

# **EVALUACIÓN DE DIFERENTES NIVELES DE SELENIO Y *AZOSPIRILLUM* EN PLANTAS DE TOMATE**

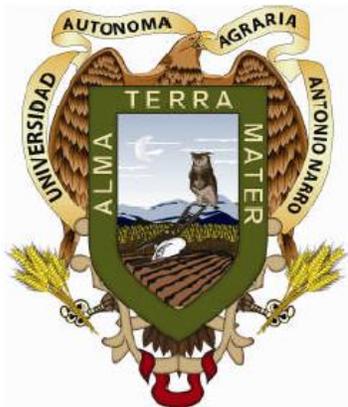
**DAILY NEUWS VAZQUEZ MORALES**

## **TESIS**

Presentada como Requisito Parcial para  
Obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN HORTICULTURA**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
AGRARIA "ANTONIO NARRO"**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre del 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

**Evaluación de diferentes niveles de selenio y *Azospirillum* en  
plantas de tomate**

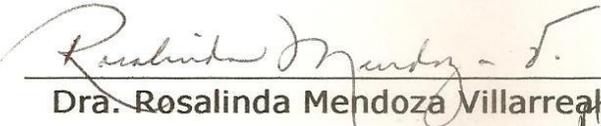
Por

Daily Neuws Vazquez Morales

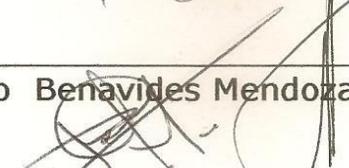
Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada  
como requisito parcial, para optar al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA  
COMITÉ PARTICULAR**

Asesor principal:

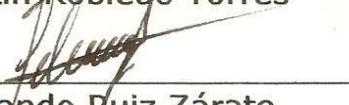
  
Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Asesor:

  
Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Asesor:

  
Dr. Valentin Robledo Torres

  
Dr. Fernando Ruiz Zárate  
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Diciembre del 2013

## AGRADECIMIENTOS

A **Jehová** Dios porque hoy estoy aquí y me dio la oportunidad de ver concluido una meta que me propuse y a él por permitirnos estar bien en todos los aspectos de la vida cotidiana.

A la **UAAAN**, por brindarnos la oportunidad de realizar y terminar un estudio de postgrado y con ello, agradecer también al personal administrativo de postgrado en general.

A la **Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal** por aceptarme como asesorado dentro de las líneas de investigación que realiza dentro de la institución y asimismo por sugerir y plantear la investigación a realizar. Agradeciendo también su tiempo y asesoría a este proyecto.

Al **Dr. Adalberto Benavides Mendoza**, por su apoyo en la realización de este proyecto, así como por sus claras sugerencias en la realización del experimento.

Al **Dr. José Antonio Díaz García**. A pesar de que no formo parte del cuerpo de asesores de mi Tesis y de no conocerlo con anterioridad, me apoyo muchísimo en cuanto al análisis estadístico de mis datos e interpretación de algunos resultados. Así mismo por ayudarme al entendimiento de software libre R y la importancia del entendimiento que ello conlleva. También agradezco su tiempo, consejos, asesoría en dudas de otros problemas no relacionados con mi Investigación y por su valiosa amistad brindada hacia mi persona.

Al **Dr. Valentín Robledo Torres**. Por ser parte del cuerpo de asesores de tesis.

**A Mis Compañeros de Generación:** Laura Nuncio, José Marciano, Alex Cepeda. A pesar de convivir poco, les deseo sinceramente lo mejor en el ambiente profesional, así como personal.

A **otros compañeros y amigos** que a lo mejor no menciono aquí, pero que siempre estaré agradecido por su amistad y por compartir buenos y malos momentos. Charys, Martina, Laurita, Iveth, Lidia, Verónica, Gil, Dr. Zermeño, etc. Muchas Gracias...

## DEDICATORIA

Este y otros trabajos por realizar, se los dedico a mi Madre preciosa: **Delia Morales Pérez**, quien siempre me sacó adelante, sobre todo agradecer siempre sus excelentes consejos para sobrellevar esta vida y ser una persona de bien. Además de apoyarme en todas las decisiones que he tomado en mi vida. Y ser ella la persona quien me inspira y motiva para poder lograr ciertas metas que después veo hacerse realidad.

**A mis Hermanos** por su apoyo moral y económico, en todos los aspectos de mi vida y por su valiosa amistad.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 1  |
| II. OBJETIVOS .....  | 3  |
| OBJETIVO GENERAL .....   | 3  |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 3  |
| III. HIPÓTESIS .....   | 4  |
| IV. REVISIÓN DE LITERATURA .....   | 5  |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 8  |
| VI. RESULTADOS .....   | 12 |
| VII. DISCUSSION .....  | 20 |
| VIII. CONCLUSIÓN .....   | 21 |
| IX. LITERATURA CITADA .....  | 22 |
| X. ARTÍCULO .....  | 29 |
| TRATAMIENTO DE SEMILLAS DE TOMATE CON <i>Azospirillum</i> Y SELENIO<br>PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA GERMINACIÓN Y EL VIGOR ..... | 29 |
| <b>XI. CONCLUSION</b> .....  | 54 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Calculo de la concentración de aniones y cationes en base al procedimiento de Steiner (1961) al 100% y también se calculó a porcentajes de 50% y 40% a partir de la solución original. ....   | 9  |
| <b>Tabla 2.</b> Doble entrada de cationes (+) y aniones (-) y fuentes para solución para preparar la solución nutritiva Steiner al 40%, expresadas en meq L <sup>-1</sup> .....   | 9  |
| <b>Tabla 3.</b> Doble entrada de cationes (+) y aniones (-) y fuentes para solución para preparar la solución nutritiva Steiner al 50%, expresadas en meq L <sup>-1</sup> .....   | 10 |
| <b>Tabla 4.</b> Descripción de tratamientos aplicados a plántulas de tomate a los 8 días después de la siembra. ....  | 11 |
| <b>Tabla 5.</b> MANOVA con el criterio de Roy para el modelo de diseño completamente al azar balanceado con arreglo factorial 4x4 completo multivariado. ....   | 12 |
| <b>Tabla 6.</b> MANOVA con el criterio de Roy para la regresión múltiple multivariada.  | 13 |
| <b>Tabla 7.</b> Modelos de segundo grado de superficie de respuestas estimadas para cada variable dependiente en términos de las variables selenio y <i>Azospirillum</i> , del experimento de producción de plántulas de tomate en invernadero..... | 14 |
| <b>Tabla 8.</b> Puntos críticos individuales, haciendo notar que son diferentes para cada variable dependiente $Y_i$ .....  | 19 |
| <b>Tabla 9.</b> Optimización de superficies de respuesta estimadas. ....  | 19 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 10.</b> MANOVA con el criterio de Roy para el modelo de diseño completamente al azar balanceado con arreglo factorial 4x4 multivariado.....   | 41 |
| <b>Tabla 11.</b> MANOVA con el criterio de Roy para la regresión múltiple multivariada. ....   | 42 |
| <b>Tabla 12.</b> Aquí se muestran los modelos de segundo grado de superficie de respuestas estimadas para cada variable dependiente en términos de las variables selenio y <i>Azospirillum</i> . ....                            | 42 |
| <b>Tabla 13.</b> Puntos críticos individuales, haciendo notar que son diferentes para cada variable en estudio y Optimización de superficies de respuesta estimadas en pruebas de germinación y vigor de semillas de tomate..... | 47 |
| <b>Tabla 14.</b> Optimización de superficies de respuesta estimadas en pruebas de germinación y vigor de semillas de tomate .....  | 47 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Superficies de Respuesta (3D) de las variables $Y_1$ , $Y_2$ , $Y_3$ y $Y_4$ , del experimento de producción de plántulas de tomate en invernadero. .... | 15 |
| <b>Figura 2.</b> Superficies de Respuesta (3D) de las variables $Y_5$ , $Y_6$ , $Y_7$ y $Y_8$ , del experimento de producción de plántulas de tomate en invernadero. .... | 16 |
| <b>Figura 3</b> Gráficos de contornos de las variables $Y_1$ , $Y_2$ , $Y_3$ y $Y_4$ , del experimento de producción de plántulas de tomate en invernadero. ....          | 17 |
| <b>Figura 4</b> Gráficos de contornos de las variables $Y_5$ , $Y_6$ , $Y_7$ y $Y_8$ del experimento de producción de plántulas de tomate en invernadero. ....            | 18 |
| <b>Figura 5.</b> Superficie de respuesta multivariadas (3D) y grafico de contornos de la variable porcentaje de germinación. ....   | 43 |
| <b>Figura 6.</b> Superficie de respuesta multivariadas (3D) y gráfico de contornos de la variable plantas anormales. ....   | 44 |
| <b>Figura 7.</b> Superficie de respuesta multivariadas (3D) y grafico de contornos de la variable prueba de vigor. ....   | 44 |
| <b>Figura 8.</b> Superficie de respuesta multivariadas (3D) y gráfico de contornos de la variable índice de velocidad de emergencia. ....                                 | 45 |
| <b>Figura 9.</b> Superficie de respuesta multivariadas (3D) y grafico de contornos de la variable longitud media de hipocotilo. ....                                      | 45 |
| <b>Figura 10.</b> Superficie de respuesta multivariada (3D) y grafico de contornos de la variable longitud media de radícula. ....  | 46 |

## I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate es uno de las hortalizas con mayor demanda, por su alto consumo a nivel mundial y para los productores representa un medio de entrada de grandes cantidades de divisas (FAO, 2012). Teniendo en cuenta el impacto ambiental negativo de los fertilizantes inorgánicos y sus costos crecientes, el uso de microorganismos beneficiosos del suelo como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) para la agricultura sostenible, ha aumentado a nivel mundial durante el último par de décadas (Terry *et al*, 2005).

El nitrógeno (N) es un elemento importante en la composición de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, siendo así una molécula esencial para el crecimiento de todo ser vivo. La atmosfera cerca de la superficie de la tierra está compuesta principalmente por 78.084% de N y 20.95 % de oxígeno. Junto, los dos comprenden aproximadamente el 99% del gas en la atmosfera. Para ser utilizado en el crecimiento, este debe ser primero reducido y luego “fijado” (combinado) en la forma de iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). La relación que se establece entre las bacterias y las plantas puede ser benéfica, perjudicial o neutra. Dentro de las favorables se encuentra las asociaciones con bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Estrada *et al*, 2001).

El selenio fue descubierto por el Químico sueco Jons Jacob Berzelius en 1817 (Terry, Zayed, De Souza, & Tarun, 2000; Tinggi, 2003), en el año de 1957 se consideró como un elemento esencial para muchos organismos, incluyendo plantas, animales y seres humanos (Zhu, Pilon-Smits, Zhao, Williams, & Meharg, 2009), debido a su papel en la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GSHPx), enzima que protege a las membranas celulares contra el

daño causado por la peroxidación de los lípidos mediante la prevención de la producción de especies reactivas de oxígeno activo (Tinggi, 2003). El selenio no se limita meramente a su papel en la actividad antioxidante, sino que también participa e otros aspectos múltiples del metabolismo de los mamíferos.

La mayor parte del selenio en la corteza terrestre se produce asociado con minerales de sulfuro (Shamberger, 1981). La presencia o ausencia de selenio en cualquier suelo depende de la composición de la roca madre y de procesos posteriores a la formación del suelo (Shamberger, 1981; Zhu et al., 2009). La concentración del selenio en la mayoría de los suelos oscila entre 0.01 y 2.0 mg kg<sup>-1</sup>, y pueden encontrarse suelos con concentraciones altas conocidos como “seleníferos” (>10 mg kg<sup>-1</sup>) (Fordyce, 2005a). La biodisponibilidad del Se a las plantas puede variar sustancialmente por razones que aún no se entienden bien. El selenio es absorbido por las plantas como selenato, selenito y selenio orgánico (Shamberger, 1981; Terry et al., 2000).

El selenio puede ser fácilmente oxidado desde Se<sup>0</sup> a Se<sup>+4</sup> o Se<sup>+6</sup> (Shamberger, 1981). El selenio se recupera habitualmente como un subproducto de la refinación de los minerales de sulfuro de otros metales como el cobre (Shamberger, 1981).

Las plantas varían considerablemente en su respuesta fisiológica al selenio. Algunas especies de plantas que crecen en suelos seleníferos son tolerantes y acumulan de cientos a varios miles de mg kg<sup>-1</sup> de Se en sus tejidos (acumuladoras de Se), las cuales se componen de un número de especies de *Astragalus*, *Stanleya*, *Morinda*, *Neptunia*, *Oonopsis*, and *Xylorhiza*. Sin embargo, la mayoría de las plantas son sensibles al selenio (no acumuladoras de Se), conteniendo menos de 25 mg kg<sup>-1</sup> de Se (Terry et al., 2000)

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los niveles de selenio y *Azospirillum* sp., sobre la germinación y vigor de semillas de tomate; así como también sobre los caracteres morfológicos de plántulas de Tomate.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Encontrar la concentración de selenio y *Azospirillum* que produzca la máxima respuesta en las variables en estudio como porcentaje de germinación, plántulas anormales, prueba de vigor, índice de velocidad de emergencia, longitud media de hipocotilo y longitud media de radícula.
- Obtener la concentración de *Azospirillum* y selenio que permita un desarrollo normal de plántulas de tomate.

### III. HIPÓTESIS

- Al menos una concentración de *Azospirillum* sp., y selenio tiene efecto benéfico en pruebas de germinación de semillas y producción de plántulas de tomate; a comparación a la forma individual de cada uno.
- El selenio en altas concentraciones afecta la morfología de plántulas de tomate.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### *Panorama de la Producción de Tomate*

El tomate (*Solanum lycopersicon L.*) es, en sentido estricto, una fruta, pues nace de una flor y tiene semillas de las cuales nacerá otro arbusto. Actualmente es el segundo cultivo más importante de todas las hortalizas a nivel mundial, junto a la papa (*Solanum tuberosum*). La producción mundial actual es de alrededor de 160 millones de toneladas de fruta fresca proveniente de una superficie cosechada de 4,73 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2013)

En el año 2012, México tuvo una producción de 2, 699, 238.79 toneladas de fruto fresco provenientes de 52,873.88 hectáreas sembradas. En general se tiene una producción media nacional de 51.05 ton/ha<sup>-1</sup>/año (OI + PV) en la modalidad de Riego + temporal (SIAP, 2013). El estado que tiene la mayor rendimiento nacional es Queretaro con 180.35 ton/ha, seguido de Durango con 173.04 ton/ha<sup>-1</sup> y el estado con menor rendimiento nacional es Tabasco con 12.47 ton/ha<sup>-1</sup>.

### **El cultivo de tomate en invernadero.**

Considerando la superficie dedicada a este cultivo y el valor de su producción, el tomate es la hortaliza número uno en el mundo. La planta de tomate es arbustiva e indeterminada, puede tener un ciclo de vida superior a un año, aunque se cultiva como anual. Para invernadero se utilizan las variedades de crecimiento indeterminado pues permite tener producción durante periodos largos si se manejan de forma adecuada. El manejo del cultivo es la clave para obtener altos rendimientos y calidad del fruto (Castellanos, 2011).

## **Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal**

En la actualidad la inoculación de plantas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) es un activo importante para la agricultura biológica. Esta biotecnología ambiental está recibiendo atención como una forma de reducir las dosis de fertilizantes químicos sin afectar el rendimiento del cultivo. Entonces puede ser evaluada como un componente de las estrategias de gestión integrada de la agricultura (Kotchoni & Baba-Moussa, 2013)

## **El selenio en el ambiente**

El selenio (Se) es un elemento presente en la naturaleza en muchas formas diferentes (inorgánico, orgánico, sólido, líquido y gas) (Acuña, Jorquera, Barra, Crowley, & De la Luz, 2012) siendo este esencial para animales y seres humanos en cantidades traza y perjudicial en exceso (Fordyce, 2005b). Zhu et al., (2009) consideran que es esencial también para plantas.

Sors et al (2005) mencionan que su semejanza física y química con el azufre (S) estable que estos comparten vías metabólicas comunes en las plantas, en el cual los oxianiones selenato y selenito pueden ser considerados como análogos del sulfito y sulfato, respectivamente (Stolz *et al*, 2006).

Es bien sabido que muchos microorganismos pueden reducir los oxianiones solubles de selenio, que son altamente tóxicos a una forma insoluble mucho menos tóxico, es decir, el selenio elemental (Garbisu, Ishii, Leighton, & Buchanan, 1996).

Existen plantas que son acumuladoras de selenio como la mostaza india (*Brassica júncea* L.) acumula altas concentraciones de Se tejidos y volatiliza Se en formas relativamente no tóxicos, tales como dimetilo (De Souza et al., 1999). La reducción biológica de selenio ha sido investigado con diversos microbios tales como *Thauera selenatis*, *Enterobacter taylorae*, *Rhizobium* sp., *Azospira oryzae*, *Bacillus* sp., y *Desulfovibrio desulfuricans* subesp. *aestuarii*. La mayoría de los microbios estudiados son

anaerobios facultativos que utilizan un donador de electrones como la melaza, de etilo, etanol y metanol, además de gas hidrogeno (Takada et al., 2008).

Los géneros mas estudiados de plantas acumuladoras de Se son *Astragalus* y *Stanleya* (Dawn et al., 2013). Las plantas hiperacumuladoras de Se pueden almacenar y tolerar de 0.1% (White, Bowen, Marshall, & Broadley, 2007) hasta 1% de su peso seco (Dawn et al., 2013) sin mostrar ningún síntoma de toxicidad.

El Se ocurre naturalmente en la mayoría de los suelos y puede encontrarse en niveles muy altos en suelos alcalinos. Los suelos no seleniferos contienen menos de  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ , mientras que los seleniferos pueden variar entre 2 y  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  (Dawn et al., 2013; Zhao et al., 2005).

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización del área experimental.

El presente trabajo experimental se llevó a cabo en el invernadero 2 del área de invernaderos del departamento de producción "U.A.A.N." que se ubica al sur de la ciudad de Saltillo, Coahuila, en las coordenadas 101° 01'51.59" de longitud Oeste y 25° 01'19.63" de latitud Norte, con una altitud de 1780 m.s.n.m.

### Descripción del Experimento

- Material vegetal. se utilizó semillas de Tomate tipo Saladette de crecimiento determinado, sus condiciones de adaptación le permiten ser cultivada de manera rastrera y envarado. Frutos rojo intenso con excelente firmeza, Peso promedio de 110-130gr, al contar con paredes gruesas le permiten tener una larga vida de anaquel. Tolerante al F1-2 Bsp
- Siembra en contenedores. La siembra de las semillas se hizo de manera directa en contenedores de Poliestireno expandido de 1 litro de capacidad. El sustrato utilizado fue una mezcla de los sustratos Perlita + Peat moss (*Sphagnum*.) con una relación 1:1. La solución nutritiva que se aplicó fue la propuesta por Steiner (1961). La medición del pH y CE en el sustrato se realizó mediante el método del Pour-through
- Solución nutritiva. La solución nutritiva que se utilizó para este experimento fue Steiner (1961) la cual se considera los siguientes elementos y sus concentraciones: Nitrógeno ( $\text{NO}_3$ )= 167 ppm, Fósforo= 31 ppm, Potasio= 277 ppm, Magnesio= 49 ppm, Calcio=183 ppm,

Azufre= 67 ppm, Hierro= 3 ppm, Manganeso=1.97 ppm, Boro= 0.44 ppm, Zinc =0.11 ppm, Cobre =0.02 ppm, Molibdeno =0.007 ppm.

En la Tabla 1 se muestra los requerimientos de la solución universal de Steiner y a partir de esta se realizaron las concentraciones de 40% y 50%.

**Tabla 1.** Calculo de la concentración de aniones y cationes en base al procedimiento de Steiner (1961) al 100% y también se calculó a porcentajes de 50% y 40% a partir de la solución original.

| $NO_3^-$<br>(meq . L <sup>-1</sup> ) | $PO_4$<br>(meq . L <sup>-1</sup> ) | $SO_4^{2-}$<br>(meq . L <sup>-1</sup> ) | $K^+$<br>(meq . L <sup>-1</sup> ) | $Ca^{2+}$<br>(meq . L <sup>-1</sup> ) | $Mg^{2+}$<br>(meq . L <sup>-1</sup> ) | Concentración<br>total |
|--------------------------------------|------------------------------------|---|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| 12                                   | 1                                  | 7                                       | 7                                 | 9                                     | 4                                     | 100%                   |
| 6                                    | 0.5                                | 3.5                                     | 3.5                               | 4.5                                   | 2                                     | 50%                    |
| 2.4                                  | 0.4                                | 2.8                                     | 2.8                               | 3.6                                   | 1.6                                   | 40%                    |

A los 10 días después de la siembra se decidió comenzar la nutrición de las plántulas con la aplicación de la solución nutritiva Steiner al 40% (Tabla 2). Aplicando esta concentración de nutrientes como una fertilización base para todos los tratamientos, en el cual, por la misma vía se aplicaba la concentración de selenio a las plantas que les correspondía sus diversos tratamientos. La forma en que se aplicó el selenio fue como selenito de sodio.

La aplicación de la solución nutritiva se realizó de forma manual. Haciendo se está todos los días a las 10 de la mañana.

**Tabla 2.** Doble entrada de cationes (+) y aniones (-) y fuentes para solución para preparar la solución nutritiva Steiner al 40%, expresadas en meq L<sup>-1</sup>.

|            | $K^+$        | $Ca^{2+}$     | $Mg^{2+}$     | Total         |
|------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>NO3</b> | 1.2          | 3.6           |               | $\Sigma=4.8$  |
| <b>PO4</b> | 0.4          |               |               | $\Sigma= 0.4$ |
| <b>S04</b> | 1.2          |               | 1.6           | $\Sigma= 2.8$ |
|            | $\Sigma=2.8$ | $\Sigma= 3.6$ | $\Sigma= 1.6$ |               |

A los 30 días después de la siembra se decidió cambiar la concentración de la solución nutritiva de acuerdo a la edad de las plantas; teniendo así un incremento de 10% de concentración. Se pasó de 40% a 50%; la cual se muestra en la Tabla 3, donde se muestran los fertilizantes que se utilizaron.

**Tabla 3.** Doble entrada de cationes (+) y aniones (-) y fuentes para solución para preparar la solución nutritiva Steiner al 50%, expresadas en meq L<sup>-1</sup>.

|                              | Solución nutritiva |                  |                  | Total de aniones |
|------------------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|
|                              | K <sup>+</sup>     | Ca <sup>2+</sup> | Mg <sup>2+</sup> |                  |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |                    | 3                |                  | 3.6              |
| PO <sub>4</sub>              | 0.5                |                  |                  | 0.5              |
| SO <sub>4</sub>              | 3.0                | 2                |                  | 5                |
| <b>Total de cationes</b>     | $\Sigma=3.5$       | $\Sigma=3$       | $\Sigma=3$       |                  |

### Descripción de tratamientos.

En el presente experimento se aplicaron cuatro niveles de selenio 0, 1, 5 y 10 ppm, así como también cuatro niveles de la bacteria del genero *Azospirillum* sp., con 0, 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup> y 10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup>; con siete repeticiones por tratamientos. En la **tabla 4**, se describen los tratamientos que se aplicaron en el experimento del cultivo de tomate saladette (*Solanum esculentum*), en este estudio se manejó diferentes concentraciones de la bacteria *Azospirillum* con la interacción del selenio.

**Tabla 4.** Descripción de tratamientos aplicados a plántulas de tomate a los 8 días después de la siembra.

| Tratamientos   | Se (mg L <sup>-1</sup> ) + <i>Azospirillum</i><br>(ufc ml <sup>-1</sup> ) | Tratamientos    | Se (mg L <sup>-1</sup> ) +<br><i>Azospirillum</i> (ufc ml <sup>-1</sup> ) |
|----------------|---|-----------------|---|
| T <sub>1</sub> | 0 + 0   | T <sub>9</sub>  | 5 + 0   |
| T <sub>2</sub> | 0 + 10 <sup>4</sup>   | T <sub>10</sub> | 5 + 10 <sup>4</sup>   |
| T <sub>3</sub> | 0 + 10 <sup>6</sup>   | T <sub>11</sub> | 5 + 10 <sup>6</sup>   |
| T <sub>4</sub> | 0 + 10 <sup>8</sup>   | T <sub>12</sub> | 5 + 10 <sup>8</sup>   |
| T <sub>5</sub> | 1 + 0   | T <sub>13</sub> | 10 + 0  |
| T <sub>6</sub> | 1 + 10 <sup>4</sup>   | T <sub>14</sub> | 10 + 10 <sup>4</sup>  |
| T <sub>7</sub> | 1 + 10 <sup>6</sup>   | T <sub>15</sub> | 10 + 10 <sup>6</sup>  |
| T <sub>8</sub> | 1 + 10 <sup>8</sup>   | T <sub>16</sub> | 10 + 10 <sup>8</sup>  |

### Diseño experimental y análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un diseño completamente al azar balanceado con arreglo factorial 4x4. Así como del uso de un Análisis de Varianza Multivariado (MANOVA) y de la Metodología de Superficies de Respuesta. El análisis estadístico de este experimento fue realizado bajo el 'software estadístico R' (R Core Team, 2013).

Las variables independientes o factores de este estudio son:  $X_1$ = concentraciones de selenio,  $X_2$  = concentraciones de *Azospirillum* sp y las variables dependientes o de respuesta fueron:  $Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5, Y_6, Y_7, Y_8$

## VI. RESULTADOS

Prueba de independencia. El estadístico de prueba fue de  $U = 1124.125$  con un  $p\text{-valor} = 0^{***}$  de donde se concluye que las variables dependientes transformadas  $Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5, Y_6, Y_7, Y_8$  no son independientes entre sí. Por lo tanto lo conducente es analizarlas simultáneamente a través de las técnicas del análisis multivariado.

Transformación de datos y prueba de normalidad multivariada. Los datos fueron transformados y de la prueba de normalidad multivariada se concluye que no hay evidencia para suponer que los datos no tienen una distribución normal multivariada dado que el estadístico de prueba  $Z_1 = 235.788$  con un  $p\text{-valor} = 0$ .  
Diseño de experimento multivariado

A continuación se muestra el MANOVA con el criterio de Roy para el diseño completamente al azar balanceado con arreglo factorial del experimento, (Tabla 5). De acuerdo al MANOVA del diseño completamente al azar balanceado con arreglo factorial 4x4 realizado, se puede observar en la tabla 2 que hay diferencia altamente significativa para las hipótesis de los tres factores A, B, su interacción "A x B". De donde se concluye que existe diferencia entre los diferentes niveles del selenio, concentración de *Azospirillum* y que interacción de selenio y *Azospirillum* provoca un efecto en la calidad fisiológica de semillas de tomate.

**Tabla 5.** MANOVA con el criterio de Roy para el modelo de diseño completamente al azar balanceado con arreglo factorial 4x4 completo multivariado.

| FV         | G<br>L | Estadístico<br>de Roy | Aproximación F | Numerador DF | Denominador DF | Pr(>F)             |
|------------|--------|-----------------------|----------------|--------------|----------------|--------------------|
| A          | 3      | 50.752                | 577.30         | 8            | 91             | $< 2.2e^{-16} ***$ |
| B          | 3      | 0.479                 | 5.45           | 8            | 91             | $1.27e^{-05} ***$  |
| A x B      | 9      | 2.271                 | 24.23          | 9            | 96             | $< 2.2e^{-16} ***$ |
| Residuales | 96     |                       |                |              |                |                    |

FV= Fuentes de variación, GL= Grados de libertad. Aproximación F, Rencher eq. (6.21), p. 165.

*Técnicas de superficies de respuesta multivariada.*

Regresión múltiple multivariada (MANOVA).

Del MANOVA para la regresión múltiple multivariada (Tabla 6), se observa que la hipótesis nula es rechazada, es decir los modelos de regresión polinomiales de segundo grado ajustan adecuadamente el comportamiento de cada una de las variables respuesta en función de la concentración de selenio y A.

**Tabla 6.** MANOVA con el criterio de Roy para la regresión múltiple multivariada.

| FV         | GL  | Roy    | Aproximación<br>F | Numerador<br>DF | Denominador<br>DF | Pr(>F)             |
|------------|-----|--------|-------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| Regresión  | 5   | 25.205 | 324.51            | 8               | 103               | $< 2.2e^{-16}$ *** |
| Residuales | 106 |        |                   |                 |                   |                    |

FV= Fuentes de variación, GL= Grados de libertad.

Medida de asociación multivariada de Roy.

Tal y como menciona Rencher (2002), subsection 6.1.8, aún queda mucho por estudiar sobre estas medidas de asociación, pero el valor reportado de  $\eta_{Roy} = 0.9618388$  es bastante alto, reforzando la conclusión de que los modelos de regresión estimados son adecuados.

Superficies de respuesta estimadas

La metodología de superficies de respuesta

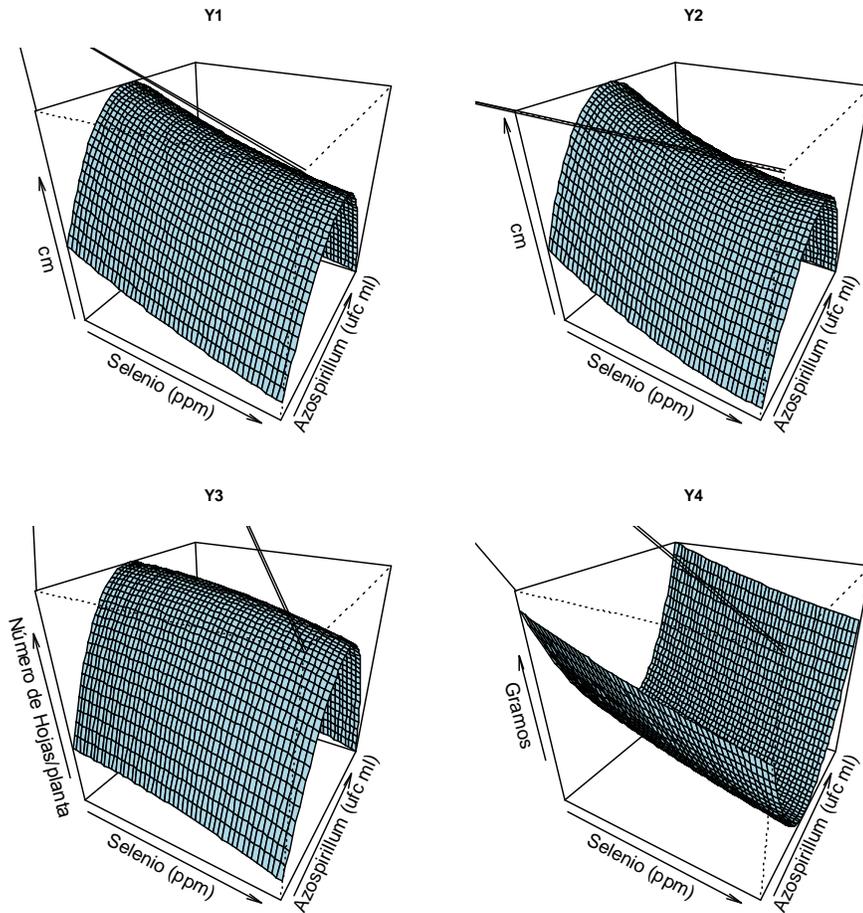
A continuación se muestran en la Tabla 7 los modelos de segundo grado de superficie de respuesta estimados para cada variable dependiente en términos de las variables independientes  $x_1, x_2$ :

$$\hat{Y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$

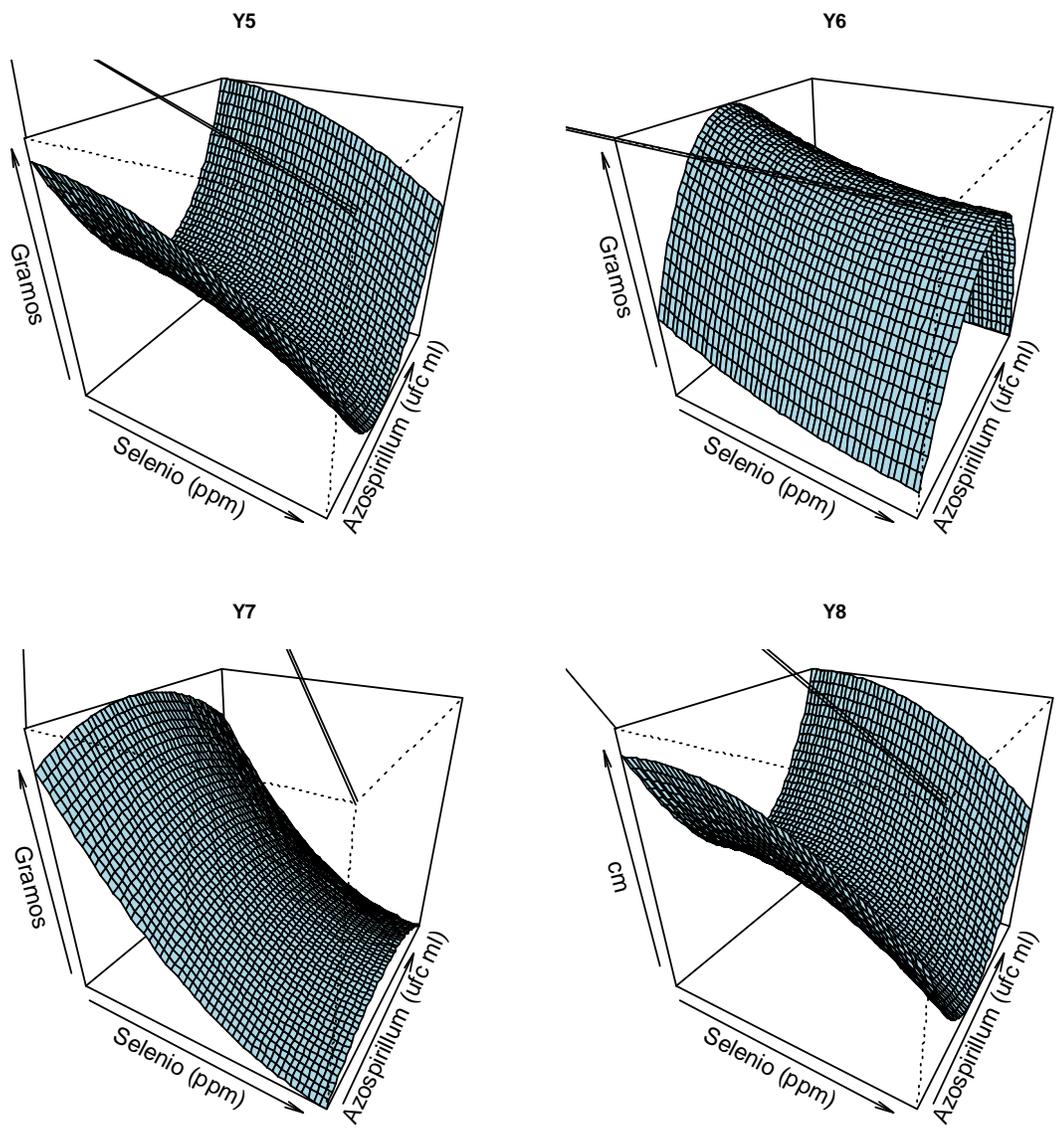
**Tabla 7.** Modelos de segundo grado de superficie de respuestas estimadas para cada variable dependiente en términos de las variables selenio y *Azospirillum*, del experimento de producción de plántulas de tomate en invernadero.

|       | $b_0$    | $b_1$   | $b_2$    | $b_{11}$ | $b_{22}$  | $b_{12}$ |
|-------|----------|---------|----------|----------|-----------|----------|
| $Y_1$ | 95.2907  | -6.6899 | 62.3850  | 2.4367   | -54.5435  | 0.6329   |
| $Y_2$ | 0.8012   | -0.0894 | 0.2999   | 0.0234   | -0.2564   | 0.0042   |
| $Y_3$ | 3.9133   | -0.1238 | 1.1700   | -0.0367  | -1.0120   | 0.0097   |
| $Y_4$ | -16.9484 | -8.4037 | -39.5110 | 0.9582   | 33.5920   | 0.4175   |
| $Y_5$ | 0.2882   | -0.2734 | -0.9312  | -0.0995  | 0.7981    | 0.7981   |
| $Y_6$ | 174.2112 | -0.1237 | 155.3941 | 9.5746   | -138.3030 | 2.9547   |
| $Y_7$ | 5.7943   | -3.5628 | 1.1065   | 0.9671   | -1.0220   | 0.1153   |
| $Y_8$ | 5.3574   | -0.3727 | -0.3727  | -0.2374  | 1.2313    | -0.0296  |

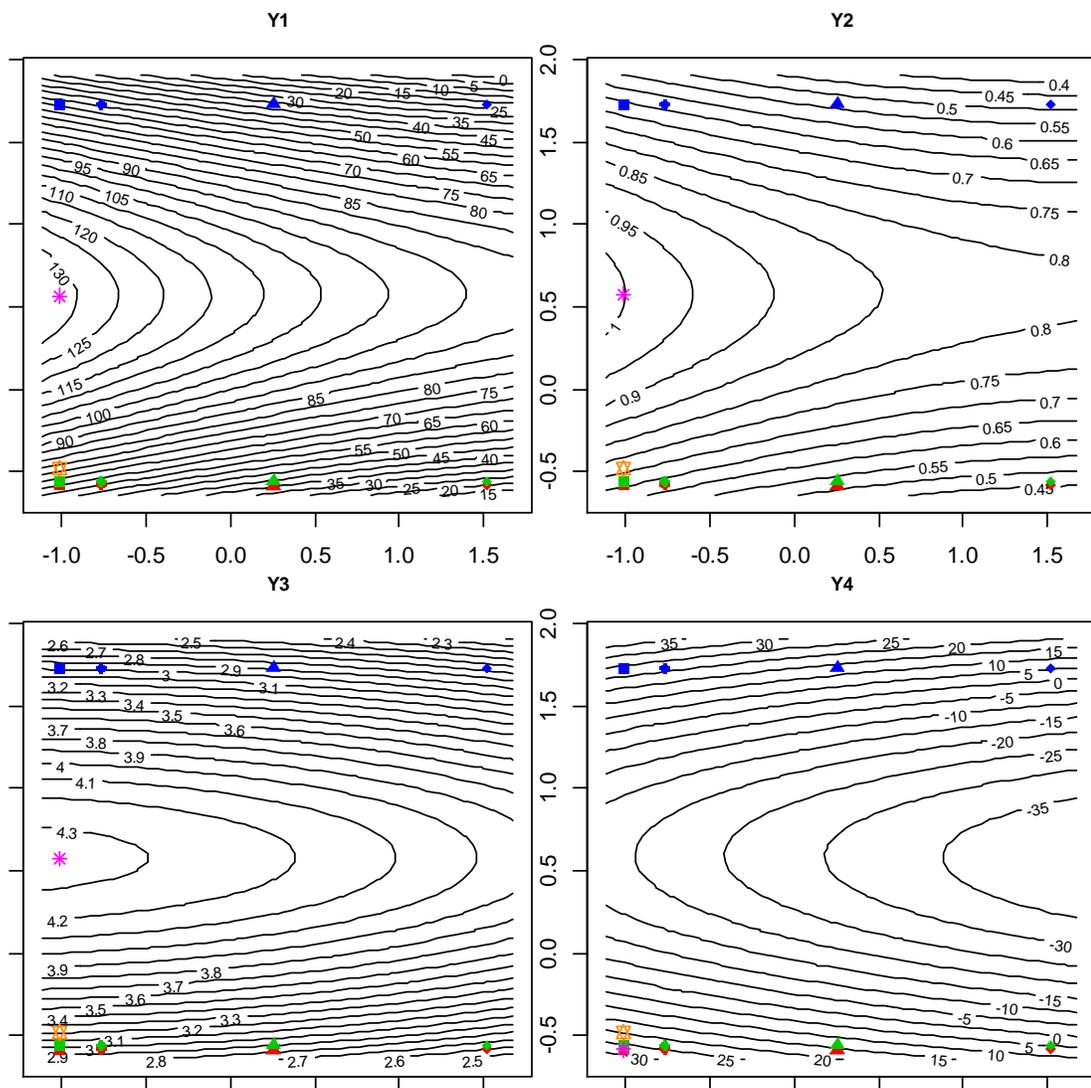
A continuación se muestra las gráficas (Figuras 1-4) de las variables de respuesta de plantas de tomate. Encontramos entonces que para las 8 variables de respuesta:  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$ ,  $Y_6$ ,  $Y_7$ ,  $Y_8$  se realizó una maximización en la cual se requería que el más alto valor de estas.



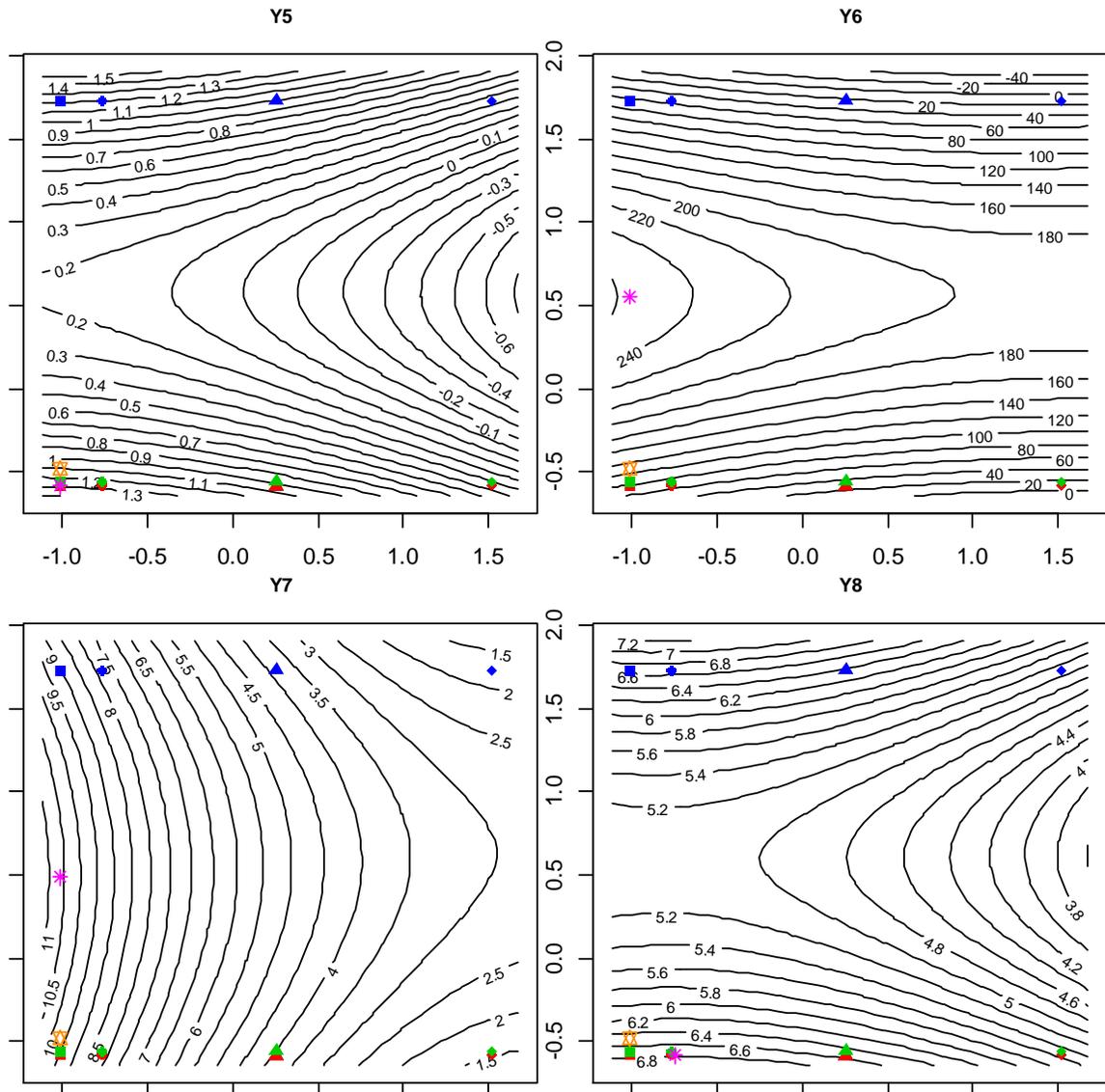
**Figura 1:** Superficies de Respuesta (3D) de las variables  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  y  $Y_4$ , del experimento de producción de plántulas de tomate en invernadero.



**Figura 2.** Superficies de Respuesta (3D) de las variables Y<sub>5</sub>, Y<sub>6</sub>, Y<sub>7</sub> y Y<sub>8</sub>, del experimento de producción de plántulas de tomate en invernadero.



**Figura 3** Gráficos de contornos de las variables  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  y  $Y_4$ , del experimento de producción de plántulas de tomate en invernadero.



**Figura 4** Gráficos de contornos de las variables  $Y_5$ ,  $Y_6$ ,  $Y_7$  y  $Y_8$  del experimento de producción de plántulas de tomate en invernadero.

Optimización de superficies de respuesta estimadas univariadas.

En esta sección se muestra de manera individual las superficies de respuesta estimadas para cada variable dependiente, donde se señala el punto crítico (Se, *Azospirillum*) para cada uno de ellos. Teniendo en cuenta que en la realidad no es practico hacer estas aplicaciones de las concentraciones de Se y *Azospirillum* para mejorar cada una de las repuestas a la vez. Es por eso que se recomienda encontrar un solo punto crítico de Se y *Azospirillum* que optimice

de manera simultánea todas las variables dependientes que mejoren la calidad fisiológica de las semillas de tomate (Tabla 8).

**Tabla 8.** Puntos críticos individuales, haciendo notar que son diferentes para cada variable dependiente  $Y_i$ .

| Variables dependientes | Niveles óptimos de los factores |   |
|------------------------|---------------------------------|---|
|                        | Se (ppm)                        | <i>Azospirillum</i> sp. (ufc ml <sup>-1</sup> ) |
| $Y_1$                  | 0                               | 4.9e <sup>07</sup>                              |
| $Y_2$                  | 0                               | 5e <sup>07</sup>                                |
| $Y_3$                  | 0                               | 4.9e <sup>07</sup>                              |
| $Y_4$                  | 0                               | 0   |
| $Y_5$                  | 0                               | 0   |
| $Y_6$                  | 0                               | 4.9e <sup>07</sup>                              |
| $Y_7$                  | 0                               | 4.6e <sup>07</sup>                              |
| $Y_8$                  | 1.054                           | 0   |

Optimización de superficies de respuesta estimadas multivariadas (véase Rencher sección 7.5, p. 284, (1)).

Aquí se señala el punto crítico simultáneo que define el punto óptimo de Pareto, para las 6 superficies de respuesta, indicando que este punto (Se, *Azospirillum*) optimiza simultáneamente a las 6 variables dependientes  $Y_1$ - $Y_6$ , bajo el criterio de la función de Distancias (Tabla 9).

**Tabla 9.** Optimización de superficies de respuesta estimadas.

| Criterio              | Nivel óptimo de los factores |   |
|-----------------------|------------------------------|---|
|                       | Se (ppm)                     | <i>Azospirillum</i> (ufc ml <sup>-1</sup> ) |
| Función de Distancias | 0                            | 4.2e <sup>07</sup>                          |

De acuerdo a esta metodología empleada, se pudo encontrar el punto óptimo de los factores que inducen un cambio en las variables estudiadas, esto contesta el objetivo específico del trabajo en el cual se encontró la concentración de 0 ppm de Se y 4.2e<sup>07</sup> ufc ml<sup>-1</sup>.

## VII. DISCUSSION

Garbisu et al, (1996) desarrollaron un sistema de tratamiento utilizando las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* para mitigar flujos de residuos contaminados con selenio como modelos de bacterias Gram (-) y (+) del suelo, respectivamente. Además, encontraron que el Se elemental se deposita en forma de gránulos en toda la célula, o entre la pared celular y la membrana plasmática en *P. fluorescens* y *B. subtilis*, respectivamente. En *B. subtilis* se induce la síntesis de tiorredoxina en presencia de selenito.

De todos los elementos, el selenio tiene una de las gamas más estrechas entre la deficiencia en la dieta ( $<40 \mu\text{g día}^{-1}$ ) y los niveles tóxicos ( $>400 \mu\text{g día}^{-1}$ ) por lo que es necesario controlar cuidadosamente la ingesta por los seres humanos y otros animales, de ahí la importancia de la comprensión de las relaciones entre la exposición del medio ambiente y la salud (Fordyce, 2005b).

## VIII. CONCLUSIÓN

La producción de plántulas de tomate es de gran interés en la actualidad, de acuerdo a las propiedades antioxidantes en el caso del selenio es de mucha importancia en las plantas, pero una aplicación en niveles altos 5 y 10 ppm de esta vía solución nutritiva o fertirriego afecta a las plantas de tomate, provocándole disminución del desarrollo de las plantas.

Por otro, *Azospirillum* como vimos tiene efecto en las plantas, coincidiendo con resultados obtenidos con otros investigadores sobre la inducción del crecimiento y desarrollo de plantas.

## IX. LITERATURA CITADA

- Acuña, J. J., Jorquera, M. A., Barra, P. J., Crowley, D. E., & De la Luz, M. M. (2012). Selenobacteria selected from the rhizosphere as a potential tool for Se biofortification of wheat crops. *Biology and Fertility of Soils*, *49*(2), 175–185. doi:10.1007/s00374-012-0705-2
- AOSA. (1983). Seed Vigor Testing Handbook. *Analysts Association of Official Seed*, *32*, 10–15.
- Bañuelos, G. S., Walse, S. S., Ang, S. I., Pickering, I. J., Fakra, S. C., Marcus, M. A., & Freeman, J. L. (2012). Quantification, localization, and speciation of selenium in seeds of canola and two mustard species compared to seed-meals produced by hydraulic press. *Analytical Chemistry*, *84* (14), 6024–6030. doi:10.1021/ac300813e
- Bashan, Y., & De Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—A critical assessment. *Advances in Agronomy*, *108*, 77–136.
- Bewley, D. J. (n.d.). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, *9*, 1055–1066.
- Broadley, M. R., White, P. J., Bryson, R. J., Meacham, M. C., Bowen, H. C., Johnson, S. E., ... Tucker, M. (2007). Biofortification of UK food crops with selenium. *Proceedings of the Nutrition Society*, *65*(02), 169–181. doi:10.1079/PNS2006490

- Cartes, P., Shene, C., & Mora, M. (2006). Selenium distribution in ryegrass and its antioxidant role as affected by sulfur fertilization. *Plant Soil*, 285, 187–195.
- Castellanos, J. Z. (2011). *Manual de Producción de Tomate en Invernadero* (1st ed., pp. 45–204). Guanajuato, México: Intagri. Ocma.
- Couillerot, O., Bouffaud, M.-L., Baudoin, E., Muller, D., Caballero-Mellado, J., & Moëne-Loccoz, Y. (2010). Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2298–2305. doi:10.1016/j.soilbio.2010.09.003
- Dawn, L. S., Valdez, B. J. R., Fakra, S. C., Marcus, M. A., Wangeline, A. L., & H, P.-S. E. A. (2013). Influence of microbial associations on selenium localization and speciation in roots of *Astragalus* and *Stanleya* hyperaccumulators. *Environmental and Experimental Botany*, 88, 33–42. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.12.011
- De Souza, M. P., Chu, D., Zhao, M., Zayed, A. M., Ruzin, S. E., Schichnes, D., & Terry, N. (1999). Rhizosphere bacteria enhance selenium accumulation and volatilization by indian mustard. *Plant Physiology*, 119(2), 565–573.
- Di Barbaro, G., Pernasetti, S., & Stegmayer, A. (2005). Effects Evaluation of *Azospirillum brasilense* Inoculation on Pepper (*Capsicum annum* L. var Trompa de Elefante) Seeds Germination and Plants Emergence. *Revistas del CIZAS*, 6 (1 and 2, 74–85.
- Durán, P., Acuña, J. J., Jorquera, M. A., Azcón, R., Borie, F., Cornejo, P., & Mora, M. L. (2013a). Enhanced selenium content in wheat grain by co-inoculation of selenobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi: A

preliminary study as a potential Se biofortification strategy. *Journal of Cereal Science*, 57(3), 275–280. doi:10.1016/j.jcs.2012.11.012

Durán, P., Acuña, J. J., Jorquera, M. A., Azcón, R., Borie, F., Cornejo, P., & Mora, M. L. (2013b). Enhanced selenium content in wheat grain by co-inoculation of selenobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi: A preliminary study as a potential Se biofortification strategy. *Journal of Cereal Science*, 57(3), 275–280. doi:10.1016/j.jcs.2012.11.012

FAOSTAT. (2013). *Production Crops: Time-Series and Cross Sectional Data Relating to Food and Agriculture for Some 245 Countries*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Fordyce, F. M. (2005a). Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment. In O. Selinus, B. Alloway, J. A. Centeno, R. B. Finkelman, R. Fuge, U. Lindh, & P. Smedley (Eds.), *Essentials of Medical Geology* (Revised., pp. 375–416). West Mains Road, Edinburgh: Elsevier. doi:10.1007/978-94-007-4375-5

Fordyce, F. M. (2005b). Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment. *Essentials of Medical Geology*, 373–415.

Garbisu, C., Ishii, T., Leighton, T., & Buchanan, B. B. (1996). Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chemical Geology*, 132, 199–204.

García-Hernández, J. E. P., Glenn, J. A., & Baumgartner, D. J. (2000). Bioaccumulation of selenium (Se) in the Cienega de Santa Clara Wetland, Sonora, México. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 46, 298–304.

Hageman, S. P. W., Van der Weijden, R. D., Weijma, J., & Buisman, C. J. N. (2013). Microbiological selenate to selenite conversion for selenium

- removal. *Water research*, 47(7), 2118–2128.  
doi:10.1016/j.watres.2013.01.012
- Hartikainen, H., T, X., & Piironen, V. (2000). Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil*, 25, 193–200.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., & Fujita, M. (2010). Selenium in Higher Plants: Physiological Role, Antioxidant Metabolism and Stress Tolerance. *Journal of Plants Sciences*, 5 (4), 354–375.
- Kanimozhi, K., & Panneerselvam, A. (2010). Studies on isolation and nitrogen fixation ability of *Azospirillum* spp . isolated from Thanjavur district. *Chemical sínica*, 1(3), 138–145.
- Kärenlampi, S., Schat, H., Vangronsveld, J., Verkleij, J. A. C., Van der Lelie, D., Mergeay, M., & Tervahauta, A. I. (2000). Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environmental pollution*, 107(2), 225–231.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885–886.
- Kotchoni, S. O., & Baba-Moussa, L. (2013). Effect of different plant growth promoting rhizobacteria on maize seed germination and seedling development. *American Journal of Plant Sciences*, 04(05), 1013–1021.  
doi:10.4236/ajps.2013.45125
- Mehdipour, M. M. J., Emtiazi, G., & Salehi, Z. (2012). Enhanced Auxin Production by *Azospirillum* Pure Cultures from Plant Root Exudates. *Journal Agricultural Science Technology*, 14, 985–994.

- Mishra, B. K., & Dadhich, S. K. (2010). Methodology of Nitrogen Biofertilizer Production. *Journal Advanced Development Research*, 1(1), 3–6.
- Pennanen, A., Xue, T., & Hartikainen, H. (2002). Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. *Journal Applied Botany*, 76, 66–76.
- Perrig, D., Boiero, M. L., Masciarelli, O. A., Penna, C., Ruiz, O. A., Cassán, F. D., & Luna, M. V. (2007). Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 1143–1150. doi:10.1007/s00253-007-0909-9
- R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>. Download Free: <http://cran.r-project.org/bin/windows/base/>.
- Rencher, A. C., & Christensen, W. F. (2013). *Methods of Multivariate Analysis*. John Wiley and Sons (3rd ed., Vol. 3, pp. 156–233). New Jersey: Wiley.
- Shamberger, R. J. (1981). Selenium in the Environment. *Science of The Total Environment*, 17(1), 59–74.
- SIAP, (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2013). Cierre de la Producción Agrícola por Cultivo: Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. *Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentos*.

- Sors, T. G., Ellis, D. R., & Salt, D. E. (2005). Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research*, 86(3), 373–389. doi:10.1007/s11120-005-5222-9
- Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil*, 15, 134–154.
- Takada, T., Hirata, M., Kokubu, S., Toorisaka, E., Ozaki, M., & Hano, T. (2008). Kinetic study on biological reduction of selenium compounds. *Process Biochemistry*, 43(11), 1304–1307. doi:10.1016/j.procbio.2008.06.005
- Terry, N., Zayed, A. M., De Souza, M. P., & Tarun, A. S. (2000). Selenium in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 401–432. doi:10.1146/annurev.arplant.51.1.401
- Tinggi, U. (2003). Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology Letters*, 137(1-2), 103–110.
- White, P. J., Bowen, H. C., Marshall, B., & Broadley, M. R. (2007). Extraordinarily high leaf selenium to sulfur ratios define “Se-accumulator” plants. *Annals of Botany*, 100 (1), 111–118.
- White, P. J., Bowen, H. C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spracklen, W. P., Spiby, R. E., ... Broadley, M. R. (2004). Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 55 (404)(404), 1927–1937. doi:10.1093/jxb/erh192
- Zhao, C., Ren, J., Xue, C., & Lin, E. (2005). Study on the Relationship between Soil Selenium and Plant Selenium Uptake. *Plant and Soil*, 277(1-2), 197–206. doi:10.1007/s11104-005-7011-9

Zhao, X. Q., Mitani, N., Yamaji, N., Shen, R. F., & Ma, J. F. (2010). Involvement of silicon influx transporter OsNIP2;1 in selenite uptake in rice. *Plant Physiology*, *153*, 1871–1877.

Zhu, Y.-G., Pilon-Smits, E. A. H., Zhao, F.-J., Williams, P. N., & Meharg, A. A. (2009). Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in Plant Science*, *14*(8), 436–442. doi:10.1016/j.tplants.2009.06.006

## **X. ARTÍCULO**

**TRATAMIENTO DE SEMILLAS DE TOMATE CON *Azospirillum* Y SELENIO  
PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA GERMINACIÓN Y EL VIGOR**

## TRATAMIENTO DE SEMILLAS DE TOMATE CON *Azospirillum* Y SELENIO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA GERMINACIÓN Y EL VIGOR

### Tomato seed treatment with *Azospirillum* and selenium for optimization of germination and vigor

Daily Vazquez-Morales<sup>1</sup>, Rosalinda Mendoza-Villarreal<sup>1\*</sup>, Adalberto Benavides-Mendoza<sup>1</sup>, Valentín Robledo-Torres<sup>1</sup>, José Antonio Díaz-García<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Horticultura, División de Agronomía. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, C.P. 25315, México.

<sup>2</sup>Departamento de Estadística y Cálculo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, C.P. 25315, México.

\*Autor para correspondencia [rosalindamendoza@hotmail.com](mailto:rosalindamendoza@hotmail.com)

## RESUMEN

Este estudio se llevó a cabo para determinar el efecto de la inoculación en semillas de tomate con diferentes combinaciones de *Azospirillum* sp. y selenio en las variables de respuesta: porcentaje de germinación, plántulas anormales, prueba de vigor, índice de velocidad de emergencia, longitud media de hipocotilo y longitud media de radícula. Además, encontrar la concentración óptima que afecte positivamente las variables evaluadas, mediante las técnicas de superficies de respuesta multivariadas.

El experimento consistió en estudiar las combinaciones de las concentraciones 0, 1, 2 y 3 ppm de selenio y diluciones 0, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> ufc/ml de *Azospirillum*, con 16 tratamientos, utilizando 50 semillas por repetición, con cuatro

repeticiones por tratamiento. Se utilizó un diseño completamente al azar balanceado con arreglo factorial 4x4. De acuerdo a la prueba de independencia realizada se encontró que las variables en estudio no eran independientes, por lo tanto, se analizaron simultáneamente a través de las técnicas del análisis multivariado. En el análisis de varianza multivariado (MANOVA) se encontró diferencia altamente significativa para los tres factores: selenio, *Azospirillum* y la interacción de ambos factores, teniendo un p-valor de  $< 2.2e^{-16}$ ,  $7.68e^{-7}$ , y  $1.47e^{-10}$  respectivamente. De acuerdo a esta metodología empleada, se pudo encontrar el punto óptimo de los factores que inducen un cambio en las variables estudiadas, esto contesta el objetivo específico del trabajo en el cual se encontró la concentración de 0.25 ppm de Se y  $5.1^{+06}$  ufc/ml de la cepa C-5 de *Azospirillum* sp., que afectan de manera positiva la calidad fisiológica de semillas de tomate.

**Palabras clave:** *Inoculación, rizobacterias, selenito, MANOVA, superficies de respuesta.*

## **ABSTRACT**

This study was conducted to determine the effect of inoculation of tomato seeds with different combinations of *Azospirillum* sp. and selenium on the response variables: percentage of germination, abnormal seedlings, test force, emergency speed index, average length of hypocotyl and radicle mean length. Moreover, finding the optimal concentration that positively affects the variables assessed using techniques of multivariate response surfaces.

The experiment was to study the combinations of concentrations 0, 1, 2 and 3 ppm selenium and dilutions of 0,  $10^5$ ,  $10^6$  and  $10^7$  cfu/ml of *Azospirillum* with 16 treatments, using 50 seeds per replicate with four replicates per treatment. A design was used to completely balanced 4x4 factorial arrangement. According to the test of independence was found on the study variables were not independent, therefore, were simultaneously analyzed using multivariate analysis techniques. In the multivariate analysis of variance (MANOVA) highly significant difference was found for all three factors: selenium, *Azospirillum* and the interaction of both factors having a p-value  $< 2.2e^{-16}$ ,  $7.68e^7$  and  $1.47e^{-10}$  respectively. According to this methodology, it was possible to find the optimum point of the factors that induce a change in the variables studied, that answers the specific objective of the work in which the concentration of 0.25 ppm Se and  $5.1e^{+06}$  cfu/ml of strain C-5 of *Azospirillum* sp., which positively affect the physiological quality of tomato seeds.

**Keywords:** *inoculation, rhizobacterias, selenite, MANOVA, response surfaces.*

## INTRODUCCIÓN

El uso de bioinoculantes en la agricultura son incorporados como tratamientos a semillas, los cuales contienen microorganismos promotores del crecimiento vegetal, como la bacteria del género *Azospirillum* sp., junto con otros elementos benéficos muestran un creciente interés no sólo en estudios de investigación sino también en evaluaciones extensivas y en usos comerciales en diferentes cultivos. *Azospirillum* representa una de las rizobacterias más estudiadas (Bashan and De Bashan, 2010; Couillerot *et al.*, 2010) debido a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y producir fitohormonas (Di Barbaro, Pernasetti, & Stegmayer, 2005) como el ácido indol-3-acético (IAA), el ácido giberélico ( $GA_3$ ), el ácido abscísico (ABA), etileno y zeatina (Mehdipour *et al.*, 2012; Perrig *et al.*, 2007). Esta bacteria, inoculada a semillas de cereales, aumenta el porcentaje de germinación (Kotchoni & Baba-Moussa, 2013), la biomasa (Kloepper, Leong, Teintze, & Schroth, 1980), aparición de raíces laterales, aumentan la densidad y la longitud de los pelos radicales, incrementando así el volumen radical (Di Barbaro *et al.*, 2005). Por otro lado, el Se al igual que el S tiene variedad en sus estados de oxidación como seleniuro ( $Se^{2-}$ ), selenio elemental ( $Se^0$ ), selenito ( $Se^{4+}$ ) y selenato ( $Se^{6+}$ ), estas dos últimas formas son absorbidas por las plantas debido a su elevada solubilidad, sin embargo el  $Se^0$  y el  $Se^{2-}$  son insolubles, por lo cual difícilmente son absorbidas por las plantas (Broadley *et al.*, 2007). Fordyce (2005) señala que en la mayoría de los suelos del mundo las concentraciones de selenio son bajas, alcanzando de 0.01 a 2.0 mg/kg y una media de 0.4 mg/kg, mientras que en Sonora fue reportado de 0.8-1.8 mg/kg en sedimentos (García-Hernández *et al.*, 2000)

El selenio (Se) tiene una función importante en una amplia gama de procesos fisiológicos asociados con la actividad antioxidante en los organismos (Durán *et al.*, 2013a). y se sabe que el selenito, sobre el selenato, es más efectivo en esta actividad (Cartes *et al.*, 2006), además también influye en la tolerancia al estrés (Cartes *et al.*, 2006; Hartikainen, T, y Piironen, 2000; Hasanuzzaman *et al.*, 2010; Pennanen *et al.*, 2002).

Las plantas hiperacumuladoras de Se pueden almacenar y tolerar de 0.1% (White *et al.*, 2007) hasta 1% de su peso seco (Dawn *et al.*, 2013) sin mostrar ningún síntoma de toxicidad. La absorción de selenito +4 parece ocurrir por un mecanismo diferente a la del selenato (Terry *et al.*, 2000), posiblemente a través de un transportador de fosfato (Zhao *et al.*, 2010). Las plantas de las familias de las Brassicas acumulan selenio especialmente en semillas cuando se cultivan en suelos seleníferos (Bañuelos *et al.*, 2012), los cuáles pueden alcanzar hasta 1200 mg/kg de Se. Casi todos los cultivos, entre ellos el tomate, son del tipo denominado no acumulador de selenio, es decir, plantas para las cuales más de 25 µg de selenio por gramo de peso seco de raíces y hojas resulta en toxicidad (White *et al.*, 2004). La toxicidad puede manifestarse a través de estrés oxidativo considerando la habilidad prooxidante del selenio o por sustitución competitiva del azufre en las proteínas (Hartikainen *et al.*, 2000). En general las rizobacterias pueden reducir un número de metales pesados a los estados menos tóxicos (Kärenlampi *et al.*, 2000), muchos microorganismos pueden reducir los oxianiones solubles de selenio altamente tóxicos (selenato y selenito) a una forma insoluble menos tóxico como a selenio elemental, seleniuro y selenio orgánico (Garbisu *et al.*, 1996; Hageman *et al.*, 2013). La presencia de bacterias en la rizosfera de mostaza india incrementa la tasa de acumulación de selenio y la volatilización de este en forma de selenato (De Souza *et al.*, 1999).

Existe un efecto sinérgico entre una mezcla de selenobacterias (*Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus* and *Pseudomonas* sp) y *Glomus claroideum* para la biofortificación de cereales (Durán *et al.*, 2013b), además de que *Pseudomonas stutzeri* NT-I puede en condiciones aeróbicas transformar el selenito y selenato a selenio elemental en dimetildiselénido y dimetilselénido (Ming *et al.*, 2011).

Conocemos la interacción de microorganismo con algunos metales y su efecto en algunas plantas, pero se desconoce el efecto que estos tienen en semillas de cultivos para alimento fresco como las hortalizas. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la inoculación en semillas de tomate con diferentes

combinaciones de *Azospirillum* sp. y selenio en las variables de respuesta: porcentaje de germinación, plántulas anormales, prueba de vigor, índice de velocidad de emergencia, longitud media de hipocotilo y longitud media de radícula. Además, encontrar la concentración óptima que afecte positivamente las variables evaluadas, mediante las técnicas de superficies de respuesta multivariadas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### Instalación del experimento

El experimento se llevó a cabo en una cámara de germinación modelo Biotronette III; con semillas de un híbrido de tomate comercial 'Toro', de tipo saladette, de crecimiento determinado. Utilizando como fuente de selenio selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) y tres concentraciones de la bacteria del género *Azospirillum* sp., cepa nativa aislada de la rizosfera de trigo identificada como C-5. El experimento consistió en estudiar las combinación de las concentraciones 0, 1, 2 y 3 ppm de selenio y 0,  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  uf/ml diluciones de *Azospirillum*, con 16 tratamientos. Utilizando 50 semillas por repetición, con cuatro repeticiones por tratamiento.

Como medio del crecimiento para la bacteria *Azospirillum* sp se utilizó el NFb semi-líquido modificado por Döbereiner (Mishra & Dadhich, 2010). La siembra de *Azospirillum* se realizó en 16 tubos de ensayo que contenían 20 ml de NFb semi-líquido Los tubos de ensayo fueron llevados a la incubadora por un periodo de 24 horas a una temperatura de 29 °C (Kanimozhi & Panneerselvam, 2010), obteniendo una concentración de  $10^{10}$  ufc/ml de la cual se realizaron diluciones  $10^7$   $10^6$  y  $10^5$  ufc/ml, aplicando en el mismo tubo de ensayo, las diferentes concentraciones de selenio en forma de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .

### Inoculación de semillas

Transcurridas las 24 horas de los tubos de ensayo en la incubadora, se procedió a la inoculación de las semillas de tomate contando grupos de 50 semillas las que se imbibieron en cada uno de los tubos de ensayo durante 4 horas, según los tratamientos que les correspondían.

### Siembra de semillas en cajas Petri

Después de inoculación se sacaron las semillas de cada tubo de ensayo y se procedió a depositar cada grupo de semillas en cajas Petri que contenía papel filtro blanco de 2 mm de espesor, el cual fue humedecido con anterioridad con agua desionizada. Luego, se llevaron las cajas Petri a la cámara germinadora a una temperatura constante de 25 °C, de acuerdo a las reglas propuestas por la

Asociación Internacional de Análisis de Semillas (ISTA) para *Lycopersicon esculentum*.

Variables agronómicas evaluadas

La ISTA recomienda dos fechas de conteo para *Lycopersicon esculentum*: la primera a los 5 días y la segunda a los 14 días. A continuación se describen cada uno de las variables de respuestas evaluadas.

Porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación se obtuvo a través de una prueba en el laboratorio. La germinación incorpora aquellos eventos que comienzan con la captación de agua por la semilla seca de reposo y terminar con el alargamiento del eje embrionario (Bewley, 1997). Usualmente la radícula, se extiende para penetrar en las estructuras que lo rodean. Esta variable de respuesta se obtuvo contando el número de semillas que germinaron a los 14 días, expresando los resultados en porcentaje.

Plántulas anormales

El procedimiento para obtener esta variable repuesta consiste en verificar que las plántulas no muestran el potencial de convertirse en una planta normal cuando se cultiva en suelos. Para tal objetivo las plántulas se clasificaron como anormales observando las siguientes características: plántulas dañadas, deformadas, etc. La variable se cuantificó mediante un conteo único de semillas, a los 14 días después de la siembra.

Prueba de vigor

La prueba se realizó en el primer conteo, tomando como criterio a las plántulas germinadas normales, que van desde aquellas con poca radícula y poco hipocótilo visible y para las plántulas completamente desarrolladas. El número

de plantas así contadas se expresa en porcentaje, el cual es tomado como la variable de respuesta.

#### Índice de velocidad de emergencia (IVE)

Es uno de los conceptos de vigor más antiguos al igual que la velocidad de germinación. Aquí se evaluó la velocidad con la que emergían las plántulas medidas por cada día. Teniendo en cuenta que el IVE generalmente se realiza en invernadero y con sustrato. Se tomó como referencia de emergencia 4 mm de la radícula de plantas normales; a partir de ahí se consideraba planta emergida. El conteo se inició después de las primeras 24 horas de haber realizado la siembra de semillas en cajas Petri.

Esta variable se calcula bajo la siguiente fórmula,

$$IVE = \frac{\text{numero de plantulas normales}}{\text{primer dia contado}} + \dots + \frac{\text{numero de plantulas normales}}{\text{dia final contado}},$$

la cual es una adaptación de la fórmula para la velocidad de germinación, propuesto por Maguire 1992, (AOSA, 1983).

#### Longitud media de hipocótilo (LMH)

Con el propósito de evitar el error por tipo de instrumento, esta variable de respuesta se obtuvo midiendo con un vernier digital la longitud del hipocotilo. La medición se llevó a cabo al segundo conteo.

#### *Longitud media de radícula*

Esta variable se obtuvo midiendo la longitud de la radícula de cada plántula, expresada en centímetros. Esto se llevó a cabo al segundo conteo.

#### *Modelos estadísticos*

Los datos se analizaron bajo un “Diseño completamente al azar balanceado con arreglo factorial 4x4 completo multivariado”, a través del software estadístico ‘R versión 3.0.2’ (R Core Team, 2013).

Las variables independientes o factores de este estudio son:  $X_1$ = concentraciones de selenio,  $X_2$  = concentraciones de *Azospirillum* y las variables de respuesta o dependientes fueron:  $Y_1$ = porcentaje de germinación,  $Y_2$ = plantas anormales,  $Y_3$ = prueba de vigor,  $Y_4$ = índice de velocidad de emergencia,  $Y_5$ = longitud media de hipocotilo,  $Y_6$ = longitud media de radícula. Prueba de independencia. Con el propósito de decidir si la información se analizaría con técnicas univariadas o multivariadas, se llevó a cabo un análisis sobre la matriz de correlación entre las variables dependientes en estudio. Específicamente se está interesado en probar la hipótesis:

$$H_0: R = I \text{ versus } H_a: R \neq I$$

Prueba que se contrastó a través del estadístico de prueba  $Z_1$  propuesto por Rencher and Christensen (2013). Una vez rechazada la hipótesis con el MANOVA para el diseño de experimentos multivariado correspondiente, y dado que los factores en estudio son cuantitativos (selenio, *Azospirillum*), se procedió a aplicar las técnicas de superficies de respuesta multivariadas.

**Superficie de respuesta multivariada.** Como primer paso se propuso un modelo de segundo grado para cada una de las superficies de respuesta definido como:

$$Y_i^{(r)} = \beta_0^{(r)} + \beta_1^{(r)} x_1 + \beta_2^{(r)} x_2 + \beta_{11}^{(r)} x_1^2 + \beta_{22}^{(r)} x_2^2 + \beta_{12}^{(r)} x_1 x_2 + \varepsilon_i^{(r)}$$

$$i = 1, 2, \dots, abr$$

Para estimar los parámetros del modelo de superficies de respuesta se realizó a través de las técnicas de regresión múltiple multivariada. Las pruebas de hipótesis de los modelos de diseño de experimentos y de regresión múltiple multivariada se realizaron a través de análisis de varianza multivariado (MANOVA), adoptándose el criterio del máximo eigenvalor de Roy, vea Capítulo 5 de Rencher (2002).

Es importante señalar que los MANOVA se llevaron a cabo a través de la función “manova (...)” de R, la cual permite escoger cuál de los 4 criterios más

aplicados en la toma de decisiones en MANOVA se desea (Criterios de Pillai, Wilks, Hotelling-Lawley y Roy). Para los fines del presente artículo los cuatro criterios rechazaron la hipótesis de igualdad entre las medias de tratamientos.

**Medida de asociación multivariada.** Con analogía al coeficiente de determinación en el análisis univariado, como una medida de la bondad de ajuste del modelo de regresión a los datos, se calculó la medida de asociación multivariada de Roy, definida en Subsección 6.1.8, Rencher (2002), p. 173.

**Optimización de superficies de respuesta estimadas univariadas.** Cada superficie de respuesta estimada fue optimizada (Op) –Minimizada o maximizada, según sea el caso-, encontrando los valores de los niveles de los factores que optimizan a cada función.

$$Op_{x_1, x_2} \hat{Y}^{(r)}(x_1, x_2) \quad r=1, 2, \dots, p$$

Denotando además los óptimos individuales de cada superficie de respuesta por  $\phi_r$ ,  $r=1, 2, \dots, p$ .

**Optimización de superficies de respuesta estimadas multivariadas.** Dado que en la práctica es casi imposible obtener el mismo punto crítico  $(x_1, x_2)$  que optimiza simultáneamente a las variables respuesta  $Y^{(r)}$ ,  $r=1, 2, \dots, p$  se procedió a aplicar las técnicas de optimización de superficies de respuesta multivariada, específicamente se aplicó la técnica de las distancias.

$$Min_{x_1, x_2} D(x_1, x_2)$$

Donde  $D(x_1, x_2)$  es la función definida como:

$$D(x_1, x_2) = \left[ \sum_{r=1}^p \frac{(\hat{Y}(x_1, x_2) - \phi_r)^2}{\phi_r^2} \right]^{1/2} .$$

## RESULTADOS

### *Prueba de independencia y prueba de normalidad multivariada*

El estadístico de prueba fue de  $U = 140.4964$  con un  $p$ -valor =  $0^{***}$  de donde se concluye que las variables respuesta transformadas  $Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5, Y_6$  no son independientes. Por lo tanto lo conducente es analizarlas simultáneamente a través de las técnicas del análisis multivariado. De la prueba de normalidad multivariada se concluye que no hay evidencia para suponer que los datos no tienen una distribución normal multivariada dado que el estadístico de prueba  $Z_1 = 138.6945$  con un  $p$ -valor =  $0^{***}$ , considerado como altamente significativo.

### *Diseño de experimento multivariado*

De acuerdo al MANOVA del diseño completamente al azar balanceado con arreglo factorial 4x4 realizado, se puede observar en la tabla 10 que hay diferencia altamente significativa para las hipótesis de los tres factores A, B, su interacción "A x B". De donde se concluye que existe diferencia entre los diferentes niveles del selenio, concentración de *Azospirillum* y que interacción de selenio y *Azospirillum* provoca un efecto en la fisiología de semillas de tomate.

**Tabla 10.** MANOVA con el criterio de Roy para el modelo de diseño completamente al azar balanceado con arreglo factorial 4x4 multivariado.

| FV       | GL | Estadístico de Roy | Aproximación F | Numerador DF | Denominador DF | Pr(>F)             |
|----------|----|--------------------|----------------|--------------|----------------|--------------------|
| A        | 3  | 5.8464             | 43.848         | 6            | 45             | $< 2.2e^{-16}$ *** |
| B        | 3  | 1.2919             | 9.689          | 6            | 45             | $7.682e^{-07}$ *** |
| A x B    | 9  | 2.5669             | 13.690         | 9            | 48             | $1.476e^{-10}$ *** |
| Residual | 48 |                    |                |              |                |                    |

FV= Fuentes de variación, GL= Grados de libertad, aproximación F, (Rencher & Christensen, 2013)

Técnicas de superficies de respuesta multivariada.

### *Regresión múltiple multivariada del MANOVA*

Del MANOVA para la regresión múltiple multivariada, Tabla 11, se observa que la hipótesis nula es rechazada, es decir los modelos de regresión polinomiales de segundo grado ajustan adecuadamente el comportamiento de cada una de las variables respuesta en función de la concentración de selenio y *Azospirillum*.

**Tabla 11.** MANOVA con el criterio de Roy para la regresión múltiple multivariada.

| FV         | GL | Roy    | Aproximación F | Numerador DF | Denominador DF | Pr(>F)                   |
|------------|----|--------|----------------|--------------|----------------|--------------------------|
| Regresión  | 5  | 1.4512 | 13.787         | 6            | 57             | 1.32e <sup>-09</sup> *** |
| Residuales | 58 |        |                |              |                |                          |

FV= Fuentes de variación, GL= Grados de libertad.

### *Medida de asociación multivariada de Roy*

Tal y como menciona Rencher (2002), subsección 6.1.8, aún queda mucho por estudiar sobre estas medidas de asociación, pero el valor reportado de  $\eta_{Roy} = 0.5920406$  es bastante alto, reforzando la conclusión de que los modelos de regresión estimados son adecuados.

### *Superficies de respuesta estimadas*

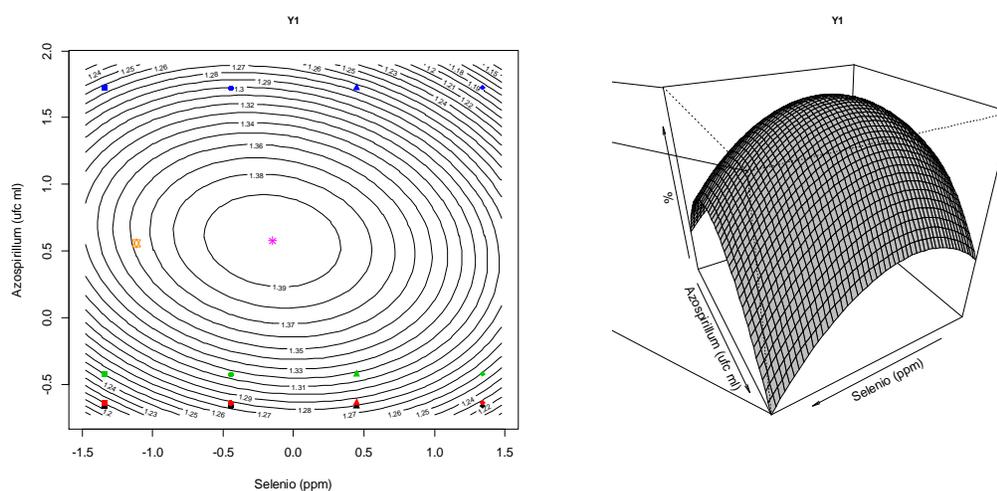
En la tabla 12, se muestran los modelos de segundo grado de superficie de respuesta estimados para cada variable dependiente en términos de las variables independientes  $x_1, x_2$ , donde la ecuación de regresión es:

$$(Ecuación 1)... \hat{Y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$

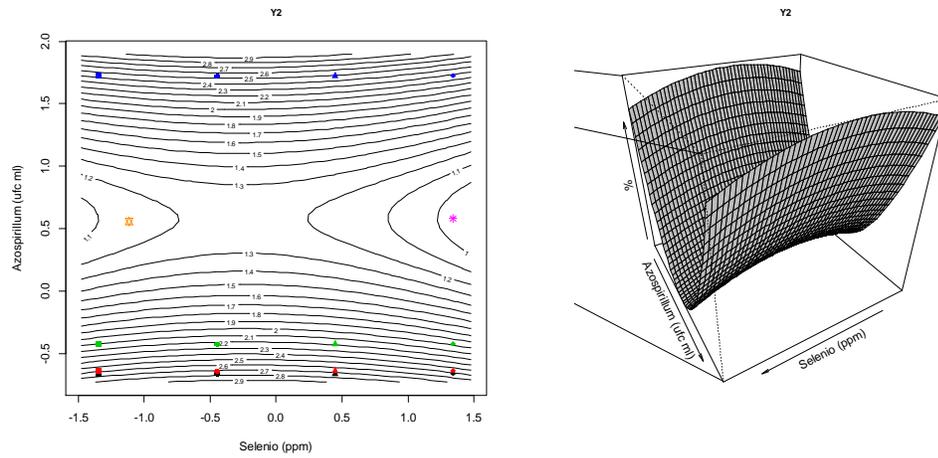
**Tabla 12.** Aquí se muestran los modelos de segundo grado de superficie de respuestas estimadas para cada variable dependiente en términos de las variables selenio y *Azospirillum*.

|       | $b_0$   | $b_1$   | $b_2$   | $b_{11}$ | $b_{22}$ | $b_{12}$ |
|-------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|
| $Y_1$ | 1.3741  | -0.0031 | 0.0852  | -0.0388  | -0.0759  | -0.0146  |
| $Y_2$ | 1.5530  | -0.0486 | -1.1609 | -0.1033  | 1.0050   | -0.0052  |
| $Y_3$ | 72.2063 | 1.8866  | 9.5003  | -5.9765  | -6.3860  | -1.5685  |
| $Y_4$ | 8.5649  | 0.1306  | 0.6269  | -0.3769  | -0.4190  | -0.1095  |
| $Y_5$ | 3.8403  | 0.1034  | -0.0558 | 0.2787   | -0.0464  | -0.0498  |
| $Y_6$ | 10.1012 | -1.1272 | 0.8923  | -1.4742  | -0.8482  | -0.2191  |

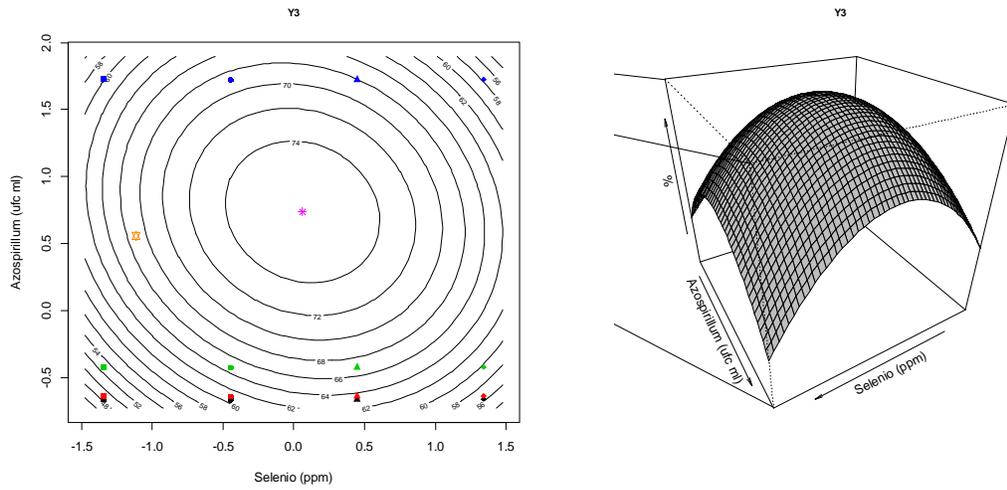
En la Figura 5, 6, 7, 8, 9 y 10 encontramos que para las variables  $Y_1$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$ ,  $Y_6$  se realizó una maximización ya que en pruebas de germinación o vigor de semillas nos interesa que estas variables sean las más altas posibles. Para la variable respuesta  $Y_2$  se requirió hacer una minimización ya que esa variable en estudio correspondía a plantas anormales, entonces en una prueba de germinación se requiriere encontrar el menor número de plantas. Partiendo de estas consideraciones en el experimento se encontró un punto óptimo multivariado, así como también un punto óptimo individual para cada variable.



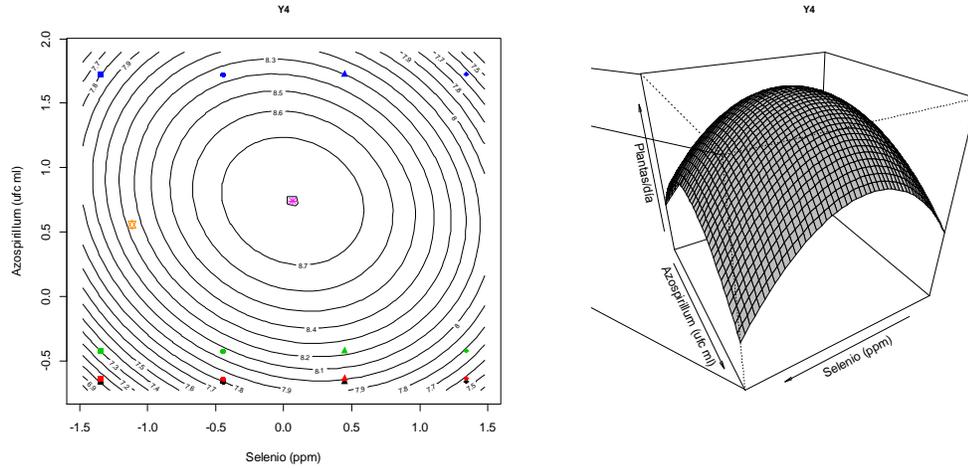
**Figura 5.** Superficie de respuesta multivariadas (3D) y grafico de contornos de la variable porcentaje de germinación.



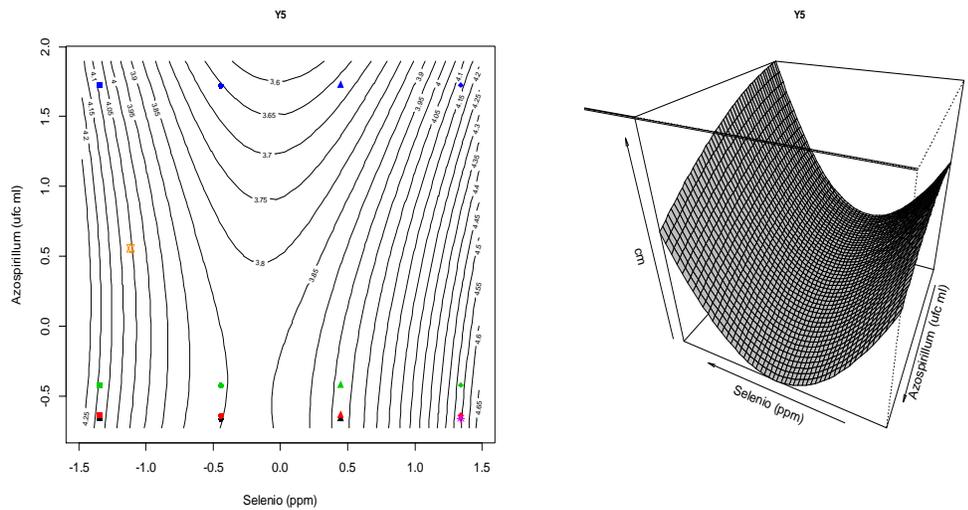
**Figura 6.** Superficie de respuesta multivariadas (3D) y gráfico de contornos de la variable plantas anormales.



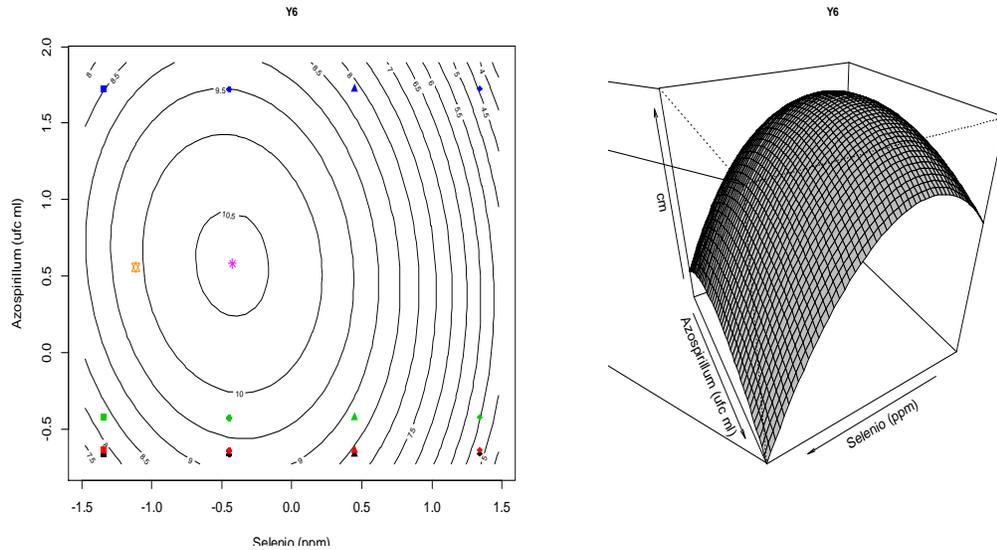
**Figura 7.** Superficie de respuesta multivariadas (3D) y gráfico de contornos de la variable prueba de vigor.



**Figura 8.** Superficie de respuesta multivariadas (3D) y gráfico de contornos de la variable índice de velocidad de emergencia



**Figura 9.** Superficie de respuesta multivariadas (3D) y grafico de contornos de la variable longitud media de hipocotilo.



**Figura 10.** Superficie de respuesta multivariada (3D) y grafico de contornos de la variable longitud media de radícula.

En las figuras de contornos de cada variable se observa el punto óptimo multivariado representado por el símbolo ☆ de color naranja oscuro, así como también podemos observar el punto óptimo individual para cada variable representado por el simbolo\* de color violeta. En las figuras de contorno de la 1-6 podemos ver los 16 tratamientos en el cual los símbolos representan al factor selenio y los colores al factor *Azospirillum*, en el orden siguiente: □ ○ △ ◇ y negro, rojo, verde y azul. Por Ejemplo; T<sub>1</sub>= □ color negro, T<sub>2</sub>= □ color rojo, T<sub>3</sub>= □ color verde, T<sub>4</sub>= □ color azul y así hasta llegar al T<sub>16</sub>= ◇ color azul.

#### *Optimización de superficies de respuesta estimadas univariadas.*

En esta sección se muestra de manera individual las superficies de respuesta estimadas para cada variable dependiente, donde se señala el punto crítico (Se, *Azospirillum*) para cada uno de ellos. Tabla 13 teniendo en cuenta que al realizar un estudio de fisiológico de semillas siempre se consideran un grupo de variables, lo cual depende de la especie de la semilla en estudio. Es por eso que se recomienda encontrar un solo punto crítico de Se y *Azospirillum* que optimice de manera simultánea todas las variables dependientes que mejoren la calidad fisiológica de las semillas de tomate.

**Tabla 13.** Puntos críticos individuales, haciendo notar que son diferentes para cada variable en estudio y Optimización de superficies de respuesta estimadas en pruebas de germinación y vigor de semillas de tomate.

| Variables dependientes | Niveles óptimos de los factores |   |
|------------------------|---------------------------------|---|
|                        | Se (ppm)                        | <i>Azospirillum</i> (ufc ml <sup>-1</sup> ) |
| Y <sub>1</sub>         | 1.33                            | 5.18e <sup>+06</sup>                        |
| Y <sub>2</sub>         | 3                               | 5.20e <sup>+06</sup>                        |
| Y <sub>3</sub>         | 1.56                            | 5.85 <sup>+06</sup>                         |
| Y <sub>4</sub>         | 1.57                            | 5.87e <sup>+06</sup>                        |
| Y <sub>5</sub>         | 3                               | 0   |
| Y <sub>6</sub>         | 1.02                            | 5.20 <sup>+06</sup>                         |

*Optimización de superficies de respuesta estimadas multivariadas*

En la tabla 14, se señala el punto crítico simultáneo que define el punto óptimo de Pareto (Rencher & Christensen, 2013), para las 6 superficies de respuesta, indicando que este punto (Se, *Azospirillum*) optimiza simultáneamente a las 6 variables dependientes Y<sub>1</sub>-Y<sub>6</sub>.

**Tabla 14.** Optimización de superficies de respuesta estimadas en pruebas de germinación y vigor de semillas de tomate

| Criterio              | Nivel óptimo de los factores |   |
|-----------------------|------------------------------|---|
|                       | Se (ppm)                     | <i>Azospirillum</i> (ufc ml <sup>-1</sup> ) |
| Función de Distancias | 0.25                         | 5.10 <sup>+06</sup>                         |

## DISCUSIÓN

En este estudio se encontró que el tratamiento de semillas con diferentes niveles de *Azospirillum* y selenio tiene efectos importantes en la fisiología de las plántulas de tomate, en el caso de *Azospirillum* se encontró que mejora las variables de respuesta en estudio. El selenio por lo contrario se observó que las concentraciones altas en este caso 3 ppm afectó la radícula de las plantas, provocándole una deformidad en la raíz, ya que mostró una raíz corta y exenta de raíces secundarias, la cual no fue considerada como anormal, se consideró efecto del tratamiento. Las plantas testigo mostraron no fueron las que tuvieron la mejor respuesta en este caso, donde la viabilidad de las semillas se ve que va en decaimiento. Indirectamente, se obtuvo las concentraciones óptimas multivariadas de los factores selenio y *Azospirillum* que nos dará la mayor respuesta para cada variable en estudio a la vez. Encontrando así la concentración de 0.25 ppm de Se y  $5.10^{+06}$  ufc/ml de la cepa C-5 de *Azospirillum* sp., que afectan de manera positiva la calidad fisiológica de semillas de tomate. De Souza *et al* (1999), en un experimento con plantas de *Brassica juncea* L., encontró que las bacterias facilitaron el 35% volatilización de selenio y 70% de acumulación de selenio en planta, mostrando así que la presencia de bacterias en la rizosfera de *Brassica juncea* L., era necesaria para lograr las mejores tasas de acumulación de selenio en plantas. La inoculación de la rizosfera de plantas con bacterias produjeron una concentración 5 veces mayor de Se en raíces que en plantas que no fueron inoculadas. Además las plantas inoculadas tenían un aumento en área superficial de raíz.

A pesar de que se tiene conocimiento de que las bacterias participan de forma natural en el ciclo del selenio, algunos estudios se han enfocado a la fitorremediación de suelos con selenobacterias (bacterias tolerantes a altas concentraciones de Se) (Acuña, *et al.*, 2012). Sin embargo, no se conoce el efecto que tiene la interacción de otras rizobacterias como *Azospirillum* sp cómo afectan la germinación y vigor y la aplicación exógena de Se a semillas de

hortalizas consultar concentraciones de selenio aplicadas en cualquier semilla hortícolas. Es bien sabido que muchos microorganismos pueden reducir los oxianiones solubles de selenio altamente tóxicos (selenato y selenito) a una forma insoluble mucho menos tóxico, es decir, el selenio elemental (Garbisu et al., 1996). Garbisu et al, (1996) desarrollaron un sistema de tratamiento utilizando las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* para mitigar flujos de residuos contaminados con selenio como modelos de bacterias Gram (-) y (+) del suelo, respectivamente. Además, encontraron que el Se elemental se deposita en forma de gránulos en toda la célula, o entre la pared celular y la membrana plasmática en *P. fluorescens* y *B. subtilis*, respectivamente. En *B. subtilis* se induce la síntesis de tiorredoxina en presencia de selenito.

La inoculación de *Azospirillum* y selenio aplicados como tratamientos a semillas de tomate, tienen efecto directo sobre la fisiología de las plántulas, por lo que se pudo observar de acuerdo a los resultados obtenidos, se puede mencionar que la respuesta de las plantas a estos factores va a depender de la especie en estudio, en el caso del tomate se requieren concentraciones generalmente bajas de selenio para que las respuestas sean favorables, ya que a altas concentraciones inducen mayor número de plantas anormales, observándose el efecto directo en las radículas de plántulas.

Por último, cabe mencionar que se pudo encontrar el punto óptimo de selenio y *Azospirillum* los cuales producen las mayores respuestas para las variables porcentaje de germinación, plántulas anormales, IVE, LMH y LMR, para esta especie de plantas en estudio.

## REFERENCIAS

- Acuña, J. J., Jorquera, M. A., Barra, P. J., Crowley, D. E., & De la Luz, M. M. (2012). Selenobacteria selected from the rhizosphere as a potential tool for Se biofortification of wheat crops. *Biology and Fertility of Soils*, 49(2), 175–185. doi:10.1007/s00374-012-0705-2
- AOSA. (1983). Seed Vigor Testing Handbook. *Analysts Association of Official Seed*, 32, 10–15.
- Bañuelos, G. S., Walse, S. S., Ang, S. I., Pickering, I. J., Fakra, S. C., Marcus, M. A., & Freeman, J. L. (2012). Quantification, localization, and speciation of selenium in seeds of canola and two mustard species compared to seed-meals produced by hydraulic press. *Analytical Chemistry*, 84 (14), 6024–6030. doi:10.1021/ac300813e
- Bashan, Y., & De Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—A critical assessment. *Advances in Agronomy*, 108, 77–136.
- Bewley, D. J. (n.d.). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9, 1055–1066.
- Broadley, M. R., White, P. J., Bryson, R. J., Meacham, M. C., Bowen, H. C., Johnson, S. E., ... Tucker, M. (2007). Biofortification of UK food crops with selenium. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65(02), 169–181. doi:10.1079/PNS2006490
- Cartes, P., Shene, C., & Mora, M. (2006). Selenium distribution in ryegrass and its antioxidant role as affected by sulfur fertilization. *Plant Soil*, 285, 187–195.
- Castellanos, J. Z. (2011). *Manual de Producción de Tomate en Invernadero* (1st ed., pp. 45–204). Guanajuato, México: Intagri. Ocma.
- Couillerot, O., Bouffaud, M.-L., Baudoin, E., Muller, D., Caballero-Mellado, J., & Moëne-Loccoz, Y. (2010). Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2298–2305. doi:10.1016/j.soilbio.2010.09.003
- Dawn, L. S., Valdez, B. J. R., Fakra, S. C., Marcus, M. A., Wangeline, A. L., & H, P.-S. E. A. (2013). Influence of microbial associations on selenium localization and speciation in roots of *Astragalus* and *Stanleya* hyperaccumulators. *Environmental and Experimental Botany*, 88, 33–42. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.12.011

- De Souza, M. P., Chu, D., Zhao, M., Zayed, A. M., Ruzin, S. E., Schichnes, D., & Terry, N. (1999). Rhizosphere bacteria enhance selenium accumulation and volatilization by indian mustard. *Plant Physiology*, 119(2), 565–573.
- Di Barbaro, G., Pernasetti, S., & Stegmayer, A. (2005). Effects Evaluation of *Azospirillum brasilensis* Inoculation on Pepper (*Capsicum annum* L. var Trompa de Elefante) Seeds Germination and Plants Emergence. *Revistas del CIZAS*, 6 (1 and 2), 74–85.
- Durán, P., Acuña, J. J., Jorquera, M. A., Azcón, R., Borie, F., Cornejo, P., & Mora, M. L. (2013a). Enhanced selenium content in wheat grain by co-inoculation of selenobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi: A preliminary study as a potential Se biofortification strategy. *Journal of Cereal Science*, 57(3), 275–280. doi:10.1016/j.jcs.2012.11.012
- Durán, P., Acuña, J. J., Jorquera, M. A., Azcón, R., Borie, F., Cornejo, P., & Mora, M. L. (2013b). Enhanced selenium content in wheat grain by co-inoculation of selenobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi: A preliminary study as a potential Se biofortification strategy. *Journal of Cereal Science*, 57(3), 275–280. doi:10.1016/j.jcs.2012.11.012
- FAOSTAT. (2013). *Production Crops: Time-Series and Cross Sectional Data Relating to Food and Agriculture for Some 245 Countries*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fordyce, F. M. (2005a). Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment. In O. Selinus, B. Alloway, J. A. Centeno, R. B. Finkelman, R. Fuge, U. Lindh, & P. Smedley (Eds.), *Essentials of Medical Geology* (Revised., pp. 375–416). West Mains Road, Edinburgh: Elsevier. doi:10.1007/978-94-007-4375-5
- Fordyce, F. M. (2005b). Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment. *Essentials of Medical Geology*, 373–415.
- Garbisu, C., Ishii, T., Leighton, T., & Buchanan, B. B. (1996). Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chemical Geology*, 132, 199–204.
- García-Hernández, J. E. P., Glenn, J. A., & Baumgartner, D. J. (2000). Bioaccumulation of selenium (Se) in the Cienega de Santa Clara Wetland, Sonora, México. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 46, 298–304.
- Hageman, S. P. W., Van der Weijden, R. D., Weijma, J., & Buisman, C. J. N. (2013). Microbiological selenate to selenite conversion for selenium removal. *Water research*, 47(7), 2118–2128. doi:10.1016/j.watres.2013.01.012
- Hartikainen, H., T, X., & Piironen, V. (2000). Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil*, 25, 193–200.

- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., & Fujita, M. (2010). Selenium in Higher Plants: Physiological Role, Antioxidant Metabolism and Stress Tolerance. *Journal of Plants Sciences*, 5 (4), 354–375.
- Kanimozhi, K., & Panneerselvam, A. (2010). Studies on isolation and nitrogen fixation ability of *Azospirillum* spp . isolated from Thanjavur district. *Chemical sínica*, 1(3), 138–145.
- Kärenlampi, S., Schat, H., Vangronsveld, J., Verkleij, J. A. C., Van der Lelie, D., Mergeay, M., & Tervahauta, A. I. (2000). Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environmental pollution*, 107(2), 225–231.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885–886.
- Kotchoni, S. O., & Baba-Moussa, L. (2013). Effect of different plant growth promoting rhizobacteria on maize seed germination and seedling development. *American Journal of Plant Sciences*, 04(05), 1013–1021. doi:10.4236/ajps.2013.45125
- Mehdipour, M. M. J., Emtiazi, G., & Salehi, Z. (2012). Enhanced Auxin Production by *Azospirillum* Pure Cultures from Plant Root Exudates. *Journal Agricultural Science Technology*, 14, 985–994.
- Mishra, B. K., & Dadhich, S. K. (2010). Methodology of Nitrogen Biofertilizer Production. *Journal Advanced Development Research*, 1(1), 3–6.
- Pennanen, A., Xue, T., & Hartikainen, H. (2002). Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. *Journal Applied Botany*, 76, 66–76.
- Perrig, D., Boiero, M. L., Masciarelli, O. A., Penna, C., Ruiz, O. A., Cassán, F. D., & Luna, M. V. (2007). Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 1143–1150. doi:10.1007/s00253-007-0909-9
- R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>. Download Free: <http://cran.r-project.org/bin/windows/base/>.
- Rencher, A. C., & Christensen, W. F. (2013). *Methods of Multivariate Analysis*. John Wiley and Sons (3rd ed., Vol. 3, pp. 156–233). New Jersey: Wiley.

- Shamberger, R. J. (1981). Selenium in the Environment. *Science of The Total Environment*, 17(1), 59–74.
- SIAP, (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2013). Cierre de la Producción Agrícola por Cultivo: Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. *Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentos*.
- Sors, T. G., Ellis, D. R., & Salt, D. E. (2005). Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research*, 86(3), 373–389. doi:10.1007/s11120-005-5222-9
- Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil*, 15, 134–154.
- Takada, T., Hirata, M., Kokubu, S., Toorisaka, E., Ozaki, M., & Hano, T. (2008). Kinetic study on biological reduction of selenium compounds. *Process Biochemistry*, 43(11), 1304–1307. doi:10.1016/j.procbio.2008.06.005
- Terry, N., Zayed, A. M., De Souza, M. P., & Tarun, A. S. (2000). Selenium in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 401–432. doi:10.1146/annurev.arplant.51.1.401
- Tinggi, U. (2003). Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology Letters*, 137(1-2), 103–110.
- White, P. J., Bowen, H. C., Marshall, B., & Broadley, M. R. (2007). Extraordinarily high leaf selenium to sulfur ratios define “Se-accumulator” plants. *Annals of Botany*, 100 (1), 111–118.
- White, P. J., Bowen, H. C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spracklen, W. P., Spiby, R. E., ... Broadley, M. R. (2004). Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 55 (404)(404), 1927–1937. doi:10.1093/jxb/erh192
- Zhao, C., Ren, J., Xue, C., & Lin, E. (2005). Study on the Relationship between Soil Selenium and Plant Selenium Uptake. *Plant and Soil*, 277(1-2), 197–206. doi:10.1007/s11104-005-7011-9
- Zhao, X. Q., Mitani, N., Yamaji, N., Shen, R. F., & Ma, J. F. (2010). Involvement of silicon influx transporter OsNIP2;1 in selenite uptake in rice. *Plant Physiology*, 153, 1871–1877.
- Zhu, Y.-G., Pilon-Smits, E. A. H., Zhao, F.-J., Williams, P. N., & Meharg, A. A. (2009). Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in Plant Science*, 14(8), 436–442. doi:10.1016/j.tplants.2009.06.006

## XI. CONCLUSION

La respuesta de la inoculación de *Azospirillum* y selenio aplicados como tratamientos a semillas de tomate de las plantas a estos factores va a depender de la especie en estudio, en el caso del tomate se requieren concentraciones generalmente bajas de selenio para que las respuestas sean favorables, ya que a altas concentraciones inducen mayor número de plantas anormales, observándose el efecto directo en las radículas de plántulas. En el caso de la producción de plántulas en invernadero también se requieren concentraciones bajas de selenio y *Azospirillum* también se ve que tiene afecto sobre estas.

Se encontró el punto óptimo de selenio y *Azospirillum* los cuales producen las mayores respuestas para las variables porcentaje de germinación, plántulas anormales, IVE, LMH y LMR, para esta especie de plantas en estudio. Así como también el punto óptimo que permita el buen crecimiento de la planta sin que la combinación de los factores selenio y *Azospirillum* provoquen un efecto negativo en el crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate.