

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Respuesta Fisiológica en la Semilla de Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* L.)

Inoculada con Cepas de *Azospirillum spp*

Por:

RAÚL RENÉ CORRAL ACOSTA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México
Diciembre 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Respuesta Fisiológica en la Semilla de Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* L.)
Inoculada con Cepas de *Azospirillum spp*

Por:

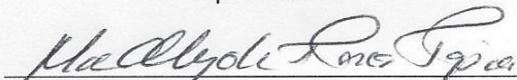
RAÚL RENÉ CORRAL ACOSTA

TESIS

Presenta como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada

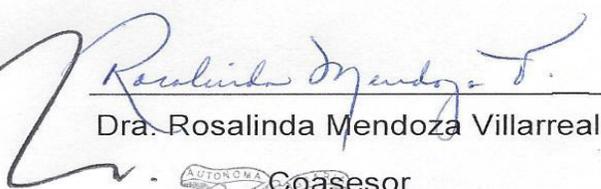


M.P. María Alejandra Torres Tapia

Asesor Principal


Dra. Francisca Ramírez Godina

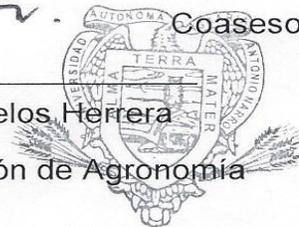
Coasesor


Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Coasesor

Dr. Leobardo Bañuelos Herrera

Coordinador de la División de Agronomía



Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2014

DEDICATORIAS

A mi familia en especial a mis padres que me dieron su apoyo durante toda la carrera y no me dejaron solo ni en las buenas ni en las malas y por enseñarme a distinguir lo bueno y lo malo a lo largo de la vida, por heredarme lo mejor que se puede aprovechar que es la educación.

A mis amigos que son para toda la vida y que influyen en la toma de decisiones en la vida y que me orientaron en las buenas y en las malas.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a la UAAAN por brindarme cobijo y la oportunidad de realizarme profesionalmente.

A mis maestros por compartir conocimientos y guiarme por el buen camino de mi formación profesional.

A mi asesor de tesis M.P. Alejandra Torres Tapía por compartir su colaboración, paciencia y brindarme su sabiduría para el desarrollo de esta investigación

INDICE

INDICE DE CUADROS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	III
I.- INTRODUCCIÓN	1
Objetivo	3
Hipótesis.....	3
II. REVISION DE LITERATURA	4
Distribución geográfica	4
Importancia económica.....	4
Clasificación botánica.....	5
Descripción botánica.....	5
Temperatura óptima	6
Paquete Tecnológico.....	6
Historia de <i>Azospirillum</i>	8
Interacción con la planta.....	9
Efectos fisiológicos en la inoculación de <i>Azospirillum sp.</i> en semillas	11
III. MATERIALES Y METODOS	13
Descripción del área experimental	13
Material Genético	13
Tratamientos	13
Metodología.....	14
Variables evaluadas.....	15
Semillas sin germinar	17
Semillas duras. Son aquellas que permanecen duras al final de la prueba de germinación, ya que no absorben agua porque tienen cubierta impermeable.	17
Análisis Estadístico	18
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
V. CONCLUSIONES	29
VI. LITERATURA CITADA	30

INDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1 Identificación de los tratamientos con bacterias <i>Azospirillum sp.</i> inoculados en semilla de Tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa L.</i>).....	14
Cuadro 4.1 Cuadrados medios, significancia y comparación de medias la respuesta fisiológica de germinación de plántulas normales, plántulas anormales y semillas sin germinar en semilla de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa L.</i>) inoculada con cepas de <i>Azospirillum sp.</i>	20
Cuadro 4.2 Cuadrados medios, significancia y prueba de comparación de medias en la respuesta semillas enfermas en la prueba de germinación en semilla de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa L.</i>) inoculada con cepas de <i>Azospirillum sp.</i>	23
Cuadro 4.3 Cuadrados medios, significancia y prueba de comparación de medias en la respuesta de longitud media de hipocotilo, longitud media de radícula, peso seco e índice de velocidad de emergencia en la prueba de germinación en semilla de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa L.</i>) inoculada con cepas de <i>Azospirillum sp.</i>	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1 Comportamiento de las formas de inoculación (condiciones) con cada tratamiento en plántulas normales, plántulas anormales, semillas sin germinar y semillas enfermas.....	21
Figura 4.2 Comportamiento de la inoculación de las diferentes cepas de <i>Azospirillum</i> sp. y concentraciones en semilla de tomate de cascara en porcentaje de plántulas normales, plántulas anormales, semillas sin germinar y semillas enfermas.	24
Figura 4.3 Tipo de inoculación con la bacteria en diferente semilla para las variables LMH y LMR.....	26

RESUMEN

La agricultura orgánica es un sistema de producción que utiliza al máximo los recursos de naturales, minimizando el uso de recursos no renovables, protegiendo el medio ambiente y la salud humana; actualmente en la producción de alimentos, una alternativa biotecnológica es el uso de biofertilizantes, quienes han ganado gran popularidad en México, avanzando en el desarrollo y aplicación de productos a base de microorganismos en diferentes cultivos, como es la aplicación de bacterias *Azospirillum sp.* que en esta investigación se evaluó la respuesta fisiológica en semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa L.*) inoculada en una condición de contacto con la semilla todo el tiempo y una segunda condición imbibiendo la semilla con la bacteria durante tres horas, ambas condiciones a concentraciones de 10^4 , 10^6 y 10^8 UFC, utilizando cuatro cepas de *Azospirillum sp.* originarias de Tomate, Chile, Nopal y Trigo). Se evaluó semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa L.*) criollo, una vez inoculada la bacteria en los tratamientos se determinó la calidad fisiológica de la semilla mediante la capacidad de germinación (Plántulas Normales PN, Plántulas Anormales PA, Semillas sin germinar SSG), semillas enfermas SE, longitud media de hipocotilo LMH, longitud media de radícula LMR, índice de velocidad de emergencia y peso seco de plántulas; los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con un factorial en completamente al azar con anidamiento, teniendo factor A, condiciones; factor B, tratamientos (Cepas bacterianas) y C, concentraciones de la bacteria.

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativa en condiciones, siendo C1 mejor en todas las variables estudiadas con excepción en SE. Entre cepas estudiadas, la de origen de trigo fue altamente significativa con 5.83% de SE contra la cepa de chile que tuvo 11.5%; mientras que en las concentraciones, 10^4 UFC resultó con mayor porcentaje de SE con 10.56%, mientras que 10^8 UFC tan solo con 6.81%.

En LMH, la interacción condición por tratamiento se tuvo diferencia significativa, condición 1 tuvo una longitud de 1.58cm contra la condición 2 que 1.2cm y en los tratamientos la cepa de Trigo fue la mejor con 1.57cm y la menor longitud fue la de Chile con 1.26cm.

En lo que corresponde al índice de velocidad de emergencia arrojó una diferencia significativa en tratamientos donde la cepa de Trigo fue la mayor con 32.55 plántulas/día destacando de la cepa de Nopal con 28.02 plántulas/día.

La bacteria *Azospirillum sp.*; de origen Trigo a 10^4 UFC tiene un efecto positivo en la capacidad de germinación en semillas de tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* L.) generando plántulas normales superando al testigo y reduce plántulas anormales y semillas sin germinar.

Palabras Clave.- *Azospirillum sp.*, *Condiciones*, *Concentraciones*, *cepas*, *Physalis ixocarpa* L.

I.- INTRODUCCIÓN

La agricultura orgánica es un sistema de producción que trata de utilizar al máximo los recursos naturales, minimizando el uso de los recursos no renovables, protegiendo el medio ambiente y la salud humana. Este sistema de producción orgánica y sus productos están teniendo mayor importancia a nivel mundial, donde en la actualidad existen alrededor de 31 millones de hectáreas orgánicas en 120 países, cuya producción se orienta hacia la exportación.

Del 2001 al 2002, hubo un incremento de cuatro mil millones de dólares en ventas en tan solo un año, de 19 000 millones a 23 000 millones; debido al cuidado de la salud y la protección del medio ambiente, donde los consumidores prefieren productos orgánicos, libres de residuos tóxicos, modificaciones genéticas, aguas negras y radiaciones. En Europa, para el año 1985, se tenían 111 000 hectáreas, aumentando en 2003 hasta 5.5 millones, lo que corresponde al 2 % de la superficie agrícola mundial; Estados Unidos su superficie orgánica creció 580 000 hectáreas en 10 años. México es situado en el 18º lugar mundial, con casi 216 000 hectáreas, donde el 82.8 % de la superficie orgánica está distribuida en los estados de Chiapas, Oaxaca, Michoacán, Chihuahua y Guerrero, ocupando el 70 % de esta los dos primeros estados.

El no utilizar fertilizantes químicos y plaguicidas sintéticos ayuda en protección del medio ambiente y la salud humana, evitando la contaminación, tanto del suelo como en ríos y mares siendo unos de los principios básicos de la agricultura orgánica; que en la actualidad, una de las alternativas biotecnológicas para la producción de estos alimentos, es el uso de biofertilizantes, quienes han ganado gran popularidad en México, incrementando su desarrollo y aplicación en diferentes cultivos.

Pueden emplearse bacterias u hongos microscópicos, llamados micorrízicos, que se asocian en forma natural con las raíces de las plantas, beneficiando su crecimiento y el rendimiento de los cultivos como es la bacteria *Azospirillum sp.*, la cual se relaciona con su capacidad de producir y metabolizar compuestos reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas (Okon and Labandera Gonzáles 1994) tales como

ácido indol acético; citocininas (Tien *et.al.*, 1979); giberelinas (Bottini *et.al.*, 1989) y etileno (Strzelczyk *et.al.*, 1994), además de otras moléculas como el ácido abscísico (ABA) (Perrig *et.al.*, 2007) y la diamina cadaverina (CAD) (Cassán *et.al.*, 2003); así mismo pueden estar asociadas al metabolismo del nitrógeno, a través de la fijación biológica en condiciones de vida libre o por el incremento de la actividad nitrato reductasa en condiciones endofíticas. Por lo anterior se planteó el siguiente objetivo e hipótesis:

Objetivo

Evaluar la respuesta fisiológica en semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* L.) inoculada en diferentes condiciones, cepas y concentraciones de *Azospirillum* sp.

Hipótesis

Al menos una de las condiciones de inoculación de alguna cepa *Azospirillum* sp. a una concentración, tiene una respuesta positiva en la calidad fisiológica en semillas tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* L.).

II. REVISION DE LITERATURA

Distribución geográfica

Physalis (Solanaceae) es un género americano que se distribuye en Estados Unidos de América, México, Centroamérica, Sudamérica y las Antillas, con algunas especies presentes en el viejo mundo. El género agrupa cerca de 90 especies, setenta de ellas son endémicas del territorio mexicano considerando su centro de origen y diversidad (D'Arcy, 1991; Martínez, 1998). Además del número de especies, la alta riqueza genética de *Physalis* en México, se expresa en la existencia de poblaciones silvestres, toleradas, fomentadas, cultivadas y domesticadas, asociadas a diferentes tipos de vegetación y condiciones ecológicas (Peña y Santiaguillo, 1999).

Importancia económica

El tomate de cáscara se cultiva comercialmente en todas las entidades del territorio mexicano, cuya producción se destina al mercado nacional y de exportación. En las últimas décadas esta especie se ha consolidado como una de las principales hortalizas en México y como un cultivo potencial en diferentes países de América y Europa (Santiaguillo *et. al.*, 1997). No obstante la importancia de esta hortaliza, su cultivo se realiza con base en variedades nativas o criollas, por lo que es necesario generar variedades mejoradas cada vez de mayor rendimiento para abastecer la demanda de su fruto.

Clasificación botánica

Con base en Whittaker(1969), Cronquist (1993) y D'Arcy (1979), la clasificación botánica del género *Physalis* es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Dicotyledoneae (Magnoliopsida)

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Subfamilia: Solanoideae

Tribu: Solaneae

Género: *Physalis*

Descripción botánica

De acuerdo con Waterfall (1967), las plantas del género *Physalis* se describen como: anuales o perennes, herbáceas, de unos pocos centímetros a 3 m de alto.

Tallos

Con ramificación dicotómica, cilíndricos, lisos, poco angulados o angulados; en algunas especies llegan a enraizar en los nudos basales.

Hojas

Pecioladas, alternas, pero a veces dos o aún tres aparentemente juntas debido a la reducción de los entrenudos, láminas foliares generalmente ovadas, en ocasiones orbicular lanceoladas o linear lanceoladas, el margen entero, repando, sinuado, aserrado, o dentado.

Flores

Pediceladas generalmente solitarias en las axilas de las hojas, a veces varias y fasciculadas, raramente en falsos racimos.

Corolas

Desde raramente tabular expandidas a campanulada- rotáceas, urceoladas o el limbo más o menos reflejo, de color amarillo, con cinco manchas contrastantes ocupando superficies variables del área arriba de la parte tabular, sólidas en color, o cada una consistiendo de varios a muchos puntos separados, a veces las manchas no contrastan fuertemente, o bien ausentes.

Cáliz

En el fruto acrescente, inflado vesicular, cubre por completo a la baya durante la fructificación.

Fruto

Es una baya succulenta, de color blanco, verde, amarillo, anaranjado, o púrpura, de 0.8- 1.5cm de diámetro (hasta 4 cm en el tomate cultivado), García (2001) indica hasta 6 cm en el tomate cultivado; semillas numerosas, reniformes, amarillas o de color café.

Temperatura óptima

La temperatura óptima promedio que demanda el tomate de cáscara al momento de sembrar es de 20 a 25° C, su crecimiento vegetativo requiere de 22 a 26° C, pero con temperaturas mayores de 32° C puede provocar una deshidratación del tubo polínico y en consecuencia abortos y frutos mal formados.

Paquete Tecnológico

Preparación del Terreno: Es recomendable tener un terreno con buen nivel. También es necesario un buen barbecho con el fin de airear el terreno y enterrar

hierbas y semillas, después los rastreos serán convenientes para que la tierra quede blanda y dócil. La marca es dependiendo de la variedad que se decida sembrar, puede variar de 1.50 a 1.80m.

Cultivos: El primer cultivo mecánico se dará antes del desahije cuando es siembra directa, el segundo después del desahije y posteriormente el cierre de cultivo. Dependiendo del tipo de terreno y de las condiciones ambientales se puede dar otro cultivo.

Fertilización: cada terreno tiene diferentes necesidades de nutrientes, por lo tanto es recomendable hacer un análisis de suelo antes de cualquier aplicación de fertilizante. Los nutrientes que preferentemente son usados para el tomate de cáscara son la urea, 11-12-0, 18-46-0, sulfato de potasio y 17-17-17. El fertilizante se puede aplicar entre 6 y 8 pulgadas de profundidad al centro del surco y completar la fertilización al cierre de cultivo.

Siembra: la profundidad de siembra depende del tipo de terreno donde se va a trabajar, en la tierra seca la profundidad recomendada es de 1 a 2 cm. de profundidad y en tierra húmeda colocar la semilla donde se encuentre la humedad.

Densidad de siembra

Siembra Directa. La densidad de la siembra depende del equipo siembra que se utilice, si usa equipo de precisión será de 400 a 500 g/ha, con equipo mecánico de 500 a 800g/ha. y manual de 800 a 1000 g/ha.

Trasplante: Se lleva a cabo cuando la planta tiene aproximadamente 10 cm de alto, se colocan 4 plantas por metro lineal, en sistema de plantación se requieren entre 22,000 y 24,000 plantas por hectárea, es necesario que la raíz se encuentre muy húmeda así como el terreno al momento de plantar.

Control de Hierbas: Para evitar el nacimiento de hierbas nocivas es necesario después del sembrado, realizar una aplicación de bensulide en el lomo del surco en una banda de 40 cm.; antes del riego de auxilio es recomendable dar un cultivo a mano con azadón para eliminar las hierba y acercar tierra a la planta.

Riegos: El primer riego debe ser pesado a trasporte y que la humedad alcance el lomo del surco y germine la semilla, en tierras arenosas primero se riega y posteriormente se realiza la siembra en tierra húmeda. Los siguientes deben realizarse dependiendo al tipo de terreno y los requerimientos del cultivo.

Historia de *Azospirillum*

Aun cuando *Spirillum lipoferum* fue descrito en 1925 por Beijerinck, esta bacteria estuvo olvidada por varias décadas. Son las observaciones de Döbereiner en 1973 las que iniciarían la época moderna de esta bacteria. Estudios taxonómicos de *S. lipoferum* conducen a su reclasificación en un género nuevo, *Azospirillum*.

Actualmente son reconocidas seis especies en el género *Azospirillum*. Las dos primeras en ser descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense*, siendo éstas las más ampliamente estudiadas. Posteriormente fueron descritas las especies *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense* y *A. largomobile* siendo el nombre de esta especie corregido a *A. largimobile*. Pocos años antes ésta especie fue considerada como un sinónimo de la especie *A. lipoferum*. Recientemente, en honor de quien impulsara los estudios con este género bacteriano y descubriera otros diazótrofos, se ha propuesto la especie candidata *A. doebereineriae*.

Pocos años después del redescubrimiento de *Azospirillum* y hasta alrededor de 1993, este género fue el más estudiado entre las bacterias asociadas a plantas. La capacidad de *Azospirillum* para estimular el crecimiento de las plantas y de aumentar el rendimiento de los cereales promovió numerosos estudios sobre la ecología, fisiología y genética de esta bacteria. En la actualidad su uso comercial comienza a extenderse en diferentes países, incluido México.

Clasificación Taxonómica de *Azospirillum*

Según el manual de Bergey (1984) la clasificación es:

Reino: Procaryote

División: Glacilicute

Clase: Scotobacteria

Familia: No existe

Género: *Azospirillum*

Especie: *Lipoferum y Brasilense*

Interacción con la planta

Probablemente, una vez que las células de *Azospirillum* se han adaptado a las condiciones del ambiente rizosférico y han logrado llegar a la superficie de las raíces, debido a sus características quimio y aerotácticas, se iniciará el establecimiento de la asociación.

Diferentes estudios han mostrado que *A. brasilense* tiene la capacidad para adherirse a las raíces de plantas gramíneas como el mijo (*Pennisetum purpureum*) y *Digitaria decumbens*, trigo, maíz, así como a las raíces de plantas de otras familias que incluyen al algodón y tomate, e incluso a superficies inertes como poliestireno y arena. La capacidad de *Azospirillum* para adherirse a las raíces, al menos a las de mijo, es significativamente mayor que la mostrada por otras bacterias de la comunidad rizosférica como *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Klebsiella* o *Pseudomonas*, e incluso que *E. coli*. La asociación de *Azospirillum* con las raíces de las plantas se desarrolla en dos etapas completamente independientes. La primera consiste en una adsorción rápida, débil y reversible, la cual es dependiente de proteínas de la superficie bacteriana del tipo de las adhesinas en conjunto con la participación del flagelo polar. La segunda fase consiste de un anclaje lento pero firme e irreversible que alcanza su máximo nivel 16 h después de la inoculación, el cual parece ser dependiente de un polisacárido extracelular de *Azospirillum*. Los resultados de un estudio reciente sugieren la posibilidad de que una proteína de la membrana externa de *Azospirillum* participe en el proceso de adherencia a las raíces de las plantas Croes *et. al.*, 1993. El proceso de adherencia de *Azospirillum* a las raíces de las

plantas ha sido revisado recientemente. En diversos casos se ha reportado la aparición de material fibrilar que contribuye al anclaje de *Azospirillum* a las raíces de diversas plantas, describiéndose como esencial para el anclaje a las partículas de arena.

La inoculación de diversas plantas con *Azospirillum* ha mostrado que los principales sitios de colonización son las áreas de elongación celular y las bases de los pelos radicales. Sólo algunas células de *Azospirillum* llegan a adherirse a la cofia o a los pelos radicales. Sin embargo, fue observada la presencia de *Azospirillum* dentro del mucigel que se acumula en la cofia. La inoculación de raíces de trigo con una cepa de *Azospirillum* que expresa constitutivamente el gen reportero *gusA* mostró que en los primeros días de la asociación las células bacterianas colonizan específicamente los sitios de emergencia de las raíces laterales y las regiones de los pelos radicales, tanto de la raíz primaria como de las raíces secundarias y posteriormente la superficie de la raíz. Vande Broek 1993.

En plantas de trigo fue observado que la inoculación de *Azospirillum* induce cambios en la morfología de los pelos radicales, siendo éstos cambios significativamente mayores que los causados por *Rhizobium leguminosarum* o *Azotobacter chroococcum*, los cuales son mínimos. Además, fue observado que la inoculación con 10^5 a 10^6 células de *Azospirillum* causa tanto la elongación como el aumento de la superficie total de la raíz, en tanto que la inoculación de 10^8 y 10^9 células causa la inhibición del desarrollo de ésta. Aparentemente, el incremento del tamaño del sistema radical se debe, al menos parcialmente, al aumento de la división celular y al intenso crecimiento de la zona de elongación de las raíces. Es de interés señalar que los sitios que coloniza *Azospirillum lipoferum* son diferentes, dependiendo de la variedad de la planta, al menos en el caso del arroz. La capacidad de *Azospirillum* para colonizar las raíces de las plantas es variable dependiendo de la cepa. Se encuentran restringidas al ambiente rizosférico y son capaces de formar colonias solamente en la superficie de la raíz de plántulas de trigo, en tanto que otras cepas son encontradas frecuentemente en altas densidades en los espacios intercelulares de la raíz, así como en el interior de los pelos radicales.

En ensayos realizados con varias cepas de *A. brasilense* y mutantes con reducida capacidad de sintetizar AIA, en medio de cultivo químicamente definido, Prisen *et. al.*, (1993), determinaron la existencia de Indol3-acetamida en la fracción sobrenadante del medio de crecimiento, con lo que se presentaba evidencia directa de la capacidad bacteriana de sintetizar este precursor.

Otros trabajos han demostrado la respuesta benéfica de la co-inoculación con *Rhizobium* y *Azospirillum* en leguminosas, a nivel de la respuesta de la fijación biológica del nitrógeno (*Yahalom et. al.*, 1990) no solo como un aumento en el número de nódulos, sino que adicionalmente como una mayor actividad nitrogenasa de los simbiosomas.

Otra investigación demostró el efecto favorable del inoculante reflejó un mejor aprovechamiento del fertilizante aportado con el fertirriego. También Alfonso *et. al.*, (2001) en Cuba Utilizando *Azospirillum brasilense* como biofertilizante logró incrementos o efectos positivos. Bashan y Vázquez, (2000). Encontraron que el efecto de la inoculación de *Azospirillum sp.* Sobre el rendimiento total aumenta generalmente con el crecimiento de las plantas y está en un rango de 10-30%.

Efectos fisiológicos en la inoculación de *Azospirillum sp.* en semillas

Según Kloepper *et. al.*, (1991), algunas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR; Plant Growing Promoting Rhizobacteria) productoras de auxinas pueden incrementar la emergencia de semillas vegetales por lo cual se conocen como bacterias promotoras de emergencia, dentro de ellas se encuentra *Azospirillum brasilense*.

Desde el punto de vista fisiológico, la capacidad de *Azospirillum sp.* para sintetizar auxinas y transferirlas al tejido vegetal determinaría dos tipos de respuesta, dependiendo del tipo de planta inoculada. En leguminosas, determinará una modificación a nivel de la fijación biológica de nitrógeno sobre la formación y funcionalidad de nódulos. La mayoría de los miembros del género *Rhizobium* y

Bradyrhizobium inducen la formación de nódulos en raíces de leguminosas y estas estructuras proveen a la planta de nitrógeno tomado y fijado desde la atmósfera. Hace más de 70 años desde que Thimann (1936). Si bien *Azospirillum sp.* es incapaz de inducir la formación de nódulos propiamente dichos en leguminosas, se ha probado que la aplicación exógena de ciertas auxinas sintéticas en concentraciones súper fisiológicas en raíces de gramíneas, induce la formación de estructuras tumorales denominadas paranódulos que serían efectivamente colonizadas por *Azospirillum* y en ellas, la bacteria fijaría nitrógeno de manera más eficiente (Christiansen-Weniger, 1998).

En otros trabajos, Schmidt *et. al.*, (1988), demostraron que la co-inoculación con *Rhizobium meliloti* (productor ineficiente de AIA) y *Azospirillum brasilense*, (productor eficiente de AIA) en semillas de *Medicago sativa*: (a) incrementaba significativamente el número de nódulos en la raíz del huésped (b) que este aumento estaba en relación directa al número de azospirilos presentes en el medio y (c) que esta respuesta era imitada por la adición de AIA en forma exógena. Por otro lado, en gramíneas, el crecimiento de la raíz es uno de los parámetros fisiológicos de mayor interés a la hora de caracterizar y seleccionar una cepa promotora del crecimiento vegetal. El rápido establecimiento de la planta en el suelo, mediado por la elongación de la raíz principal ó por la proliferación de las raíces laterales y adventicias, resulta ventajoso desde el punto de vista adaptativo, porque aumenta su capacidad de anclarse al suelo y obtener agua y nutrientes del ambiente en un estadio crítico del desarrollo vegetal.

III. MATERIALES Y METODOS

Descripción del área experimental

El presente estudio se realizó en el laboratorio de producción de semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas perteneciente al Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada al sur de la Ciudad de Saltillo en las coordenadas 25°21'18" N, 101°02" O con una elevación de 1776 m.s.n.m.

Material Genético

El material genético utilizado fueron frutos maduros de tomate de cáscara (*Physalis ixpcarpa* L.) criollo, de los cuales se extrajo la semilla la cual fue limpiada y acondicionada por peso mediante el uso de un aparato soplador "South Dakota", con una abertura de 2 cm.

Tratamientos

Se estudiaron cuatro cepas de *Azospirillum sp.* provenientes de raíces de tres cultivos hortícolas chile, nopal, tomate colectadas en el Municipio de General Cepeda, Coahuila; así como una proveniente de raíz de trigo del Municipio de Navidad N.L.

Las cepas fueron aisladas en cloruro de sodio al 0.09% y después en medio NFB solido a 30°C como medio selectivo, para el reconocimiento de bacterias del género *Azospirillum sp.*, con la confirmación de pruebas bioquímicas como catalasa, movilidad y tinción de Gram.

Se obtuvieron al reproducirse en concentraciones de 10x10 UFC/ml tomándose como punto de partida para obtener concentraciones con las que se realizó el experimento 10x8, 10x6, 10x4, en las cuales se hicieron diluciones de 1 en 100 mL a

partir de la original. Teniendo cuatro tratamientos de tres concentraciones y un testigo como se muestra en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Identificación de los tratamientos con bacterias *Azospirillum sp.* inoculados en semilla de Tomate de cáscara (*Physalis ixpcarpa L.*).

No. de Tratamiento	Cepa	Concentración UFC mL ⁻¹
<i>Azospirillum sp.</i>		
1	Tomate	10 ⁸ , 10 ⁶ , 10 ⁴
2	Chile	10 ⁸ , 10 ⁶ , 10 ⁴
3	Nopal	10 ⁸ , 10 ⁶ , 10 ⁴
4	Trigo	10 ⁸ , 10 ⁶ , 10 ⁴
5	Testigo	

Metodología

En el presente estudio se realizaron dos métodos de inoculación de las cepas de bacterianas con su correspondiente concentración.

Método 1.

Se aplicaron 2 mL de cada tratamiento y concentración en un papel filtro Whatman No. 1 dentro de una caja Petri, sembrando 50 semillas de cada tratamiento por concentración.

Método 2.

Se inocularon 200 semillas con cada cepa bacteriana y concentración, dejando un tiempo de imbibición de tres horas y posteriormente se sembraron 50 semillas inoculadas sobre papel filtro Whatman No. 1 humedecido con agua destilada dentro de una caja Petri; teniendo en cada método, cuatro repeticiones por tratamiento y concentración y un testigo con agua destilada por cada método, evaluando las diferentes pruebas fisiológicas tales como capacidad de germinación (plántulas normales, plántulas anormales y semillas sin germinar) y vigor (primer conteo, índice de velocidad de emergencia, longitud media de hipocotilo y radícula, así como la tasa de crecimiento de plántula).

Variables evaluadas

Capacidad de germinación

Todos los tratamientos, concentraciones y repeticiones en cajas Petri, fueron llevados a una cámara germinadora Marca Biotronette Mark III LAB LINE, a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con 8 horas luz y 16 horas oscuridad, por ocho días, haciendo riegos con agua destilada según lo necesitó.

Haciendo un primer conteo de plántulas normales a los cuatro días después de la siembra, con el cual fue determinado el vigor de la semilla dado en porcentaje de germinación; y un segundo conteo a los cuatro días después, evaluando el número total de las plántulas normales de la prueba, plántulas anormales, semillas sin germinar y semillas enfermas. La capacidad de germinación corresponde a la media de las plántulas normales de los dos conteos de las repeticiones de 50 semillas por cada tratamiento y concentración.

Plántulas Normales

Se consideran plántulas normales aquellas que poseen sus estructuras esenciales para producir en suelo de buena calidad preparado en el laboratorio, estas plántulas, bajo condiciones de agua, luz y temperatura.

1. Se consideran plántulas normales aquellas que presenten las siguientes estructuras esenciales:
 - Sistema radicular bien desarrollado, incluyendo raíz primaria, excepto para aquellas plantas.
 - Presencia de los dos cotiledones.
 - Presentar una combinación de estructuras esenciales como sistema de raíz bien desarrollado, sistema apical bien desarrollado, dos cotiledones, hojas primarias verdes y expandidas, brote terminal o ápice.

2. Aquellas que presenten ligeros defectos en las estructuras anteriores o cierto retardo, sin que esto limite su crecimiento y desarrollo y revelen un desarrollo vigoroso y balanceado.

- Presentan una raíz primaria dañada y raíces laterales lo suficientemente largas y vigorosas como para sostener la plántula en el suelo.
- Plántulas con daño superficial o deterioro en el hipocotilo o cotiledones, siempre y cuando el daño no afecte los tejidos conductores.
- Plántulas que presenten solamente un cotiledón sano.

3. Aquellas que estén invadidas o dañadas por hongos y bacterias, siempre y cuando sea evidente que la fuente de infección no es la semilla, y que presenten las estructuras esenciales.

Plántulas anormales

Las que no se pueden clasificar como normales por tener alguna deficiencia en desarrollo de sus estructuras esenciales, lo que les impide su desarrollo normal cuando crece en suelo preparado y en condiciones favorables de agua, luz y temperatura.

- Presentan una combinación de defectos en sus estructuras esenciales que limitan la continuación de su crecimiento y desarrollo. Estos defectos son bien marcados y varían según las especies. Para una acertada clasificación es conveniente referirse al Manual de Evaluación de Plántulas (AOSA 1983)
- Plántulas dañadas, sin cotiledones con fisuras o lesiones que dañen el tejido conductor de hipocotilo, o raíz; sin raíz en aquellas especies donde esta estructura es esencial.
- Plántulas deformes, con desarrollo débil o desequilibrado de las estructuras primordiales: hipocotilos poco desarrollados; talluelos hinchados y raíces sin desarrollo; plantas acuosas o bien que no presentan desarrollo después de haber salido de los cotiledones.

- Plántulas con estructuras esenciales deterioradas por hongos o bacterias, excepto en el caso que se determine que dicha infección no proviene de la semilla.
- Plántulas con estructuras esenciales deterioradas por hongos o bacterias, excepto en el caso que se determine que dicha infección no proviene de la semilla.

Semillas sin germinar

Semillas duras. Son aquellas que permanecen duras al final de la prueba de germinación, ya que no absorben agua porque tienen cubierta impermeable.

Semillas latentes. Se denominan así las semilla viables (diferentes de las semillas duras) que no germinan aun cuando estén bajo condiciones óptimas de la especie.

Semillas muertas. Son aquellas que no germinen y que no se les clasifique como latentes o duras, deberán ser consideradas como semillas muertas. Se debe registrar el porcentaje de este tipo de semillas. No muestran ningún signo de desarrollo y comúnmente están flácidas, decoloradas y con presencia de hongos.

Vigor

Índice de velocidad de emergencia

Se realizó en forma convencional, igual a la anterior utilizando los dos métodos, uno aplicando el tratamiento y concentración directo al papel filtro y el segundo inoculando directamente a la semilla en el tratamiento y concentración imbibido por tres horas; sembrando 50 semillas por repetición en caja petri sobre papel filtro. Llevando a una cámara germinadora Marca Biotronette Mark III LAB LINE a una temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con 8 horas luz y 16 horas oscuridad. Para la evaluación, se tomaron en cuenta las plántulas emergidas por día hasta completar los días totales de la prueba de germinación.

$$\text{IVE} = \sum \frac{\text{No. plántulas}}{\text{Día}} + \dots \frac{\text{No. plántulas}}{\text{Día}}$$

Longitud media de hipocotilo y radícula

Los tratamientos se llevaron a una cámara germinadora Marca Biotronette Mark III LAB LINE a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con 8 horas luz y 16 horas oscuridad. Para la evaluación, se tomaron en cuenta 10 plántulas normales por cada repetición de cada concentración y tratamiento, midiendo con una regla la longitud de hipocotilo y radícula.

Tasa de crecimiento de plántulas (Peso Seco de Plántulas)

Llevando a una cámara germinadora Marca Biotronette Mark III LAB LINE a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con 8 horas luz y 16 horas oscuridad. Para la evaluación, se tomaron en cuenta las plántulas normales y se pusieron en una estufa Marca Shel Lab a 65°C durante 24 horas, se pusieron en un desecador durante 15 minutos posteriormente se pesaron las plántulas de cada repetición, concentración y tratamiento. Para sacar el promedio se sumaron el peso de las cuatro repeticiones que tenía cada concentración y se dividió entre cuatro así teniendo la media de cada concentración.

Análisis Estadístico

Los ensayos se establecieron bajo el diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones.

El análisis estadístico de la información generada se realizó como un factorial en completamente al azar con anidamiento, considerando como factor A las formas de

inoculación (Condiciones) estudiadas, como factor B los tratamientos (Cepas de bacterianas) y el C concentraciones de la bacteria, bajo el siguiente Modelo estadístico:

$$Y_{ij/k} = \mu + e_k + V_i/e_k + C_j + C_j * e_k + V_i C_j / e_k + EE_{ij/k}$$

Donde:

Y_{ij/k}=variable observada de la i-ésima cepas, en la j-ésima concentración dentro de la k-ésima condiciones.

μ=Efecto de la media general

e_k= efecto de la k-ésima condición

V_i/e_k= efecto de la i-ésima cepa dentro de la k-ésima condición

C_j= efecto de j-ésima concentración

*C_j*e_k=efecto de la interacción entre la j-ésima concentración con la k-ésima condición*

V_iC_j/e_k= Efecto de la interacción de la i-ésima cepa y la j-ésima concentración dentro de la k-ésima condición.

EE_{ij/k}= Error Experimental

También se hicieron pruebas de comparación de medias dadas por DMS ($p \leq 0.05$) en cada una de las variables; entre condiciones y concentraciones.

Todos los análisis de varianza y pruebas de medias, se realizaron mediante el uso del paquete computacional Statistical Analysis System (SAS, 2004).

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los resultados de varianza de la prueba de germinación, en la variable de plántulas normales se encontró una diferencia altamente significativa en la forma de aplicación de las diferentes cepas bacterianas (condiciones) como se muestra en el Cuadro 4.1; mientras que en las restantes fuentes de variación, tratamientos, concentraciones e interacciones entre ellas no hubo diferencia en los resultados, teniendo un coeficiente de variación de 18.8 %.

Cuadro 4.1 Cuadrados medios, significancia y comparación de medias la respuesta fisiológica de germinación de plántulas normales, plántulas anormales y semillas sin germinar en semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* L.) inoculada con cepas de *Azospirillum* sp.

Fuentes de variación	Grados de Libertad	Plántulas Normales	Plántulas Anormales	Semilla sin germinar
Condiciones	1	11051.04**	1410.67**	4902.04**
Tratamientos	3	165.36 ^{NS}	92.61 ^{NS}	254.93*
Concentraciones	2	12.54 ^{NS}	8.67 ^{NS}	42.79 ^{NS}
Condiciones*Tratamientos	3	10.82 ^{NS}	23.11 ^{NS}	56.60 ^{NS}
Condiciones*concentraciones	2	9.54 ^{NS}	80.17 ^{NS}	36.29 ^{NS}
Tratamientos*concentraciones	6	57.21 ^{NS}	9.61 ^{NS}	154.18 ^{NS}
Cond*Trat*Conc	6	101.99 ^{NS}	58.78 ^{NS}	79.01 ^{NS}
Error	72	6529	3870	45.96
% Coeficiente de variación		18.8	43.23	28.52
Prueba de comparación de medias				
	Condición 1	61.38a	13.13b	16.63b
	Condición 2	39.92b	20.79 ^a	30.92 ^a

^{NS}= No significativo, **=Altamente significativo, *= Significativo, Prueba de comparación de medias: literales iguales no hay diferencia entre medias, literales diferentes si existe diferencia entre medias.

Por considerar la diferencia significativa en las condiciones, se realizó una prueba de comparación de medias (Cuadro 4.1), encontrando que la inoculación de la cepa bacteriana de forma constante (Condición 1) tuvo un mayor efecto en la germinación hasta un 61.4 % de promedio, a diferencia del testigo quien presentó 59 % de plántulas normales; mientras que la inoculación temporal (Condición 2) obtuvo una menor respuesta hasta de 40% pero siempre mayor que el testigo que fue de 36.5 %; coincidiendo estos resultados en su respuesta fisiológica al aplicar la bacteria con Doebbelaere y Okon (2003), quien aseguran que en cultivos como trigo y maíz, al ser inoculados con *Azospirillum* como tratamiento de semillas promueve un mayor número de plántulas normales; sin embargo la forma de inoculación de la bacteria marcó una diferencia del 21.37% más germinación en la primera condición que en la segunda; como se puede observar en la Figura 4.1

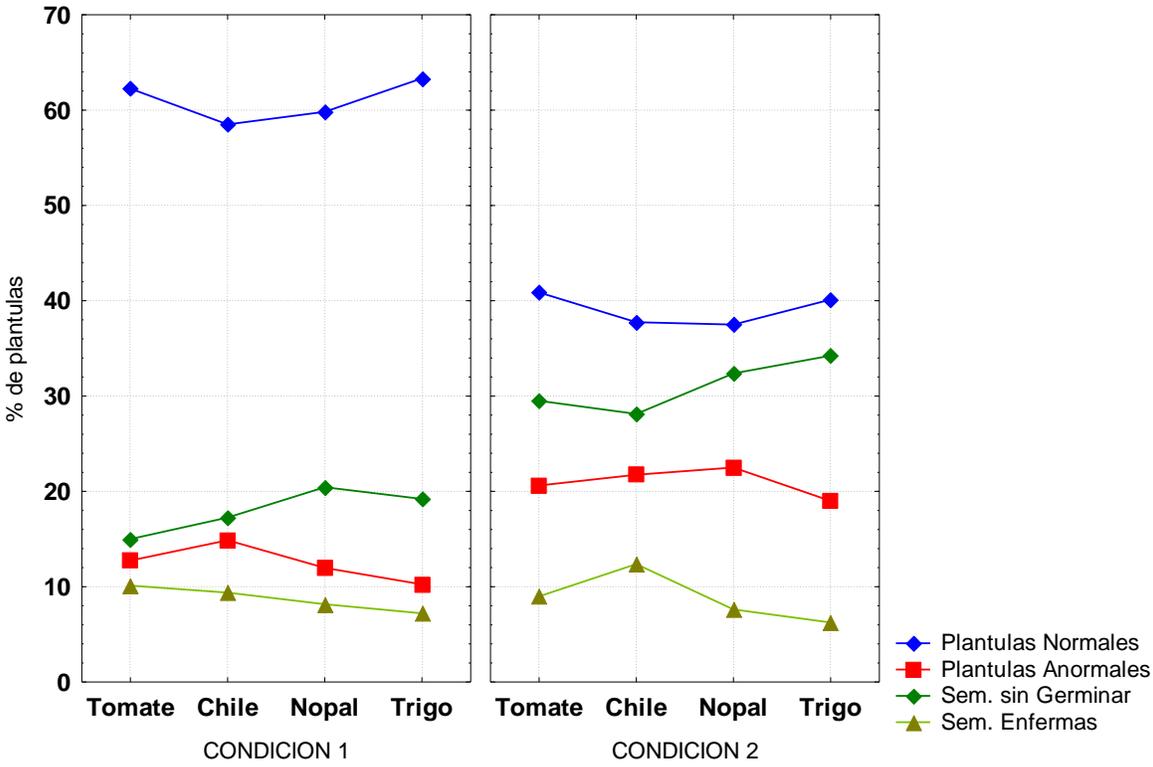


Figura 4.1 Comportamiento de las formas de inoculación (condiciones) con cada tratamiento en plántulas normales, plántulas anormales, semillas sin germinar y semillas enfermas.

Con respecto a la variable de plántulas anormales, se tuvo una diferencia altamente significativa en las formas de inoculación de bacteria (condiciones) como se observa en el Cuadro 4.1; mientras que en las restantes fuentes de variación, tratamientos, concentraciones e interacciones entre ellas no hubo diferencia significativas en los resultados, teniendo un coeficiente de variación de 43.23%.

En la prueba de comparación de medias se observó que la condición 1 tuvo menor cantidad de plántulas anormales con un 13.1%, que la condición 2 quien presentó 20.8%; esto indica que la inoculación de la bacteria *Azospirillum* en semillas incrementa la germinación y la biomasa del cultivo como lo menciona Bellone (1997), en cereales que por tal motivo la cantidad de anomalías disminuye.

En la variable de semillas sin germinar, se tuvo una diferencia altamente significativa en la forma de inoculación de las bacterias (condiciones), en los 4 tratamientos se encontró una diferencia significativa, sin embargo, aritméticamente el tratamiento 1 y 2 fueron los que tuvieron menor porcentaje de semillas sin germinar con 14% comparado con el 19.25% del tratamiento 3 y 4, mientras que el testigo tiene un 27% siendo el que tiene mayor porcentaje de semillas sin germinar en el resto de las fuentes de variación no existió significancia teniendo un coeficiente variación 28.52 %, como se observa en el Cuadro 4.1; en la comparación de medias se tiene que la condición 2 tuvo una mayor cantidad de semillas sin germinar que la condición 1.

En la variable de semillas enfermas observadas se tuvo una diferencia altamente significativa en las diferentes cepas de la bacteria (tratamientos) y una diferencia significativa en concentraciones, como se puede observar en el Cuadro 4.2; mientras que en las restantes fuentes de variación, tratamientos, concentraciones e interacciones entre ellas no hubo diferencia en los resultados, teniendo un coeficiente de variación de 49.11%.

Cuadro 4.2 Cuadrados medios, significancia y prueba de comparación de medias en la respuesta semillas enfermas en la prueba de germinación en semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* L.) inoculada con cepas de *Azospirillum* sp.

Fuente de variación	G. I.	Semillas enfermas
Modelo	23	49.03
Condiciones	1	18.38 ^{NS}
Tratamientos	3	145.82 ^{**}
Concentraciones	2	112.5 [*]
Condiciones*Tratamientos	3	40.38 ^{NS}
Condiciones*Concentraciones	2	6.0 ^{NS}
Tratamiento*Concentraciones	6	35.94 ^{NS}
Cond*Trat*conc	6	16.33 ^{NS}
Error	72	18.21
% Coeficiente de variación		49.11
Prueba de comparación de medias		
Tratamiento 1		9.75 ab
Tratamiento 2		11.50 a
Tratamiento 3		7.67 bc
Tratamiento 4		5.83 c
Concentración 1		10.56 a
Concentración 2		8.69 ab
Concentración 3		6.81 b

NS= No significativo, **=Altamente significativo, *= Significativo, Prueba de comparación de medias: literales iguales no hay diferencia entre medias, literales diferentes si existe diferencia entre medias.

Dentro de la diferencia altamente significativa de tratamientos y diferencia significativa en concentraciones, se realizó una comparación de medias mostrando que la mejor cepa bacteriana (Cuadro 4.2); se encontraron dos grupos estadísticos en tratamientos y dos en concentraciones, donde los tratamientos 3 y 4 obtuvieron el menor porcentaje de semillas enfermas entre 5.83-7.8 % (siendo del grupo c), seguidos de los tratamientos 1 y 2 entre 9.75 a 11.5%, siendo el tratamiento 2 el de más porcentaje de semillas enfermas con 11.5 %.

En la prueba de medias de concentraciones, la respuesta de mayor cantidad de semillas enfermas resultó 10⁴ (concentración 1) con 10.56% quien resultó ser la

concentración menos indicada para este cultivo, a diferencia de 10^8 (concentración 3) con un 6.81%,

La respuesta de la aplicación de las diferentes cepas y concentraciones en la semilla de tomate de cascará en forma general se encontró que la cepa de Trigo obtuvo una mayor cantidad de plántulas normales a bajas concentraciones (10^4) y menor cantidad de plántulas anormales y semillas sin germinar (Figura 4.2).

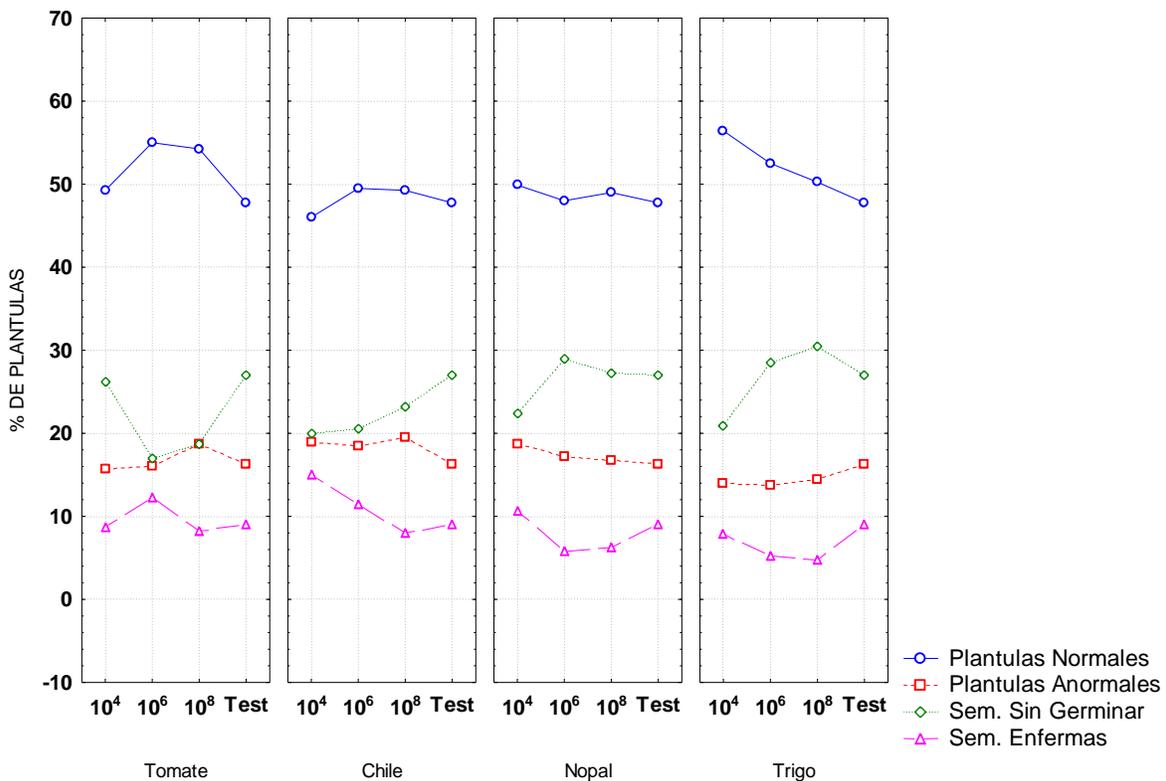


Figura 4.2 Comportamiento de la inoculación de las diferentes cepas de *Azospirillum* sp. y concentraciones en semilla de tomate de cascará en porcentaje de plántulas normales, plántulas anormales, semillas sin germinar y semillas enfermas.

Para la variable de Longitud media de hipocotilo (LMH) se encontró una diferencia altamente significativa teniendo un Coeficiente de Variación de 24.28%, donde su prueba de comparación de medias mostró que en las formas de inoculación de la bacteria con 1.58 cm obtuvo un mayor promedio de longitud y en la segunda condición en menor con 1.20 cm (Cuadro 4.3).

Con respecto a la fuente de variación en la interacción condiciones por tratamientos en esta variable se obtuvo una diferencia significativa, donde la cepa de trigo resultó ser la de mejor longitud con 1.57 cm, seguida de la cepa de nopal con 1.38 cm quienes fueron el primer grupo estadístico en la prueba de comparación de medias la cepa de menor LMH fue la de tomate con 1.35 cm como se muestra en la Figura 4.3.

Cuadro 4.3 Cuadrados medios, significancia y prueba de comparación de medias en la respuesta de longitud media de hipocotilo, longitud media de radícula, peso seco e índice de velocidad de emergencia en la prueba de germinación en semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* L.) inoculada con cepas de *Azospirillum* sp.

Fuente de variación	G. I.	Long. media de hipocotilo	Long. media de radícula	Peso seco	Índice de velocidad de emergencia
Modelo	23	0.374	3.85	4.97	224.02
Condiciones	1	3.48**	65.89**	36.26**	4442.03**
Tratamientos	3	0.390 ^{NS}	0.36 ^{NS}	2.81 ^{NS}	82.45*
Condiciones*Tratamientos	3	0.640*	2.68 ^{NS}	4.12 ^{NS}	21.39 ^{NS}
Concentraciones	2	0.058 ^{NS}	0.26 ^{NS}	3.97 ^{NS}	4.47 ^{NS}
Condiciones*Concentraciones	2	0.074 ^{NS}	0.17 ^{NS}	3.97 ^{NS}	11.86 ^{NS}
Tratamientos*Concentraciones	6	0.096 ^{NS}	1.13 ^{NS}	3.18 ^{NS}	36.69 ^{NS}
Cond*Trat*conc	6	0.20 ^{NS}	0.95 ^{NS}	3.84 ^{NS}	24.32 ^{NS}
Error	72	0.114	0.98	2.34	11.91
% Coeficiente de Variación		24.28	43.69	70.91	11.37
Prueba de comparación de medias					
Condición 1		1.58a	3.09 a	1.54b	37.13a
Condición 2		1.20b	1.44b	2.77 ^a	23.53b
Tratamiento 1		1.35 b	2.31 a	1.79 ^a	30.46 b
Tratamiento 2		1.26 b	2.10 a	2.05 ^a	30.29 b
Tratamiento 3		1.38ab	2.25 a	2.61 ^a	28.02 c
Tratamiento 4		1.57 a	2.33 a	2.16 ^a	32.55 a

^{NS}= No significativo, **=Altamente significativo, *= Significativo, Prueba de comparación de medias: literales iguales no hay diferencia entre medias, literales diferentes si existe diferencia entre medias.

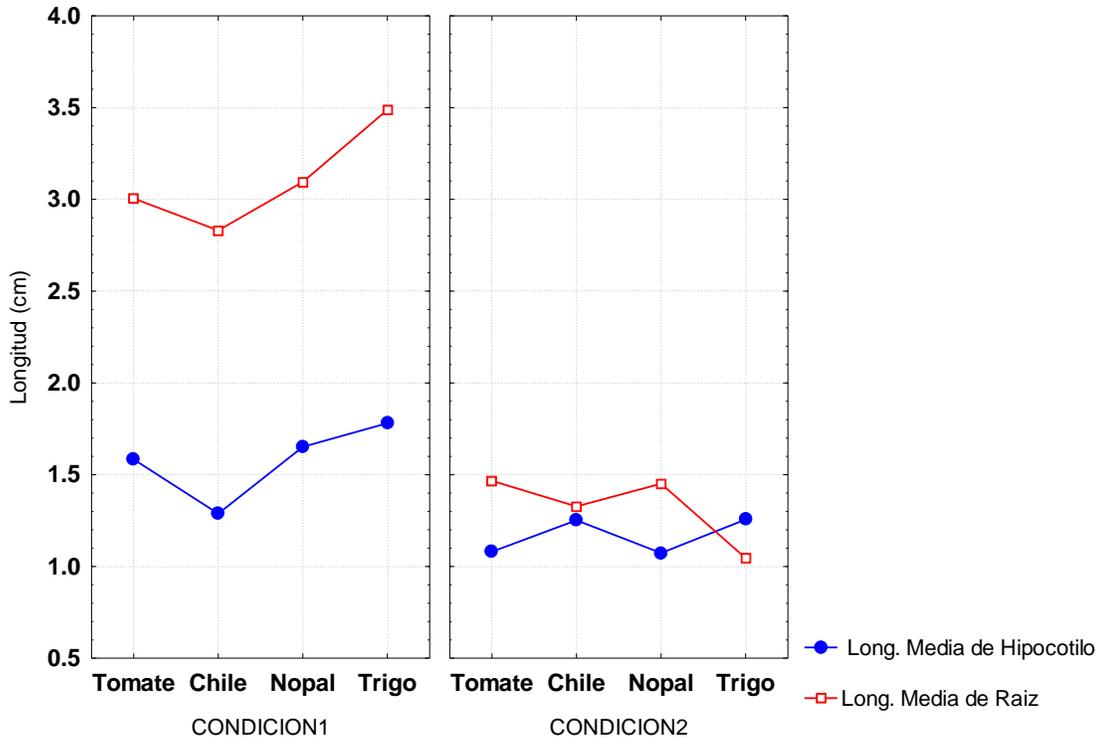


Figura 4.3 Tipo de inoculación con la bacteria en diferente semilla para las variables LMH y LMR

En la variable de longitud media de radícula (LMR), solo se mostró una diferencia altamente significativa en las forma de inoculación o condiciones de inoculación, en general esta condición tuvo 3.1 cm de radícula en promedio que marcó la diferencia de la condición 2 con 1.43 cm; dentro de la primera condición tuvo mayor LMR el tratamiento 4 (cepa de originaria de Trigo) con la concentración 1 teniendo hasta 4.66 cm; coincidiendo con Schmidt *et. al.*, (1988); quienes demostraron que la inoculación con *Azospirillum brasilense* (productor eficiente de AIA) en semillas de *Medicago sativa*, incrementaba significativamente la elongación de la raíz principal ó por la proliferación de las raíces laterales y adventicias, resulta ventajoso desde el punto de vista adaptativo, porque aumenta su capacidad de anclarse al suelo y obtener agua y nutrientes del ambiente en un estadio crítico del desarrollo vegetal, en el resto de las fuentes de variación no se obtuvo una diferencia significativa, se obtuvo un Coeficiente de Variación de 43.69% como se observa en el Cuadro 4.3.

Sin embargo, en lo que respecta a la variable de Peso Seco (PS) se encontró una diferencia altamente significativa en las formas de inoculación de las bacterias, donde la Condición 1 obtuvo menor peso seco 1.54 mg/plántula; mientras que la condición 2 se encontró un peso de 2.77 mg/plántula. En los tratamientos, se pudo observar que el tratamiento 4 (cepa de origen Trigo) en una concentración 3 en la condición 2 mostró el más alto valor de peso seco presentado en el estudio con 3.09 mg/plántula.

En la variable de Índice de Velocidad de Emergencia (IVE) se tuvo una diferencia altamente significativa en la manera de inoculación de las bacterias, mostrando que la Condición 1 obtuvo un promedio de 37.132 plántulas/día con respecto a la condición 2 quien tuvo una menor cantidad de 23.528 plántulas/día plántulas/día como se muestra en el Cuadro 4.3; Michiels, y J. Vanderleyden. (1991), mencionan que la asociación de *Azospirillum* con las raíces de las plantas se desarrolla en dos etapas completamente independientes; donde la primera consiste en una adsorción rápida, débil y reversible, la cual es dependiente de proteínas de la superficie bacteriana del tipo de las adhesinas en conjunto con la participación del flagelo polar; y la segunda fase consiste de un anclaje lento pero firme e irreversible que alcanza su máximo nivel 16 h después de la inoculación, el cual parece ser dependiente de un polisacárido extracelular de *Azospirillum*; todo ello puede explicar el comportamiento de las formas de inoculación que se utilizaron en este estudio donde la Condición 1 en muchas de las variables estudiadas tuvo un mejor resultado ya que esta estuvo la bacteria en un tiempo constante y sin exceso de agua, mientras que la condición 2 solo estuvo 3 horas y no tuvo tiempo la bacteria de adherirse a la semilla mostrando menor respuesta.

En los tratamientos estudiados (cepas) se encontró una diferencia significativa entre ellos como se observa en el Cuadro 4.3, destacando nuevamente la cepa originaria de Trigo con un IVE de 32.551 plántulas/día, mientras que la cepa de Nopal presentó el más bajo índice; sin embargo comparado con el testigo resultó aún mejor ya que

este obtuvo 28.016 plántulas/día y el testigo 24.413 plántulas/día siendo menor a todos los tratamientos.

V. CONCLUSIONES

En base a los resultados encontrados y expresados en esta investigación, además de considerar los objetivos planteados se concluye que:

- La respuesta fisiológica de la semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* L.) es diferente al ser inoculada con *Azospirillum sp*, en diferentes condiciones, resaltando la Condición 1 (inoculación de la bacteria en contacto constante con la semilla) por tener mejor respuesta fisiológica que al ser inoculada por un tiempo (imbibición por tres horas, Condición 2).
- La respuesta en la capacidad de germinación y vigor en semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* L.) es diferente al ser inoculada con cepas de *Azospirillum sp*, de diferente origen, sobresaliendo la cepa originaria de Trigo quien genera mayor número de plantas normales y LMH, así como menor cantidad de PA y SSG.
- La semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* L.) al ser inoculada con cepas de *Azospirillum sp*, de origen de Trigo a una concentración de 10^4 UFC tiene menor incidencia de semillas enfermas.

VI. LITERATURA CITADA

- Association of Oficial Seed Analysts (AOSA) 1983. Seed vigor testing handbook. Contribution No. 32 The Handbook of oficial Seed. United Status of America. 88p
- *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. Mol. Plant Microb Interact. 6:609-615.
- Movimiento Argentino para la Producción Orgánica - MAPO: www.mapo.org.ar
- Beijerinck, M. W. 1925 Uber ein Spirillumwelches freien Stickstoff binden kann. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II, 63, 353-359
- Bashan, Y., Vázquez, P 2000. Effect of calcium carbonate, sand, and organic matter levels on mortality of five species of *Azospirillum* in natural and artificial bulk soils. Biol. Fertil. Soil. 30: 450-459.
- Bergey' S Manual. 1984. Bacteriología sistemática. Ed. I, Colombia. I Sección 2.
- BELLONE, C.H. 1997. Recuperación de la germinación de semillas de soja por inoculación con *Azospirillum*. Iº Biología del suelo. Fijación Biológica del Nitrógeno. Tucumán. Argentina.:123-125.
- Bottini R., Fulchieri M., Pearce D., Pharis R. 1989. Identification of gibberellins A 1 , A3 , and Iso-A3 in cultures of *Azospirillum Lipoferum*. Plant Physiol. 90: 45-47.
- Cassán F, Piccoli, P. and Bottini R. 2003. Plant growth promotion by *Azospirillum sp.* through gibberellin production. An alternative model to increase crop yield?. Microbiología Agrícola: Un aporte de la Investigación Argentina para la Sociedad. (2003) pp: 143-158. Editoritorial de la Universidad Nacional de Santiago del Estero. ISBN: 987-99083-5-1.
- Christiansen-Weniger, C. 1998. Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin-induced tumors of cereal crops. Crit. Rev. Plant Sci. 17: 55-76.
- Croes, C. L., S. Moens, E. Van Bastelaere, J. Vanderleyden, and K. W. Michiels. 1993. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. J. Gen. Microbiol. 139:2261-2269.
- Cronquist, A. 1993. The Evolution and Classification of Flowering Plants. Second Edition. The New York Botanical Garden. New York, USA. 555 p.
- D' Arcy, W. G. 1979. The classification of the *Solanaceae*. In: J.G., Hawkes; R. N. Lester and A. D. Skeiding. Biology and taxonomy of the *Solanaceae*. Academic London. U.K. Pp. 3-47.

- D' Arcy, W. G. 1991. The solanaceae since 1976, with Review of its Biogeography. In: J.G. Hawkes, R.N. Lester, M. Nee y N. Estrada (Eds.) Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry and Evolution. Royal Botanical Garden, Kew. Gran Bretaña. Pp. 75- 138.
- Díaz, Irma - Iglesias, María C. Cátedra de Microbiología Agrícola - Facultad de Cs. Agrarias - UNNE. Corrientes – Argentina
- Dobereiner, J. 1983. Ten years Azospirillum, p. 9-23. En W. Klingmüller (ed.), Azospirillum II: Genetics, physiology, and ecology. Birkhauser, Basel Switzerland. (Experientia supplementum, 48).
- Dobbelaere, S., J. Vanderleyden y Y. Okon. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Crit. Rev. Plant Sci., 22: 107-149.
- García de Salamone I E y Nelson L. 2001. Efectos benéficos directos sobre el crecimiento vegetal de rizobacterias (PGPR) productoras de citoquininas. III Reunión Nacional Científico Técnica de biología del Suelo- Fijación biológica del Nitrógeno. Universidad Nacional de Salta, facultad de Ciencias Naturales.
- Kloepper, J.W.; Zablotowicz, R.m.; Tipping, B. y Lifshitz, R. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: *The Rhizosphere and Plant Growth*. D.L. KEISTER and P.B. CREGAN (eds.). Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. 1991, 315-326.
- Lampkin, Nicolas. 1999. Organic farming in the European Union. Overview, policies and perspectives. Ponencia presentada en la conferencia "Farming in the European Union. Perspectives for the 21st century". Baden, Austria, 6 pp.
- Sahota Amarjit. 2004. Overview of the global market for organic food and drink. En: The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends 2004. IFOAM, FIBL, SÖL, Alemania, pp. 21-26
- Gómez Tovar, L. y M.A. Gómez Cruz. 2004. La agricultura orgánica en México y en el mundo. CONABIO Biodiversitas 55:13-15
- Okon Y. and Labandera-González C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil. Biol. Biochem. 26:1591-1601.
- Martens, D. and Frankenberger Jr. 1992. Assimilation of ^{14}C -indole-3-acetic acid and thryptophan by wheat varieties from nutrient media. In: Proceedings 19 th.
- Michiels, K. W., C. L. Croes, and J. Vanderleyden. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. J. Gen. Microbiol. 137:2241-2246.

-Annual Meeting Plant Growth Regulator Society of America, San Francisco, CA, July 17, 1992, pp 99-100.

-Peña L., A.; J. F. Santiaguillo H. 1999. Variabilidad Genética de tomate de cáscara en México. Departamento de Fitotecnia. Programa Nacional de Investigación en Olericultura. UACH. Boletín Técnico #3. 26p.

-Perrig, D., Boiero, L., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán F. and Luna V. 2007. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. Applied Microbiology and Biotechnology (2007). 75: 1143-1150

-Santiaguillo H., J F.; A. Peña L.; F. Márquez S.; J. A. Cuevas S. 1997 Importancia de los recursos fitogenéticos del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) en México. Programa Nacional de Etnobotánica, Serie: Recursos Fitogenéticos, No. 2: 1-11.

-Schmidt, W., Martin, P., Omay, H. and Bangerth. 1988. Influence of *Azospirillum brasilense* on nodulation of legumes. In: Klingmuller, W. (editor). *Azospirillum* IV. Genetics, physiology, ecology. pp. 92-100. Springer-Verlag, Heidelberg.

-Strzelczyk E., Kamper M. and Li C. 1994. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. Microbiol. Res. 149:55-60

- Waterfall U., T. 1967. *Physalis* in Mexico, Central America and the West Indies. Rhodora 69: 82-120, 203-239, 319-329.

- Whittaker, H.R. 1969. New Concepts of Kingdoms of Organisms. Science 163: 150- 160.

-Tien, T. M., M. H. Gaskins, and D. H. Hubbell. 1979.

- Thimann, K. 1936. On the physiology of the formation of nodule in legumes roots. PNAS 22: 511-514.

- Vande Broek, A., J. Michiels, A. Van Gool, and J. Vanderleyden. 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial nifH gene during association. Mol. Plant-Microbe Interact. 6:592-600.

Yahalom, E., Okon, Y. and Dovrat, A. 1990. Possible mode of action of *Azospirillum brasilense* strain Cd on the roots morphology and nodule formation in burr medic (*Medicago polymorpha*). Can. J. Microbiol. 36: 10-14.

-<http://www.fao.org/docrep/007/ad818s/ad818s03.htm>

-FAO: www.fao.org/organicag