los cultivos (Wien, 1997: Orzolek y Lamont, 1999).

México cuenta actualmente con 748 ha, las principales hortalizas de invernadero que se cultivan bajo esta técnica son, tomate, pimiento, pepino, en este orden. La mayor parte de las hectáreas dedicadas a las hortalizas de invernadero se encuentran en la región noreste del país, siendo Jalisco el estado con mayor número de hectáreas, contando con alrededor de 200. En segundo lugar le sigue la zona centro, y en Yucatán se inició recientemente el cultivo de hortalizas bajo condiciones de invernadero. Los productores consideran que los costos de producción son muy elevados, sin embargo, los aspectos positivos mostrados por esta actividad la hacen tener diversos impactos favorables, no solo para el productor y comercializador a

nivel económico, sino a nivel social y ambiental, entre los que se mencionan: demanda creciente, control ambiental, uso eficiente del agua, producción perenne, rendimientos superiores (en algunos casos hasta más de cinco veces superior que la producción a la intemperie), generación de empleos (una empresa productora-empacadora ocupa 800 trabajadores durante todo el año) (BANCOMEXT Y AMPHI 2001).

Anatomía y Fisiología de la Planta

El tomate es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual, puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) o de crecimiento ilimitado (indeterminadas). (INFOAGRO, 2004).

La semilla de tomate tiene forma lenticular con unas dimensiones aproximadas de 5 x 4 x 2 cm y está constituida por el embrión, el endospermo, y la testa o cubierta seminal. El embrión cuyo desarrollo da lugar a la planta adulta, está constituida a su vez por la yema apical, dos cotiledones, el hipocotilo y la radícula. El endospermo contiene los elementos nutritivos necesarios para el desarrollo inicial del embrión. La testa o cubierta seminal está constituida por un tejido duro e impermeable, recubiertas por pelos que envuelven y protegen al embrión y al endospermo (Chamarro, 1995).

El sistema radicular del tomate está constituido por la raíz principal corta y débil raíces secundarias numerosas y potentes y las raíces adventicias (INFOAGRO, 2004). La raíz principal pone a manifiesto la existencia de tres zonas claramente diferenciadas la epidermis, el córtex y el cilindro central o vascular. La epidermis está especializada en la absorción de agua y nutrientes, el córtex, que es un anillo de tres o cuatro células de espesor, generalmente de tipo parenquimatoso. El cilindro central que está en contacto con la endodermis, es el periciclo, que es un tejido uniestratificado a partir del cual se forman las raíces secundarias. Las raíces secundarias originan las células del peciolo y emergen a través del córtex. Las raíces adventicias son similares en estructura a las laterales, se desarrollan a partir de la base del tallo en condiciones favorables (Chamarro, 1995).

El tallo típico tiene 2 – 4 cm de diámetro en la base y está cubierto por pelos glandulares que salen de la epidermis. Debajo de la epidermis se encuentra el córtex

o corteza, las células más externas tienen clorofila y son fotosintéticas, mientras que las más internas son de tipo colenquimático y ayudan a soportar el tallo. En el extremo del tallo principal se encuentra el meristemo apical, una región de división celular activa donde se inician los nuevos primordios foliares y florales. El mesodermo tiene forma de cúpula y está protegido por las hojas recién formadas (Chamarro, 1995).

Las hojas del tomate son pinado compuestas. Una hoja típica de las plantas cultivadas tiene unos 5 cm de largo, algo menos de anchura, con un gran foliolo terminal y hasta ocho grandes foliolos laterales, que pueden, a su vez, ser compuestos. Los foliolos son usualmente peciolados y lobulados irregularmente con bordes dentados. Las hojas están recubiertas de pelos del mismo tipo dorsoventral o bifacial (Nuez y Rodríguez, 1995).

La flor de tomate es perfecta, regular e hipógina y consta de 5 o más sépalos. Posee un número igual de estambres que se alternan con los pétalos y de un ovario bi o plurilocular (Chamarro, 1995). Las flores, en número variable, se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso. Frecuentemente el eje principal se ramifica por debajo de la primera flor formada, dando lugar a una inflorescencia compuesta, habiéndose descrito algunas con más de 300 flores (Nuez y Rodríguez, 1995).

El fruto del tomate es una baya bi o plurilocular que se desarrolla a partir de un ovario de unos 5 – 10 mg, y alcanza un peso final en la madurez que oscila entre los 5 – 500 g, en función de la variedad y condiciones de desarrollo. El fruto está unido a la planta por un pedicelo con un engrosamiento articulado que contiene la capa de abscisión o por la zona peduncular de la unión al fruto. El fruto del tomate está constituido, básicamente, por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas (Chamarro, 1995).

Producción de Plántula

Sustratos

Se llama sustrato al material del cual van llenas las cavidades de las charolas. Los sustratos deben tener las siguientes características: estar libres de patógenos, tener bajo contenido de sales, pH homogéneo y ajustado, buen drenaje, buena retención de humedad y nutrientes, tamaño fino y baja densidad. Los sustratos de

mejor calidad son las mezclas hechas a base de Peat Moss, Vermiculita, y/o Perlita de grano fino. Un grave inconveniente que eleva mucho su costo de producción de plántula es que el Peat Moss es de origen canadiense o estadounidense. Esa razón a orillado algunos productores a probar otros materiales como la fibra de coco, compostas, fibra de caña de azúcar, cascarilla de arroz, etc. (Loustalot, 1998).

Recipiente Para Plántulas

Se utilizan charolas con el fin de preservar la totalidad de las raíces que genera la plántula hasta el momento del trasplante. Estas son las piezas rectangulares que contiene la retícula de las pequeñas cavidades. Cada cavidad tiene orificio al fondo para drenar el agua. Pueden tener de menos de 100 hasta casi 400 cavidades y están fabricadas de poliestireno. Cuando las plántulas de hortalizas crecen en recipientes comunes de trasplante la tasa de crecimiento tiende a ser proporcional al volumen de la celda del recipiente. A mayor disponibilidad de espacio para la planta, esta tiende a ser mas grande, y más rápidamente alcanza sus fases de crecimiento (Loustalot, 1998).

Sistemas de Producción de Trasplante

Los sistemas de producción de trasplante influyen en la condición de trasplante en la plantación, afectando subsecuentemente el crecimiento y desarrollo en campo. Los sistemas de producción de trasplante, incluyendo riego por flotación y el superficial, también influyen en la raíz y las características de crecimiento de los brotes de las plántulas de chile y tomate en el invernadero (Leskovar *et al.* 1994).

Edad de Trasplante

Investigaciones sobre a edad de trasplante han incluido plántulas de 2 a 15 semanas de edad, producida en madera, turba, o recipientes de plástico. Los pioneros de la investigación sobre la edad de trasplante usaron plantas de 7 semanas de edad y mayores. Después de 60 años de investigación sobre la edad de trasplante, parece ser que trasplantes de 2 a 13 semanas de edad pueden producir rendimientos

comparables dependiendo de varios factores involucrados en la producción comercial (Vavrina y Orzolek, 1993).

Hormonas Vegetales

Las hormonas vegetales son producto de las glándulas de secreción interna que regula la mayor parte del proceso metabólico. En realidad es muy difícil definir el término hormona vegetal con precisión. A menudo se refiere al término fitoregulator refiriéndose a los compuestos naturales o sintéticos que inducen repuestas en el crecimiento, desarrollo o metabolismo de las plantas (Bidwell, 1993).

Estas sustancias ejercen una acción estimulando un proceso fisiológico tanto en las zonas de producción como en otras áreas de la planta y causan la producción y/o activación de enzimas las que utilizan los procesos de fotosíntesis para construir, mantener y repartir a la planta. Los reguladores de crecimiento ofrecen posibilidades de compensar las diferencias fenotípicas que tomaría muchos años para tratar de solucionarse por métodos genéticos. (González citado por Pérez, 1996).

Función de las Fitohormonas

Durante mucho tiempo se creyó que las plantas determinaban directamente los procesos de desarrollo y que activaban sobre los grandes fenómenos como la emisión de raíces, flores, etc., así la teoría de las calinas de Went postulaba la existencia de tres hormonas o grupos hormonales, la rizocalina, inductor del crecimiento de las raíces, la caulocalina, determinaba el crecimiento del tallo y la filocalina determinante del crecimiento de las hojas (Hernández, 1999).

En la actualidad existe evidencia suficiente para postular dos hechos básicos sobre la acción fundamental de las fitohormonas:

- 1.- Las fitohormonas no actúan directamente a nivel del organismo, si no de la célula, por ejemplo sobre la mitosis, el alargamiento celular, etc., de modo que sus efectos se hacen sentir en todos los fenómenos citológicos afectados (Rojas, citado por Hernández, 1999).
- 2.- la acción de las hormonas sobre los ácidos nucleicos a nivel de transcripción del mensaje genético y su traducción (Rojas, citado por Hernández, 1999).

En la actualidad se conocen cuatro tipos generales de hormonas, en las plantas, las auxinas, giberelinas, citocininas e inhibidores, también se ha conocido las propiedades del etileno. (Lira, 1994).

Auxinas

Tal como señala Westwood (1982) (Citado por Hernández, 1999) menciona que las auxinas pueden ser de origen natural o sintético y se definen como químicos que producen elongación celular de manera similar al ácido indolacético (AIA).

Giberelinas

Estos compuestos se descubrieron cuando se encontró en el Japón que los extractos de un hongo patógeno (*Giberella fujikuroi*) que atacaba al arroz, duplicaba los síntomas de la enfermedad. La característica de esta es el alargamiento excesivo de entrenudos que causaban el acame de los tallos, la acción principal de las giberelinas es promover alargamiento celular (Bidwell, 1993).

Las giberelinas actúan bajo tres categorías enzimáticas: a) – amilasa, ribonucleasa y proteasa, provocando el alargamiento celular, división celular, inducción de enzimas, floración, inhibición de órganos, floración precoz (González, citado por Pérez, 1996).

Citocininas

Las citocininas no se mueven en la planta con tanta facilidad como las giberelinas y las auxinas, sin embargo hay evidencia que se forman en la raíz y se transportan a las hojas y tallos. La hormona parece transportarse por el xilema, se ha encontrado que las citocininas se ligan a cada ribosoma, como se ha encontrado que estimulan la síntesis de ARN, se presume que también puede actuar sobre los ribosomas nucleares. Las citocininas solubles actúan protegiendo a ARN, formando un conjunto con la enzima nucleasa e inhibiendo su acción de hidrólisis, permitiendo que ocurra la síntesis de proteína (Cassan *et al.* 2001).

Entre los efectos de las citocininas están, la formación de órganos de los tejidos cultivados *in vitro*, el alargamiento y división celular, la prevención de senescencia y la inducción de la floración.

Las Bacterias Benéficas

La transmisión de microorganismos benéficos ha sido poco estudiada. Se trata de un fenómeno importante porque podría proveer el éxito competitivo tanto del microorganismo como del hospedero en un ambiente determinado. Por ejemplo, algunas bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Frankia* son capaces de fijar nitrógeno de la atmósfera cuando se encuentran en simbiosis con leguminosas y árboles actinorrízicos, respectivamente. En estas simbiosis, las bacterias transfieren el nitrógeno fijado (combinado) a las plantas y a cambio reciben de ellas fotosintato (fuente de carbono), que utilizan para generar energía. Algunas bacterias benéficas del género *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. fluorescens*) que viven en la zona influenciada por los exudados de la raíz de las plantas (rizósfera), son capaces de inducir una respuesta de defensa en las plantas, que sirve de protección contra microorganismos patógenos. Bacterias de los géneros *Burkholderia* y *Azospirillum*, entre muchas otras, producen sustancias secuestradoras de hierro (sideroforos), con lo cual privan de hierro a otros microorganismos patógenos Smith y Goodman, 1999.

Las bacterias que viven en tejidos internos de las plantas sin causar un daño aparente (endófitas) son capaces de estimular el crecimiento de las plantas. Se piensa que las bacterias endófitas, al estar en una asociación íntima con las plantas, podrían tener efectos benéficos de mayor trascendencia en comparación con las bacterias que viven en la zona influenciada por la raíz (rizosféricas). Las bacterias endófitas tienen menor competencia que las bacterias rizosféricas para tomar sus nutrientes y por lo tanto podrían brindar cualquier beneficio directamente a la planta hospedera Glick, 1995; Schippers *et al.* 1998.

Transmisión de Microorganismos en los Cultivos Agrícolas

Cuando se habla de transmisión de microorganismos, podemos imaginar bacterias, virus u hongos patogénicos que amenazan la vida del hombre o la productividad de cultivos, pero pocas veces nos detenemos a pensar en la existencia de microorganismos benéficos para los diferentes hospederos. La transmisión de microbios desde un hospedero infectado hasta uno susceptible, es una manera de asegurar la vida de la progenie. Sin embargo, la vía para alcanzar el hospedero correcto es variable. En algunos casos es por contacto directo entre hospederos; en otros, es a través de vectores, o del suelo, donde los microorganismos yacen bajo formas resistentes, y en casos extremos, explorando nuevos hospederos (hospederos alternativos) (Burd, 2000).

En las últimas décadas el aumento de la producción agrícola se ha conseguido a cambio de la reducción del contenido de materia orgánica en las tierras de cultivo intensivo y el deterioro de la estructura del suelo, lo cual lo ha vuelto más propenso a la compactación y a la erosión, además de los procesos de desertificación, salinización, alcalinización y contaminación con plaguicidas y fertilizantes. Se puede decir que la productividad actual sólo se mantiene por la aplicación de abonos químicos en cantidades cada vez mayores. Los cultivos utilizados en la actualidad han evolucionado durante millones de años tomando los nutrientes del suelo puestos a su disposición mediante la actividad de los microorganismos edáficos (Hong et al. 1991).

Es bien conocido que un gran número de especies bacterianas asociadas con la rizosfera de las plantas son capaces de ejercer un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas. Este grupo de bacterias llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR). Estas bacterias se caracterizan por su habilidad de facilitar directa e indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje en las plantas. La estimulación indirecta del crecimiento de plantas incluye una variedad de mecanismos por los cuales la bacteria inhibe la acción fúngica sobre el crecimiento y desarrollo de la planta (Hassan *et al.* 1997; Essalmani & Lahlou, 2003). La estimulación directa puede incluir la fijación de nitrógeno (Sessitsch *et al.* 2002), la producción de hormonas (Perrine *et al.* 2004), de enzimas (Mayak *et al.*, 2004), de sideróforos (van Rossum et al., 1994; Carson *et al.* 2000) y solubilización de fosfatos (Rodríguez & Fraga *et al.* 1999).

¿Qué son las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas (PGPR)?

Las PGPR (*Plant growth promotion rhizobacteria*), o rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, son aquellas bacterias que aparecen libres en el suelo, capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizosfera de la planta favoreciendo el crecimiento o desarrollo de ésta con su actividad. Las rizobacterias pueden ser beneficiosas, neutras o negativas para la planta. Por eso resulta importante reseñar que el grupo de PGPR sólo lo conforman aquellas útiles para el crecimiento de la planta. El término PGPR fue introducido en el año 1978 por Kloepper y Schroth. Desde entonces, se han sucedido los estudios que indicaban sus efectos positivos en plantas de gran importancia para el hombre, como: algodón, cebada, judía, patata, remolacha, trigo, lenteja, arroz, tomate, etcétera. Pese a no disponer de un conocimiento exacto de los mecanismos de colonización de la zona radicular, se aceptan dos etapas: una en la que por mecanismos inespecíficos, como fuerzas electrostáticas, y específicos, en los que participan glucoproteínas de la superficie de la raíz y exopolisacáridos bacterianos, las rizobacterias se adhieren a las raíces; y la segunda, en la que las bacterias se multiplican y crean micro colonias en zonas ricas en nutrientes.

Los microorganismos rizosféricos son capaces de mejorar la estructura del suelo y proteger al vegetal frente a tensiones de diverso origen. Además, las PGPR aportan formas asimilables de los nutrientes minerales (pudiéndose llamar por tanto biofertilizantes), producen fitohormonas y suprimen patógenos de las raíces Lazarovits y Nowak, 1997.

Durante el siglo XX, los investigadores han avanzado en el estudio de las influencias y factores que afectan al suelo, y entre otras cosas, se ha entrado en el estudio de cómo alterar las poblaciones microbianas de los suelos agrícolas para favorecer la salud y el crecimiento de las plantas. Se ha utilizado el término bacterización para denominar la inoculación de cultivos de bacterias, entre ellas de rizobacterias, en semillas y propágulos vegetales. Esas bacterias tienen que ser capaces de sobrevivir en el medio natural y competir con los microorganismos residentes, así como llevar a cabo su función en condiciones ecológicas naturales.

Mecanismos de Acción de las PGPR

En cuanto al efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, las PGPR pueden actuar de manera indirecta o directa:

Mecanismos indirectos: los metabolitos producidos por las PGPR pueden funcionar como determinantes antagónicos, involucran aspectos de control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, vía producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas (glucanasas, quitinasas) o inducción de mecanismos de resistencia (Bloemberg y Lugternberg, 2001).

Mecanismos directos: ocurren cuando los metabolitos producidos por algunas cepas de rizobacterias son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de éstos por parte de la planta (Bloemberg y Lugternberg, 2001).

La conjunción de ambos mecanismos de acción ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas; se ha observado un incremento en la emergencia, el vigor y el peso de plántulas, un mayor desarrollo en sistemas radiculares y un incremento hasta de 30% en la producción de cultivos de interés comercial, tales como papa, rábano, jitomate, trigo y soya Kloepper *et al.* (1989).

- | Mecanismos directos | Mecanismos indirectos |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Solución del fosforo.• Fijación del nitrógeno.• Producción de fitohormonas.• Disminución de la concentración de etileno.• Secuestro de hierro por sideroforos. | <ul style="list-style-type: none">• Producción de antibióticos.• Agotamiento de hierro en la rizosfera.• Sistema de resistencia inducida.• Síntesis de metabolitos anti fúngicos.• Producción de enzimas que lisan la pared celular de los hongos.• Competición por sitios en la raíz. |

Mayak *et al.*(2004), quien hace mención que las PGPR tienen habilidad de producir amino ciclopropil carboxílico (ACC) diaminasa, compuesto que reduce el nivel de etileno en las raíces de las plantas, incrementándose de esta manera el crecimiento y longitud de las raíces mientras que Chabot *et al.* (1996), Yanni y Perrine, *et al.* (2004), entre otros, sostienen que las moléculas promotoras del crecimiento como el ácido indol acético, las giberelinas y las citoquininas producidas por los rizobios, presentes ya sea en la rizosfera o en los tejidos de las plantas

estimulan el mayor desarrollo de la raíz y realizan la capacidad de absorción de nutrientes de la raíz en beneficio de la planta no leguminosa.

Colonización de las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento

Enfocado a la atención en los mecanismos directos de estimulación de crecimiento de plantas, se asume que como prerrequisito es necesaria la adhesión de la bacteria a la semilla o a la raíz de la planta, mostrando la capacidad de las diferentes cepas de rizobacterias para colonizar la superficie de la raíz y rizósfera. Por ejemplo, estudios de microscopía electrónica de raíces de plántulas de canola, creciendo bajo condiciones axénicas en presencia de la cepa *Pseudomonas putida* GR12-2, indican que la adherencia de la bacteria a la superficie de la semilla fue suficiente para aumentar la elongación de la raíz durante los primeros días de desarrollo de las plántulas (Hong *et al.*, 1991).

De igual modo, el estudio realizado por Pesello-Cartieaux *et al.* (2001) indican que la colonización de la rizósfera de *Arabidopsis thaliana* por cepas de *Pseudomonas* tienen la capacidad de inducir cambios morfológicos en la raíz promoviendo de esta manera su desarrollo. Sin embargo, el proceso de colonización puede variar notablemente debido a factores que modifican la interacción planta-PGPR. De modo que, la estructura del suelo, el contenido de humedad, aireación, pH, genotipo de la planta, actividades y composición de la microflora nativa del suelo pueden influir y afectar en magnitud y dirección la respuesta del crecimiento de la planta posterior a la inoculación con cepas PGPR (Buyer *et al.* 1999; Pillay y Nowak, 1997).

Reguladores de Crecimiento Producidos por Rizobacterias Promotoras del Crecimiento

La evaluación del efecto promotor por acción de cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento, es medido en la mayoría de los casos por un incremento en la magnitud de diferentes parámetros biométricos, por ejemplo; peso seco del follaje, raíz y fruto, área foliar, número de hojas, altura de la planta entre otros, observando a su vez una rápida germinación de la semilla, mejor emergencia de la plántula, eceleramiento en el desarrollo e incremento en el rendimiento del cultivo

(Cattlan *et al.* 1998; Lazarovits y Nowak, 1997). El mecanismo que ha sido con mayor frecuencia involucrado para explicar el efecto de las rizobacterias antes mencionados, es la producción de fitohormonas, enfocando la atención en la capacidad de diferentes cepas de rizobacterias para modular los niveles de etileno en plantas y de producir auxinas, funcionando como reguladores de crecimiento y desarrollo en plantas.

Producción de Auxinas por Rizobacterias Promotoras de Crecimiento y su Efecto en el Desarrollo del Sistema Radicular

Las auxinas promueven la diferenciación del tejido vascular, división y elongación celular, elongación de tallos y raíz e iniciación de raíces adventicias y laterales. En plantas, la auxina más abundante es el ácido indolacético (AIA), este compuesto principalmente se sintetiza a partir del triptófano en el meristemo apical en hojas jóvenes de donde se transporta a través del floema al resto de los tejidos vegetales (Glick *et al.* 1999). La concentración de auxinas es crítica para la respuesta fisiológica, además de los factores que influyen en los niveles endógenos de auxinas, como es la síntesis de *novo*, degradación, hidrólisis y formación de conjugados, las auxinas secretadas por cepas de rizobacterias pueden funcionar como fuente exógena para la planta. Es reconocido que cepas de PGPR de los géneros *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Azospirillum* sintetizan AIA y su efecto en las plantas mimetiza los efectos de AIA exógeno. Por otra parte, como se mencionó con anterioridad, la promoción de crecimiento de la raíz es uno de los principales marcadores por el cual el efecto benéfico de las rizobacterias es medido.

Dos diferentes pruebas han sido realizadas para ensayar el efecto del AIA producido por rizobacterias sobre el crecimiento de plantas; un método compara los efectos de la inoculación de raíces con mutantes de bacterias que producen niveles alterados de auxinas. Una segunda prueba varía la cantidad del inóculo de una sola cepa, asumiendo que una alta densidad de inóculo significa mayor disponibilidad del AIA para la planta. Un ejemplo claro, es la aplicación de tipo silvestre de *P. putida* GR12-2 en semillas de canola, que estimula de dos a tres veces la elongación de la raíz primaria comparada con el control no inóculado, una mutante sobreproductora de AIA de esta bacteria estimula extensivamente el desarrollo de raíces laterales en plántulas de canola (Xie *et al.*, 1996) y de raíces adventicias en frijol (Mayak *et*

al.1997). Otro ejemplo, de la influencia positiva en el desarrollo del sistema radicular es la aplicación de la cepa de *Azospirillum brasilense* que incrementa el número y longitud de raíces laterales en trigo (Barbieri y Galli, 1993). Estos reportes indican que la producción de AIA por bacterias PGPR es la rizósfera es importante para determinar el efecto de éstas sobre la morfología de la raíz, asociado a la especie de la planta y al estado de desarrollo del sistema radicular.

Factores Limitantes y Favorables a la Microbiota del Suelo

Las poblaciones microbianas del suelo pueden ser afectadas por la manera en que el hombre cuida este recurso. Las actividades agrícolas, como la utilización de gran cantidad de insumos sintéticos (Fertilizantes, plaguicidas, entre otros), eliminación de malezas con o sin herbicidas (Cultivo en suelos desnudos) y la no rotación de cultivos, pueden afectar nocivamente a la biodiversidad de los procesos ecológicos del suelo (Zelles *et al.* 1994: Kennedy y Smith, 1995). Se ha demostrado que en suelos donde predomina el monocultivo y se utiliza gran cantidad de productos químicos, la comunidad microbiana y la macrofauna asociada es significativamente menor que en suelos donde ha predominado una rotación de cultivos (Filser *et al.* 1995).

Los suelos orgánicos supresivos poseen una buena diversidad y abundancia de microorganismos, con la presencia de antagonistas que disminuyen o regulan la existencia de organismos patógenos (Nelson y Thornton, 1997: Hointink y Boehm, 1999). La diversidad de organismos presentes en el suelos la responsable de la calidad y sostenibilidad de los suelos agrícolas. La calidad involucra la combinación de aspectos físicos, químicos y biológicos, los cuales dependen en gran medida de la actividad microbiana (Kennedy y Smith, 1995).

La presencia de compuestos antifúngicos, resultantes de la reincorporación de residuos de repollo y la solarización del suelo, demuestra la generación de un amplio rango de compuestos volátiles, como alcoholes, aldehídos, ácido sulfídrico e isotiocianatos, los cuales reducen el número de propágulos de patógenos como *P. ultimum* y *S. rolfsii*, sin causar mayor daño a otros componentes de la microbiota. Este estudio mostró que, además de la actividad biológica de los microorganismos, existe la física de la solarización e igualmente la presencia de componentes volátiles que actúan como fungicidas (Gamliel y Stapleton, 1993).

Género *Bacillus*

Los bacilos en general están clasificados dentro de los microorganismos aeróbicos o facultativos y productores de catalasa. Pueden ser gran positivos o gran variables. En general producen endosporas, o sea esporas que se forman dentro de la célula (Nutri –Compost™ 2005).

Características de Género *Bacillus*

Según Nutri –Compost™ (2005), las características generales del género *Bacillus* son:

- Producen endosporas, las que son termoresistentes y también resisten agentes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos.
- Muchos bacilos producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y donadores de electrones.
- Muchos bacilos producen antibióticos y son ejemplos de estos la bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina.
- Los bacilos en general crecen en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc., como las únicas fuentes de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno.
- Viven dentro de los límites de temperatura de 55 a 70 °C, y el límite inferior de pH para *Bacillus* es de 2 a 3 (Nutri –Compost™ 2005).

Aislamiento de Bacterias del Género *Bacillus*

Los miembros del grupo *Bacillus* son fáciles de aislar de la tierra, aire, agua, plantas, animales y prácticamente en todas las superficies. Cuando se siembran en placas e incuban en forma aeróbica de *Bacillus*, son de forma plana, de formas irregulares y filamentadas.

Algunas pruebas adicionales que contribullen a la identificación de las especies del género *Bacillus* son:

- Producción de ácido y/o gas a partir de glucosa.
- Reducción de nitrato.
- Capacidad de crecer de manera anaeróbica, y poseen movilidad.
- Incubación aeróbica con ingredientes principales a partir del almidón y NH₄, oxígeno como aceptor de electrones.
- Pasteurizar el inóculo a 80 °C (Nutri – Compost™ 2005).

Bacillus Subtilis

Realiza una fermentación 2, 3 butanediol, cuyos productos principales son butanediol, etanol, CO₂ y H₂O. Estos microorganismos también producen glicerol como un producto de la fermentación. *Bacillus subtilis*, no es potencialmente patógeno, no produce endotoxinas y secreta proteínas hacia el medio. *Bacillus subtilis* es inofensivo para los animales convencionales (Nutri –Compost™ 2005).

Según Brayán (1974) (Citado por Romo, 1994) Las características principales de *Bacillus subtilis* son:

- Forma de bastones rectos o curvos, con extremos redondeados.
- Miden de 3 μ a 4 μ por 1 μ.
- Son bacterias gram positivas y no acidorresistentes.
- Son mesófilicas.
- Producen esporas ovales o cilíndricas, que miden de 1.2 μ a 0.6 μ.
- Móviles por ocho o doce flagelos peritricos.
- La pared de la espora es delgada.

B. subtilis es un habitante del heno, polvo, leche, suelo y en el agua principalmente. Es una bacteria gran positiva, con 8 o 12 flagelos peritricos. La forma de *B. subtilis* es de bastones rectos o curvos, con los extremos redondeados, su agrupamiento es aislado y algunas veces en cadenas cortas, su tamaño oscila entre 3 y 4 micras, su formación de esporas es ecuatorial, dichas esporas son subterminales, ovales y germinan lateralmente, miden 1.2 x 0.6 micras. La temperatura máxima para

el desarrollo de esta bacteria es de 37°C, es aerobia y anaerobia facultativa y sus esporas son capaces de resistir la ebullición durante horas (Bryan *et al.* 1974).

Forma de Acción de *Bacillus Subtilis*

B. subtilis produce un efecto inhibitorio sobre los fitopatógenos mediante dos procesos: a) Es llamado ocupación de nicho, debido a la presencia de dicha bacteria en la superficie de la raíz metabolizando los exudados que pueden ser utilizados por los patógenos, b) es una extensión del primer proceso; como *Bacillus* crece en la superficie de las raíces, esto puede producir sustancias químicas que inhiben el desarrollo de los fitopatógenos (Gustafson, 1993).

Antecedentes de *Bacillus Subtilis*

Lazarate *et al.* (1994) utilizaron *B. subtilis* para controlar la producción radicular del frijol, la cual se evaluó comparando diferentes sustratos y se determinó que en condiciones de laboratorio el tratamiento con turba fue el más eficaz y en condiciones de campo la formulación a base de pectina fue la que logra mejor control.

Brada *et al.* (1995) evaluaron el efecto de *Bacillus sp.* Sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate infestadas con *Fusarium oxysporum* var. *Cubensis*. Castellanos *et al.* (1995) evaluaron *B. subtilis* para el control de *Alternaria porri* en plantas de cebolla, alternando aplicaciones del producto biológico con la de los fungicidas zineb y oxiclورو de cobre, determinándose que los tratamientos que consistían en la combinación de fungicidas sintéticos y biológicos mostraron mejor control que el resto de los tratamientos.

Torres *et al.* (2001) realizaron pruebas *in vitro* con *pseudomonas sp.* y *B. subtilis* aislados de plátano y arroz, respectivamente. Estos microorganismos mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo, tales como *Fusarium oxysporum*, *f.s.Lycopersici*, *Pythium ultimum*, *R. solan*, *S. rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*.

Antecedentes del uso de *Bacillus amyloliquefaciens*

Guillen (2006) al inocular plantas de chile ancho cv Caballero con *Bacillus amyloliquefaciens* observo un incremento en el rendimiento de hasta el 44% en comparación con el testigo. En el segundo corte se obtuvo nuevamente el mayor rendimiento superando el tratamiento tradicional en un 149%. Al realizar el tercer corte se obtuvo la mayor producción superando seis veces más al testigo y cinco veces en rendimiento al tratamiento tradicional.

Rodas (2008) describe el uso de *Bacillus amyloliquefaciens* como biofertilizante esto debido a su capacidad para solubilizar fósforo. Para que las plantas puedan utilizar el fósforo, las bacterias deben hidrolizar los compuestos fosfatados para dejar al fósforo en su forma inorgánica (ION), para ello las bacterias producen enzimas llamadas fosfatasas Ácidas, las cuales cambian el pH del entorno y así facilitan que el fósforo inorgánico sea liberado por intercambio protónico al medio, remplazando los P por iones Calcio.

Holguín Gina en 1999 cita que se han logrado aislar seis cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato a partir de raíces del mangle negro las cuales son *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. taylorae*, *E. asburiae* y *Kluyvera cryocrescens*, y también dos especies a partir de raíces de mangle blanco, las *Chryseomonas luteola* y *Pseudomonas stutzeri*. Se encontró que bajo condiciones in vitro, *B. amyloliquefaciens* solubiliza un promedio de 400 mg de fosfato por litro de suspensión bacteriana (107 células/ml); teóricamente, esta cantidad sería suficiente para proporcionar los requerimientos diarios de fosfato de una pequeña planta terrestre y la mitad de los de una grande.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Experimento

El presente trabajo de investigación se realizó en el invernadero dedicado a la producción de ornamentales, del Departamento de Horticultura del *Campus* principal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, la cual se ubica en la Ex - Hacienda de Buenavista, a 7 km al sur de la ciudad de Saltillo, Coahuila, a los 100° 50' 57'', longitud oeste y los 25° 53' 42'' longitud norte del observatorio de Greenwich. Con una altitud de 1742 msnm, con precipitación anual de 298.5 mm y temperatura media anual de 19.8 °C.

Metodología

En charolas de poliestireno de 200 cavidades y utilizando como sustrato peat moss (Premier Promix PGX), se sembraron semillas del cv. "Floradade", la que fue realizada el 15/10/08, depositando una semilla por cavidad y se dio un riego pesado. Las charolas se distribuyeron en el invernadero, separando cada tratamiento con barreras de plástico con el fin de que no se transmitieran los diferentes tratamientos. A cada tratamiento se le asignaron dos charolas y se dejaron de testigo absoluto tres charolas.

Los tratamientos empleados fueron: dos cepas de *Bacillus subtilis* y una cepa de *Bacillus amyloliquefacens*. De cada cepa de *Bacillus*, se extrajo el exudado por medio de un filtro microporo. De cada *Bacillus* y su exudado, se aplicaron 2 ml.litro⁻¹ de agua.

Se regó, por aspersión de forma manual, dos a tres veces al día, cuidando mantener húmedo el sustrato. Durante las primeras cuatro semanas se aplicaron 30 L diarios de agua para el total de las charolas, y cuando las plantas tuvieron cuatro hojas verdaderas y la temperatura se incrementó, se aumentó la cantidad de agua a 60 L. Los tratamientos fueron aplicados en tres ocasiones, a intervalos de 15 días. Los

compuestos adicionados generaron un total de siete tratamientos, los cuales son enlistados a continuación.

- 1.- Fermentado J1 *Bacillus subtilis* (+): con *Bacillus*.
- 2.- Fermentado J1 *Bacillus subtilis* (-): Exudado de *Bacillus* (separadas por los filtro micro poro).
- 3.- Fermentado M2 *Bacillus subtilis* (+): con *Bacillus*.
- 4.- Fermentado M2 *Bacillus subtilis* (-): Exudado de *Bacillus* (separada por filtros micro poro).
- 5.- Fermentado BCC1 *Bacillus Amyloliquefaciens* (+): con *Bacillus*.
- 6.- Fermentado BCC1 *Bacillus Amyloliquefaciens* (-): Exudado de *Bacillus* (separada con filtros micro poro).
- 7.- Testigo absoluto.

Las variables evaluadas fueron: peso fresco de tallo (PFT), longitud de tallo (LT), peso fresco de raíz (PFR) y longitud de raíz (LR). El experimento fue distribuido de acuerdo a un Diseño Experimental Completamente al Azar, con siete tratamientos y 20 repeticiones; el análisis estadístico consistió en el análisis de varianza (ANVA) y la prueba de medias de Tukey ($P>0.05$), para lo cual se empleó el paquete para computador MINITAB, versión 14 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el peso del tallo de la plántula de tomate, hay efecto altamente significativo de los tratamientos, pero no de las repeticiones (Cuadro 1). Al comparar las medias, los tratamientos con *Bacillus amyloliquefacens* y el exudado, fueron los que sobrepasaron al valor medio general en esta variable (Figura 1). De manera general, se puede establecer que al agregar la cepa uno del *Bacillus subtilis* (J1+cBs), se sobrepasó en el valor del peso de tallo de la plántula de tomate, a cuando no se adicionó (J1-sBs). Cuando se agrego el exudado de la cepa dos del *Bacillus subtilis* (M2-sBs), el valor de la variable aventajó a la misma cepa, pero al agregar el microorganismo (M2+cBs). Al aplicar el *Bacillus amyloliquefacens* y el exudado (BCC+cBa y BCC-sBa), no hay diferencia significativa entre los valores de esta variable. De forma particular, se puede establecer que al adicionar el *Bacillus amyloliquefacens* (BCC+cBa), el superior valor adelantó en 160 por ciento al testigo absoluto (TA) (Figura 2).



Figura 14.- *Bacillus amyloliquefacens* (BCC+cBa).

Cuadro 1.- Análisis de varianza (ANVA) para el peso del tallo de plántula de tomate, con la adición de cepas de *Bacillus* promotoras del crecimiento.

Fuente	gl	SC	CM	F	P
Tratamiento	6	12807362	2134560	19.47	0.000**
Repetición	19	1971953	103787	0.95	0.528 NS
Error	114	12495344	109608		
Total	139	27274660			

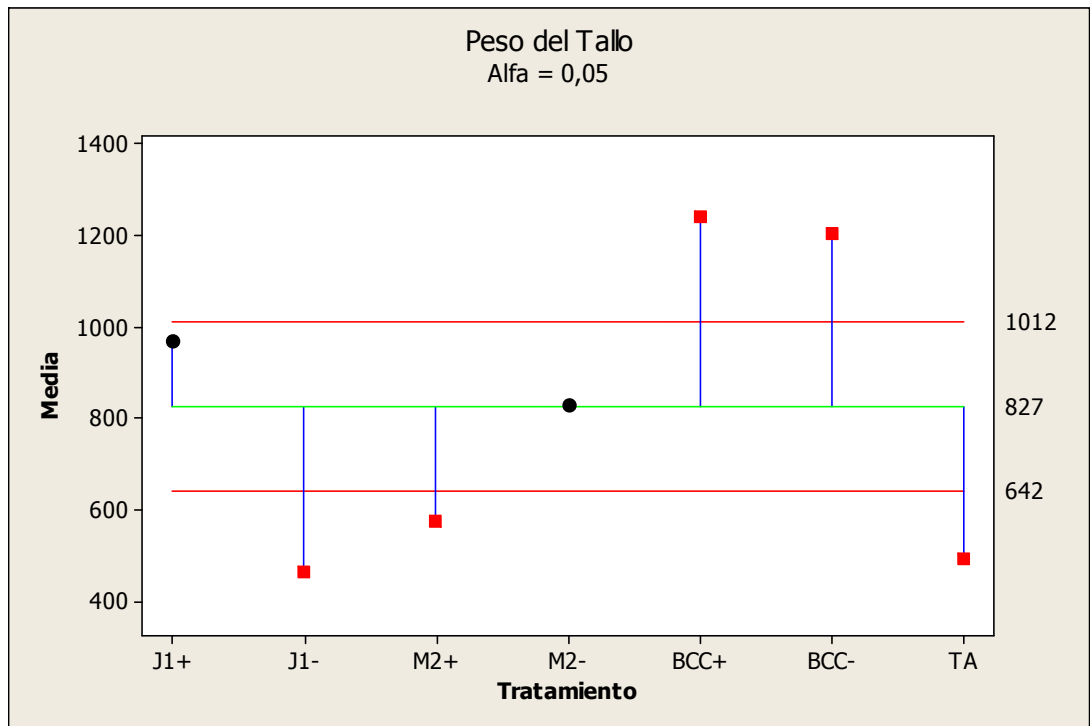


Figura 1.- Comparación de medias del peso de tallo de plántulas de tomate, con la adición de cepas de *Bacillus* promotoras del crecimiento.

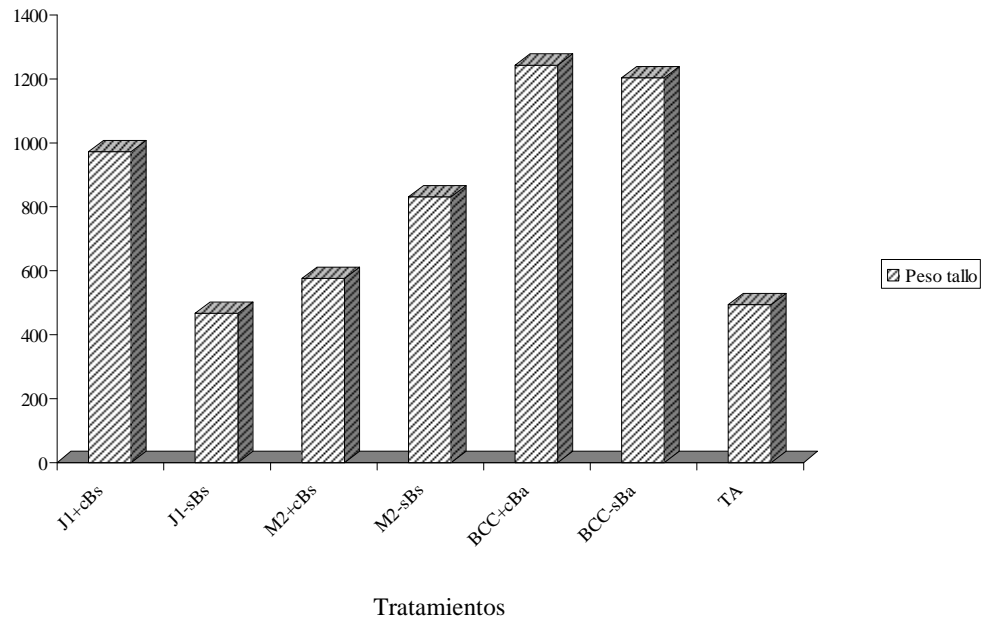


Figura 2.- Peso de tallo de plántula de tomate, con la adición de cepas de *Bacillus* promotoras del crecimiento.

En la longitud del tallo de la plántula de tomate, hay efecto altamente significativo de los tratamientos, pero no de las repeticiones (Cuadro 2). Al comparar las medias, los tratamientos con la cepa uno del *Bacillus subtilis*, y el exudado de la cepa dos de *Bacillus subtilis* y con y el exudado de *Bacillus amyloliquefacens*, fueron los que sobrepasaron al valor medio general en esta variable (Figura 3). De manera general, se puede establecer que al agregar la cepa uno del *Bacillus subtilis* (J1+cBs), se sobrepasó en el valor de la longitud de tallo de la plántula de tomate, a cuando no se adicionó (J1-sBs). Cuando se agregó el exudado de la cepa dos del *Bacillus subtilis* (M2-sBs), el valor de la variable aventajó a la misma cepa, pero al agregar el microorganismo (M2+cBs). Al aplicar *Bacillus amyloliquefacens* y el exudado de este (BCC+cBa y BCC-sBa), no hay diferencia significativa entre los valores de esta variable. De forma particular, se puede establecer que cuando se adicionó el exudado de *Bacillus amyloliquefacens* (BCC-sBa), el superior valor adelantó en 50 por ciento al TA (Figura 4 y Figura 15).

Cuadro 2.- Análisis de varianza (ANVA) para la longitud del tallo de plántula de tomate, con la adición de biofertilizantes.

Fuente	gl	SC	CM	F	P
Tratamiento	6	435.555	72.592	23.72	0.000**
Repetición	19	71.716	3.775	1.23	0.244
					NS
Error	114	348.839	3.060		
Total	139	856.110			

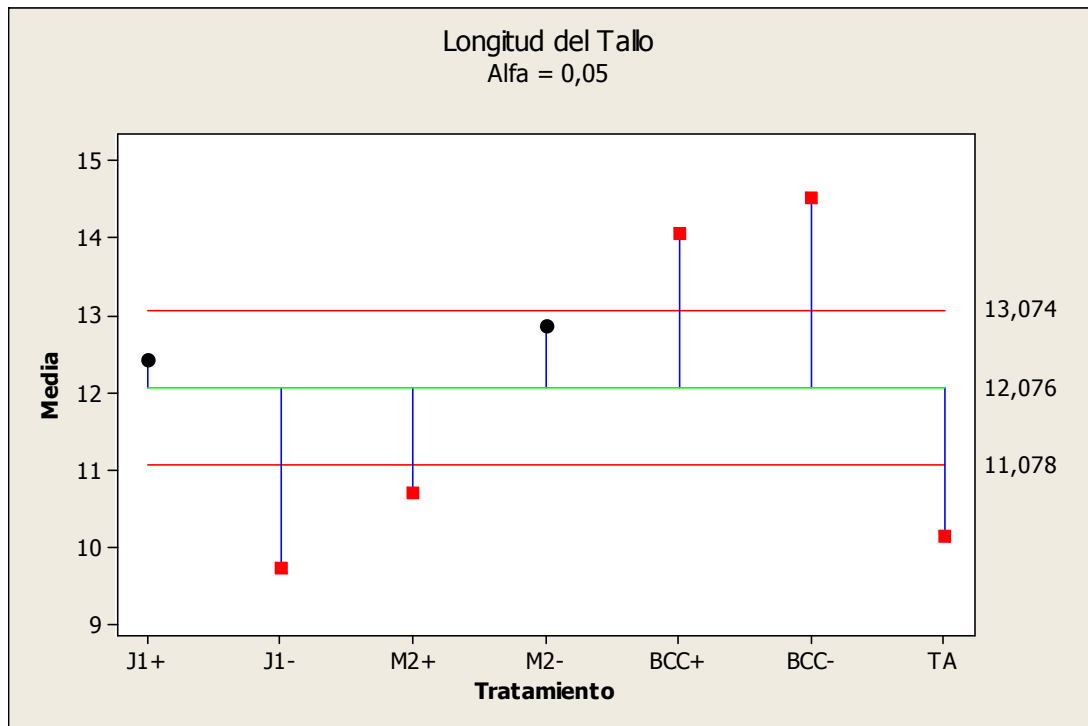


Figura 3.- Comparación de medias de la longitud de tallo de plántulas de tomate, con la adición de cepas de *Bacillus* promotoras del crecimiento.

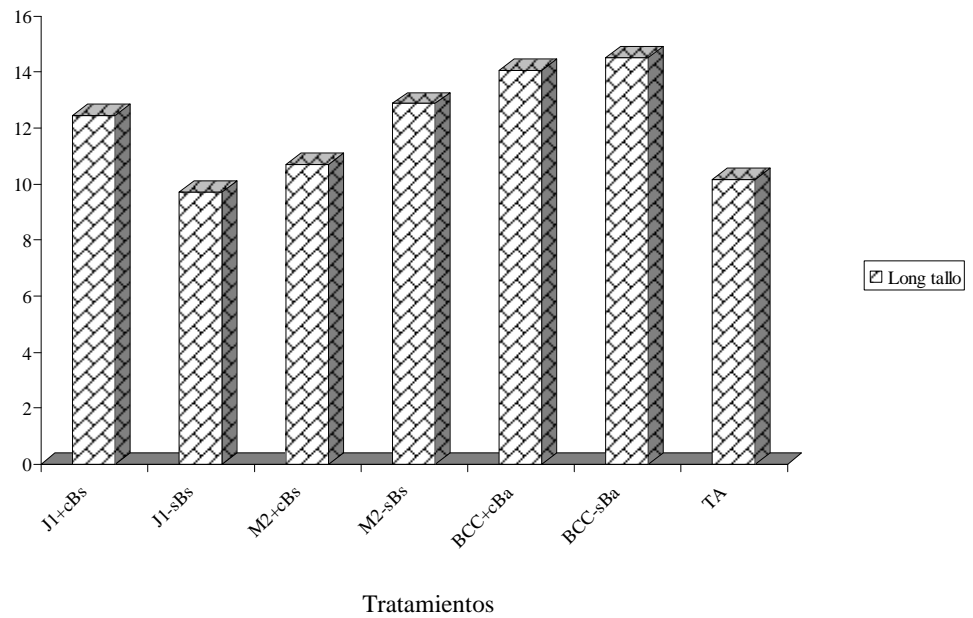


Figura 4.- Longitud de tallo de plántula de tomate, con la adición de cepas de *Bacillus* promotoras del crecimiento.

En el peso de raíz de la plántula de tomate, hay efecto altamente significativo de los tratamientos, pero no de las repeticiones (Cuadro 3). Al comparar las medias, los tratamientos con *Bacillus amyloliquefacens* y el exudado, fueron los que sobrepasaron al valor medio general en esta variable (Figura 5). De manera general, se puede establecer que al agregar la cepa uno del *Bacillus subtilis* (J1+cBs), se sobrepasó en el valor del peso de raíz de la plántula de tomate, a cuando se adicionó el exudado (J1-sBs). Cuando se agregó el exudado de la cepa dos del *Bacillus subtilis* (M2-sBs), el valor de la variable aventajó a la misma cepa, pero al agregar el microorganismo (M2+cBs). Al aplicar el *Bacillus amyloliquefacens* (BCC+cBa), se adelantó en esta variable, a cuando no se adicionó este microorganismo (BCC-sBa). De forma particular, se puede establecer que cuando se adicionó el *Bacillus amyloliquefacens* (BCC+cBa), el superior valor adelantó en 200 por ciento al TA (Figura 6 y Figura 14).

Cuadro 3.- Análisis de varianza (ANVA) para el peso de raíz de plántula de tomate, con la adición de biofertilizantes.

Fuente	Gl	SC	CM	F	P
Tratamiento	6	17817181	2969530	27.51	0.000**
Repetición	19	2247317	118280	1.10	0.364 NS
Error	114	12303741	107928		
Total	139	32368239			

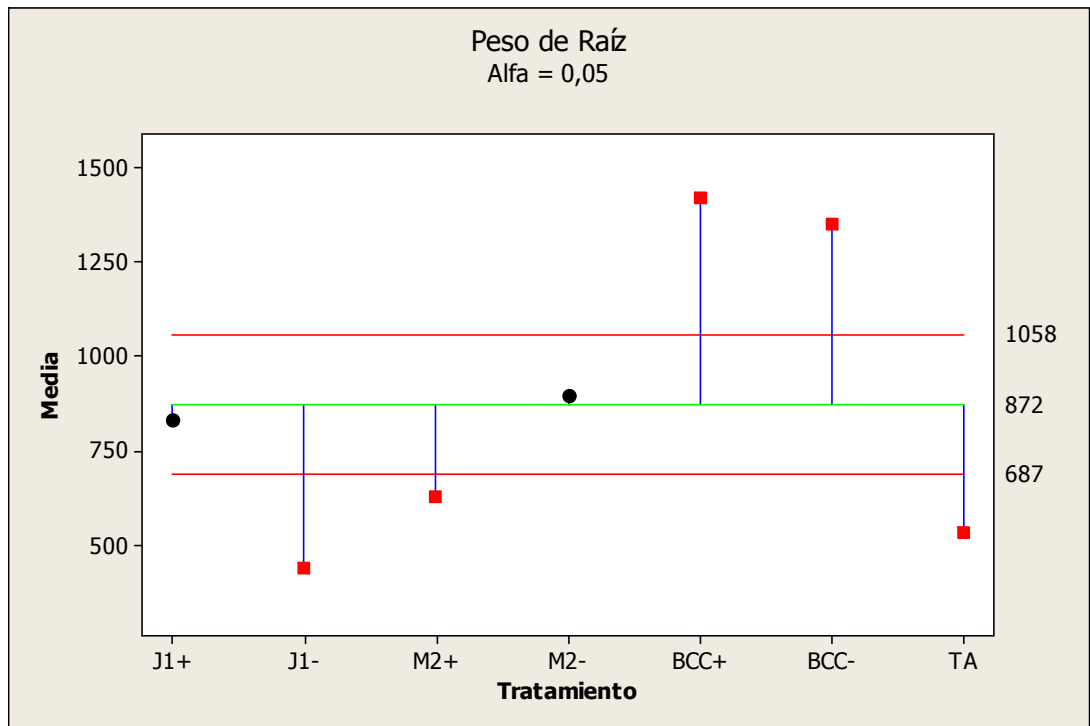


Figura 5.- Comparación de medias del peso de raíz de plántulas de tomate, con la adición de cepas de *Bacillus* promotoras del crecimiento.

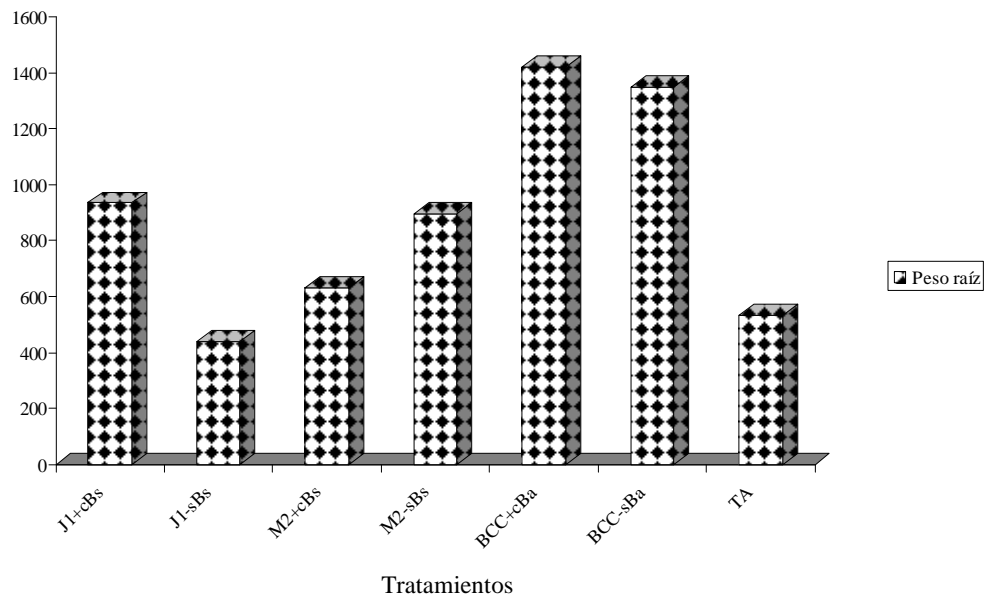


Figura 6.- Peso de raíz de plántula de tomate, con la adición de cepas de *Bacillus* promotoras del crecimiento.

En la longitud de raíz de la plántula de tomate, hay efecto altamente significativo de los tratamientos, pero no de las repeticiones (Cuadro 4). Al comparar las medias, los tratamientos con la cepa uno de *Bacillus subtilis* (J1+cBs) y sin *Bacillus amyloliquefacens* (BCC-sBa), fueron los que sobrepasaron a la media general en esta variable (Figura 7). De manera general, se puede establecer que al agregar ambas cepas del *Bacillus subtilis* (J1+cBs y M2+cBs), se sobrepasó el valor del peso de raíz de la plántula de tomate, a cuando no se adicionó en ambas cepas (J1-sBs y M2-sBs). Cuando no se agregó el *Bacillus amyloliquefacens* (BCC-sBa), el valor de la variable aventajó a la misma cepa, pero al agregar el microorganismo (BCC+cBa). De forma particular, se puede establecer que cuando no se adicionó el *Bacillus amyloliquefacens* (BCC-sBa), el superior valor adelantó en 94 por ciento al TA (Figura 8).



Figura 15.- *Bacillus amyloliquefacens* (BCC-sBa).

Cuadro 4.- Análisis de varianza (ANVA) para la longitud de raíz de plántula de tomate, con la adición de biofertilizantes.

Fuente	Gl	SC	CM	F	P
Tratamiento	6	4242.40	707.07	18.14	0.000**
Repetición	19	1007.75	53.04	1.36	0.161 NS
Error	114	4444.75	38.99		
Total	139	9694.89			

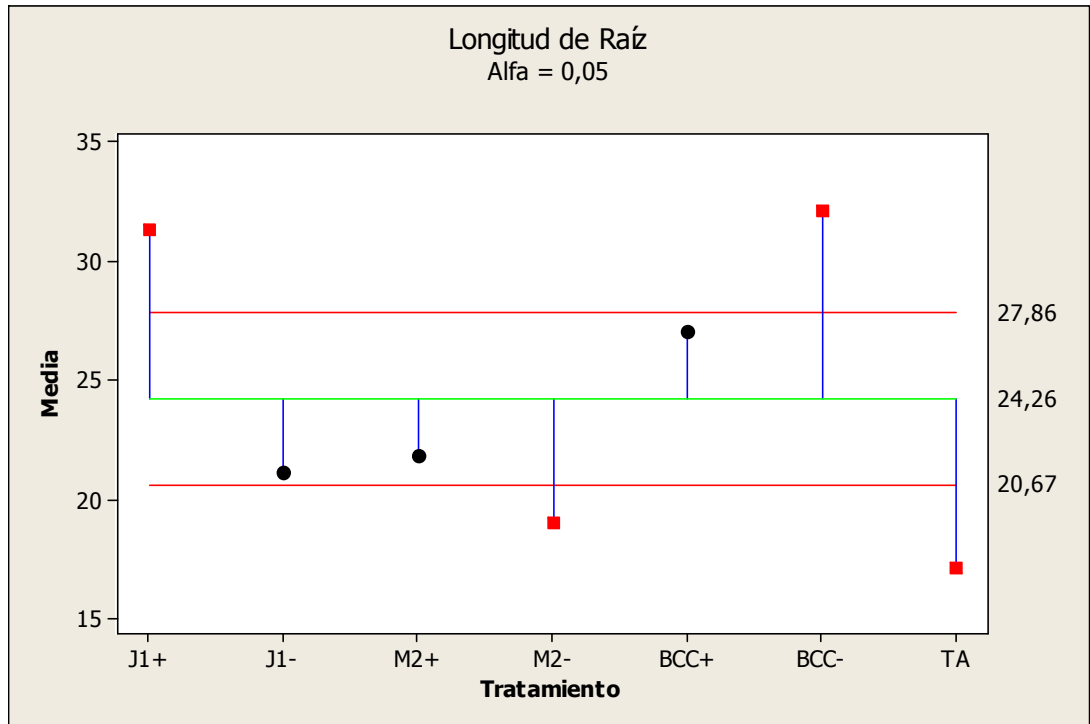


Figura 7.- Comparación de medias de la longitud de raíz de plántulas de tomate, con la adición de cepas de *Bacillus* promotoras del crecimiento.

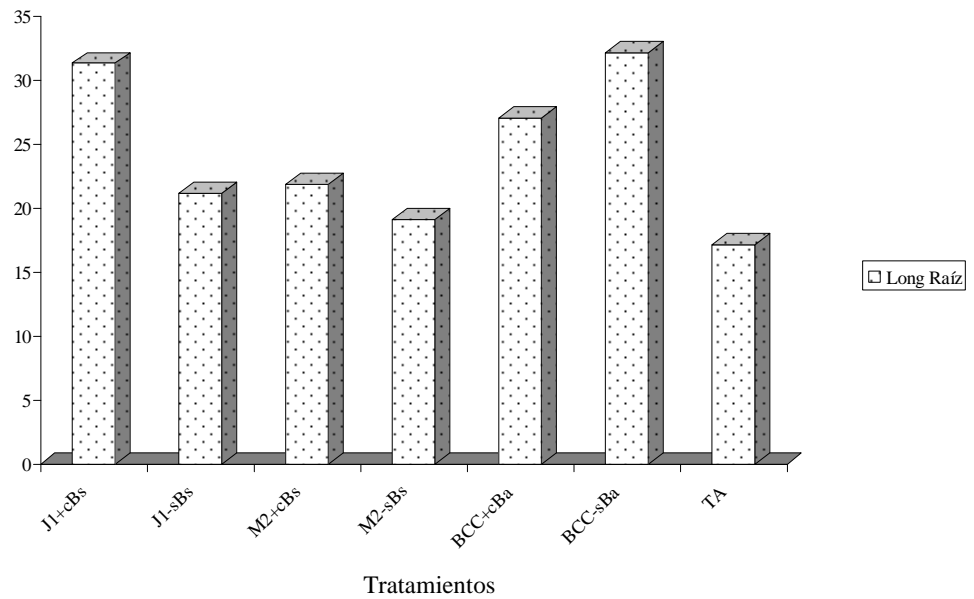


Figura 8.- Longitud de raíz de plántulas de tomate, con la adición de cepas de *Bacillus* promotoras del crecimiento.

A forma de discusión, se puede establecer que tanto el peso del tallo como de raíz superiores, se presentaron al adicionar el *Bacillus amyloliquefacens* en más de 100 por ciento al testigo absoluto; mientras que cuando no se agregó este mismo microorganismo, los valores de la longitud de tallo y raíz adelantaron al testigo absoluto, en menos del 100 por ciento. Lo anterior quiere decir que al agregar el *Bacillus amyloliquefacens*, se produce efecto positivo en el peso de tallo y raíz; pero, cuando se agrega solo el exudado, el efecto positivo fue en la longitud de ambos órganos vegetales. Así, con la adición de las dos cepas del *Bacillus subtilis*, no hay efecto significativo de estos microorganismos en la longitud del tallo y raíz.

Lo anterior significa que *Bacillus amyloliquefacens*, tiene mayor efecto cuando contiene el *Bacillus*, que solamente el exudado, ya que los resultados demuestran que las plantas donde se aplicó el tratamiento con *Bacillus*, presentan mayor peso fresco y por lo tanto la planta está más fuerte y con mejores características para transplantarse al campo; esto debido a su capacidad para solubilizar fósforo, ya que estas hidrolizan los compuestos fosfatados, para dejar al fósforo en su forma inorgánica (ION), al producir enzimas llamadas fosfatasas ácidas, las cuales cambian el pH del entorno y así facilitan que el fósforo inorgánico sea liberado por intercambio protónico al medio, remplazando los P por iones Calcio (Rodas, 2008) Lo anterior también concuerda con lo establecido por Holguín (1999), al citar que se han logrado aislar seis cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato a partir de raíces del mangle negro, las cuales son *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. taylorae*, *E. asburiae* y *Kluyvera cryocrescens*, y también dos especies a partir de raíces de mangle blanco, las que son: *Chryseomonas luteola* y *Pseudomonas stutzeri* y encontraron, que bajo condiciones “In Vitro”, *B. amyloliquefaciens* solubiliza un promedio de 400 mg de fosfato por litro de suspensión bacteriana (107 células/ml); teóricamente, esta cantidad sería suficiente para proporcionar los requerimientos diarios de fosfato de una pequeña planta terrestre y la mitad de los de una grande. Además, también Glick *et al.* (19999, mencionan que el género *Bacillus*, sintetiza ácido indolacético (AIA) a partir del triptófano en el meristemo apical en hojas jóvenes, de donde se transporta a través del floema al resto de los tejidos vegetales. La promoción de crecimiento de la raíz es uno de los principales marcadores por el cual el efecto benéfico de las rizobacterias es medido.

CONCLUSIONES

El *Bacillus amyloliquefacens*, realizó efecto positivo en el peso fresco del tallo y peso fresco de raíz de la plántula de tomate; mientras que cuando se adicionó el exudado de este mismo microorganismo, el superior efecto fue en la longitud del tallo y la raíz.

LITERATURA CITADA

- Abdul-Baki, A. 1991. Tolerance of tomato cultivars and selected germoplasm to heat stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116: 1113-1116.
- Alisedo , 1999. Chile y tomate. *Productores de hortalizas.* 8: 14-15.
- Antoun H. Prévost D (2001) PGPR activity of Rhizobium With nonleguminous plants. *J. Plant Physiol.* 28: 45-870.
- Asgar H. Zahir Z. Arshad A. Khaliq A(2002) Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biol. Fert. Soils* 35: 231-237.
- Atlas, Ronald (1997), *Principles of Microbiology*, Brown Publishers.
- Bacilio-Jiménez M, Aguilar-Flores S, Ventura-Zapata E, Pérez-Campos, Bouquelet E, Zenteno E (2003) Chemical characterization of root exudates from rice (*Oriza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant Soil* 249: 271-277.
- Benizri E, Baudoin E, Guckert A (2001) Root colonization by inoculated *plant growth-promoting rhizobacteria*. *Biocont. Sci. Technol.* 11: 557-574.
- Bianciotto V, Lumini E, Lanfranco L, Minerdi D, Bonfante P, Peroto S (2000) Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family Gigasporaceae. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 4503-4509.
- Fllser J., Fromm H., Nagel R., Winter K., 1995. Effects of previous intensive agricultural management on microorganisms and the biodiversity of soil fauna. *Plant soil* 170: 123-129.

- Carson K., Meyer J.M. & Dilworth M. 2000. Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biology & Biochemistry*. 32: 11-21.
- Canché, C. C. G. 2001. Análisis de crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum Mill*) con películas termorreguladores en invernadero. Tesis de Licenciatura.UAAAN. Buenivista, Saltillo, Coahila. México 111p.
- Canovas, M. F. 1995. El cultivo de tomate: Manejo del cultivo sin suelo. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. España. Pp 235- 247.
- Centeno, G. E. C. 1986. Cultivo del tomate (*Lycopersicum esculentum Mill*) y su mejoramiento genético. Monografía.UAAA. . Buenivista, Saltillo, Coahila. México. 141 p
- Chamarro, L. J. 1995. Cultivo del tomate: Anatomía y fisiología de la Planta. Editorial Mundi-Prensa. Mdrid, España. Pp. 54-69.
- Cruz, M. E. 2002. Efecto de diversos sustratos en la producción de plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum Mill* Var. Rio Grande) bajo condiciones de invernadero. Tesis de Licenciatura. UAAA. . Buenivista, Saltillo, Coahila. México 46 p.
- Essalmani H. & Lahlou H. 2003. Mécanismes de bioprotection des plantes de lentile par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* sp. *Lentis*. C.R. Biologies. 326 : 1163-1173.
- Glick, Patten, Holguin y Penrose (1999), *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*, Imperial College Press.
- González, C. M. 2003. El *Bacillus subtilis* inmovilizado en espumas hidrofílicas induce tolerancia a NaCl en tomate y lechuga. Tesis de Licenciatura. UAAA. . Buenivista, Saltillo, Coahila. México 51 p.

- Guillén-Rodríguez, D., Farías-Rodríguez, R., López-Barbosa, E.C., Peña-Cabriales, J.J, y Sánchez-Yáñez, J.M. 2001. Granos de almacén una fuente de aislamiento de *Bacillus thuringiensis* . *Ciencia Nicolaíta*. 28: 179-192.
- Gustafson, R. (1993). Technical Bulletin Kodiak. Plano, Texas, U.S.A. pp.12. of Plant-Microbe Interactions. I Tikhonovich, BJJ Lugtenberg and N Provorov (Eds.) APS Press, St. Paul, MN. Vol. 4:305-308.
- Hassan Dar G., Zargar M.Y. & Beigh G.M. 1997. Biocontrol of Fusarium Root Rot in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using Symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. *Microb. Ecol.* 34: 74-80
- Kennedy A.C. Smith K.L. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils, *Plant Soil* 170: 75-86.
- Hernandez. C. J. L. 1999. Aplicación de biorreguladores bajo el sistema de hidroponía en el cultivo del tomate. Tesis de Licenciatura. UAAAN. . Buenivista, Saltillo, Coahila. México 57 p.
- INFOAGRO 2004. <http://www.infoagro.com/hortalizas/>.
- Kloepper, J. W., and Schroth, M. N., Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes, in proc. IVth int. Conf. Plant. Pathogenic Bacteria, Vol. 2, Station de Phatologie, INRA, Angers, Ed., Gibert-Clarey, Tours, France, 1978, 879.
- Lazarovits, G. & Nowak, J. (1997). Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment, *HortScience*, 32:188-192.
- Lorente Herrera, Juan (1998), *Biblioteca de la Agricultura. Tomo 3. Horticultura y cultivo en invernadero*, Editorial Idea Books.

- Loustalot. M. E. 1998. Produccion de plántulas con alta tecnología en invernadero. *Hortalizas, Frutos y Flores*. 7: 16-20.
- Lugtenberg BJJ, GV Bloemberg, A Bolwerk, D van den Broek, FM Cazorla, T Chin-A-Woeng, K Eijkemans, FD Kamilova, I Kuiper, IHM Mulders, ET van Rij y S de Weert (2004). Microbial control of tomato foot and root rot. En: *Biology of Plant-Microbe Interactions*. I Tikhonovich, BJJ Lugtenberg and N Provorov (Eds.) APS Press, St. Paul, MN. Vol. 4:305-308.
- Mayak S., Tirosh T. & Glick B. 2004. Plant growth- promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 565-572.
- Mínero, A. A. 1998. Producción y manejo de transplantes II. Sustratos, Fertilización y Riego. *Productores de hortalizas*. 7: 18-21.
- Muñoz Rojas, J. y Caballero Mellado, J., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito, en Martínez Romero, E. y Martínez Romero, J. (editores), *Microbios en línea* <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>, UNAM, México, 2001, pp. 157-176.
- Muñoz Rojas, J. y Caballero Mellado, J., Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth, *Microbial Ecology*, 46, 2003, pp. 454-464.
- Nutri –CompostTM 2005 <http://www.bioland.cl/nutricompoust-mo.htm>.
- Perrine F., Rolfe B., Hynes M. & Hocart C. 2004. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of indolacetic acid and tryptophan following aqueous chloroformate derivatisation of *Rhizobium* exudates. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 723-729.
- Pillay, V.K. & Nowak, J. (1997). Inoculum density, temperature and genotype effects on epiphytic and endophytic colonization and *in vitro* growth

promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) by a pseudomonad bacterium. *Can. J. Microbiol.* 43:354-361.

Rodas Pinochet A. 2008. Por que el Fosforo es importante para el desarrollo de las raíces. Artículo Técnico Chile.

www.engormix.com/s_forums_view.asp?valor=10009

Torres JL, Rosazza JPN (2001) Microbial transformation of *p*-coumaric acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. *J Nat Prod* 64:1408–1414

Wulff, E. G. Mguni, C. M; Mansfeld-Giese, K, Fels, J., Lübeck, M., and Hockenhull, J. 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amylolyquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Plan Pathology* 51:574-584.

www.icex.es/.../0,6558,5518394_5518983_5537315_0_0_1,00.html?...invernader%20%20bancomext+%20AMPHI

Yanni Y., Rizk R., Fattah F.K. & Squartine A. 2001. The beneficial plant growth promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice root. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28: 845-870

Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., and Shirata, A. 2001 Antimicrobial activity of cultura filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 91:181-187.

ANEXOS



Figura 9.- Tratamientos J1+, J1-,M2+,M2-,BCC+,BCC-,TA.



Figura 10.- Tratamiento J1+ vc. TA.



Figura 11.- Tratamiento J1- vc. TA.



Figura 12.- Tratamiento M2+ vc. TA.



Figura 13.- Tratamiento M2- vc. TA.



Figura 14.- Tratamiento BCC+ vc. TA.



Figura 15.- Tratamiento BCC- vc. TA.



Figura 16.- TA.