

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y
FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES



**Utilización de bacterias endófitas en
el desarrollo de plántulas de pimiento**

**INGENIERO TÉCNICO AGRÍCOLA ESPECIALIDAD
HORTOFRUTICULTURA Y JARDINERÍA**

Alumna:

Raquel Mesas Gallardo

Tutores:

Dr. Fernando Diánez Martínez

D. Jose Alberto Yau Quintero

Almería, julio, 2014

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras

Índice de gráficas

Índice de tablas

	Página
1. INTERÉS Y OBJETIVOS	10
1.1 Interés	10
1.2 Objetivos	12
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 El cultivo del pimiento	14
2.1.1 Introducción	14
2.1.2 Origen y taxonomía del género	16
2.1.3 Botánica y fisiología de la planta	17
2.1.4 Exigencias generales de clima y suelo	25
2.1.4.1 Exigencias climáticas	25
2.1.4.2 Exigencias del suelo	27
2.1.5 Ciclos del cultivo del pimiento	27
2.2 El control biológico	28
2.2.1 Ecología de los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas	31

	Página
2.2.2 Potencial antagonista de microorganismos endófitos (endofíticos)	33
2.2.3 Mecanismos de promoción del crecimiento en las plantas.....	34
2.2.4 Principales géneros de endófitos	35
2.2.4.1 <i>Bacillus</i> spp.	35
2.2.4.2 <i>Pseudomonas</i> spp.	36
 3. MATERIAL Y MÉTODOS	 41
3.1 Introducción	41
3.2 Multiplicación y preparación del inóculo	43
3.3 Inoculación en semillero	44
3.4 Evaluación del estado y calidad de las plántulas	47
 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 57
4.1 Resultados	57
4.1.1 Evaluación de la influencia de los diferentes tratamientos sobre la parte aérea y sistema radical de las plántulas de pimiento	58
4.1.1.2 Parámetros morfológicos	58
4.1.1.3 Índices de calidad foliar	66
4.1.1.4 Índices de calidad pre-trasplante	68
4.2 Discusión	70

	Página
5. CONCLUSIONES	77
6. BIBLIOGRAFÍA	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Plantas de pimientos entutoradas en invernadero	18
Figura 2: Flor de la planta de pimiento	20
Figura 3: Diferentes frutos de pimiento	21
Figura 4: Pimientos Lamuyo entutorado	21
Figura 5: Pimientos variedad Italiano dulce	22
Figura 6: Pimientos California varios colores	24
Figura 7: Bandejas de turba antes de la inoculación	44
Figura 8: Inoculación en bandejas	45
Figura 9: Colocación de bandejas en semillero	46
Figura 10: Detalle de plántulas en semillero	46
Figura 11: Plántulas de pimiento tras su traslado a las instalaciones de la Universidad de Almería	47
Figura 12: plántulas para ser evaluadas	48
Figura 13: Separación de las hojas del tallo mediante bisturí	48
Figura 14: Medida de la longitud del tallo	49
Figura 15: Medida del calibre del tallo	49
Figura 16: Hojas colocadas para ser fotografiadas	50
Figura 17: Calculamos el área foliar con el programa WinDIAS 3.1 Ink	51

	Página
Figura 18: Introducción de las raíces lavadas y secas en sobres	51
Figura 19: sobres colocados dentro de la estufa	52
Figura 20: Balanza de precisión para las medidas de las diferentes partes	53

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Reparto del consumo de pimiento en España	14
Gráfica 2: Reparto de la superficie de pimiento	15
Gráfica 3: Reparto de la producción de pimiento	15
Gráfica 4: Diseño del ensayo	42
Gráfica 5: Esquema del proceso preparación aislados	43
Gráfica 6: Esquema preparación de inóculos	44
Gráfica 7: Alturas medias de las plántulas (cm) inoculadas con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%)	58
Gráfica 8: Calibre medio del tallo por plántula (mm) inoculada con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%)	59
Gráfica 9: N° medio de hojas verdaderas por plántula inoculada con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%)	60

Gráfica 10: Peso seco medio de hojas verdaderas por plántula inoculadas con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%).....	61
Gráfica 11: Peso seco medio de raíz por plántula expresado en gramos inoculada con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%)	62
Gráfica 12: Peso seco medio de tallo por plántula expresado en gramos inoculada con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%)	63
Gráfica 13: Peso seco medio total por plántula expresado en gramos inoculada con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%)	64
Gráfica 14: Área foliar media por plántula expresada en cm ² inoculados con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%).....	65
Gráfica 15: Área foliar específica del ensayo expresada en cm ² /g inoculados con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%)	66

	Página
Gráfica 16: Coeficiente de área foliar del ensayo expresada en cm ² /g inoculados con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%)	67
Gráfica 17: Índice de tallo-raíz del ensayo expresada en conidias/ml inoculados con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%)	68
Gráfica 18: Índice de esbeltez del ensayo expresada en conidias/ml inoculadas con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%)	69
Gráfica 19: Índice de calidad de Dickson del ensayo expresada en conidias/ml inoculados con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%)	70
Gráfica 20: Índice de calidad hortícola al pre-trasplante (IHP), para el ensayo de pimiento inoculado con los distintos tratamientos medido en conidias/ml comparación con un testigo sin tratar (ANOVA, LSD al 95%)...	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Posición del género	17
Tabla 2: Ciclos del cultivo del pimiento	28
Tabla 3: Codificación de los tratamientos	42

INTERÉS Y OBJETIVOS

1. INTERÉS Y OBJETIVOS

1.1 Interés

El pimiento (*Capsicum annum* L.), es uno de los cultivos hortícolas bajo invernadero con mayor superficie cultivada en nuestro país, localizándose casi la mitad de la producción en Almería, Alicante y Murcia. Por su importancia económica, integra uno de los primeros cultivos hortícolas más importantes de la provincia de Almería.

En cultivo bajo abrigo en Almería, Tello (2003) reporta varios agentes causales de enfermedades importantes en el pimiento, destacándose a nivel de semillero, diferentes géneros de *Pythium*, *Rhizoctonia solani* y *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. En el terreno del asiento, géneros de *Pythium*, *Phytophthora capsici*, *Verticillium dahliae* y *Ralstonia solanacearum*.

La utilización de productos fitosanitarios en el control de enfermedades de plantas es un elemento clave en la agricultura intensiva, a pesar de que la tendencia es la reducción de su aplicación por diversos motivos tales como una disminución en los niveles de residuos en los productos cosechados, una escasa eficacia de los fitosanitarios frente a los patógenos, y como no, una menor incidencia en el medio ambiente. Por ello, la aplicación de agentes de control biológico puede considerarse como una alternativa o un complemento al control químico.

Los agentes de control biológico son microorganismos que deben ser capaces de establecerse en la rizosfera y la filosfera compitiendo con los microorganismos residentes, además de minimizar las enfermedades producidas por los patógenos, y adaptarse a un ambiente cambiante. Además, algunos de estos microorganismos activan en las plantas mecanismos de defensa.

Las técnicas de control de las enfermedades de las plantas han llevado en el pasado a la implantación de patógenos, rápida superación de los genes de resistencia y a contaminaciones con repercusión en la flora y fauna además de la salud humana. Las medidas de control que se implementen deben de ser científicamente correctas y técnicamente eficaces, con una revalorización de las prácticas de control sobre el patógeno a medio y largo plazo y con efectos potencialmente estables a largo plazo. Bajo esta óptica la utilización de microorganismos para el control de las enfermedades de las plantas encaja tanto en las técnicas de cultivo tradicionales como en las ecológicas. Los beneficios de la utilización de agentes de control biológico (ACBs) son: i) una acción sobre el patógeno menos radical, que conlleva a la no aparición de resistencias, ii) una

cierta permanencia de los ACBs aunque sujeta a controles regulatorios (climático y biótico), iii) una acción de los ACBs sin afectar a la biodiversidad biológica (parámetro que influye en el desarrollo de las enfermedades), iv) un escaso/nulo riesgo de contaminación ambiental y sobre la salud, ya que no está documentado que la introducción de los ACBs aumente los niveles de toxinas ni se ha demostrado que sus metabolitos entren en la cadena trófica.

Dentro de la aparición de nuevas tecnologías para optimizar la implantación de los cultivos se encuentra el uso de los productos biológicos; es decir incorporar al sistema productivo organismos seleccionados por sus funciones en diversos procesos biológicos.

Dentro de este grupo se pueden citar a los microorganismos promotores del crecimiento vegetal conocidos hoy como PGPM (Plant Growth-Promoting Microorganism). Estos se definen como microorganismos habitantes de la rizosfera que estimulan significativamente el crecimiento de las plantas. Los mecanismos por los cuales los PGPM ejercen efectos positivos sobre las plantas son numerosos. Entre ellos se pueden mencionar la fijación de N₂ (ej. *Azospirillum*), la solubilización de fósforo (P) (ej. *Pseudomonas sp.*), la capacidad de producir ácidos orgánicos (ácidos oxálico, fumárico y cítrico) y fosfatasa facilitando la solubilidad del P y otros nutrientes. Además, la promoción del crecimiento de las plantas puede asociarse a la producción de fitohormonas y a la protección contra hongos patógenos. Distintas cepas del género *Trichoderma* están ampliamente documentadas como ACBs con amplio espectro de acción. Aunque en el pasado se ha dado mucho énfasis en su acción directa sobre el patógeno (hiperparasitismo) y en su capacidad de sintetizar toxinas, antibióticos y enzimas (principalmente *in vitro*) los mecanismos de acción de estos ACBs son más amplios. También compiten indirectamente con el patógeno por espacio y nutrientes y pueden tener un efecto protector sobre la planta, colonizando las raíces, promoviendo el crecimiento o induciendo respuestas de resistencia (Harman *et al.*, 2004; Segarra *et al.*, 2007). Algunos de estos efectos pueden actuar conjuntamente y su importancia en el control de enfermedades depende de cada cepa de *Trichoderma*, del patógeno, la especie vegetal y las condiciones ambientales (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004).

Basado en los resultados obtenidos previamente por otros investigadores, el presente trabajo tiene como objetivo, evaluar el potencial de las bacterias endófitas en el desarrollo de plántulas de pimiento, que permitan seleccionar aislados más eficaces como biocontrol a las principales enfermedades que afectan a estos cultivos.

1.2. Objetivos

1. Evaluar el potencial de las bacterias endófitas en el desarrollo de plántulas de pimiento, que permitan seleccionar aislados más eficaces como biocontrol a las principales enfermedades que afectan a estos cultivos, realizando la aplicación sobre semillas, bajo condiciones de semillero.

2. Evaluar la influencia de los distintos tratamientos sobre el desarrollo del nuevo sistema radicular.

3. Evaluar la influencia de los distintos tratamientos sobre el desarrollo de la parte aérea.

4. Determinación de distintos índices de calidad de plántulas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 EL CULTIVO DEL PIMIENTO

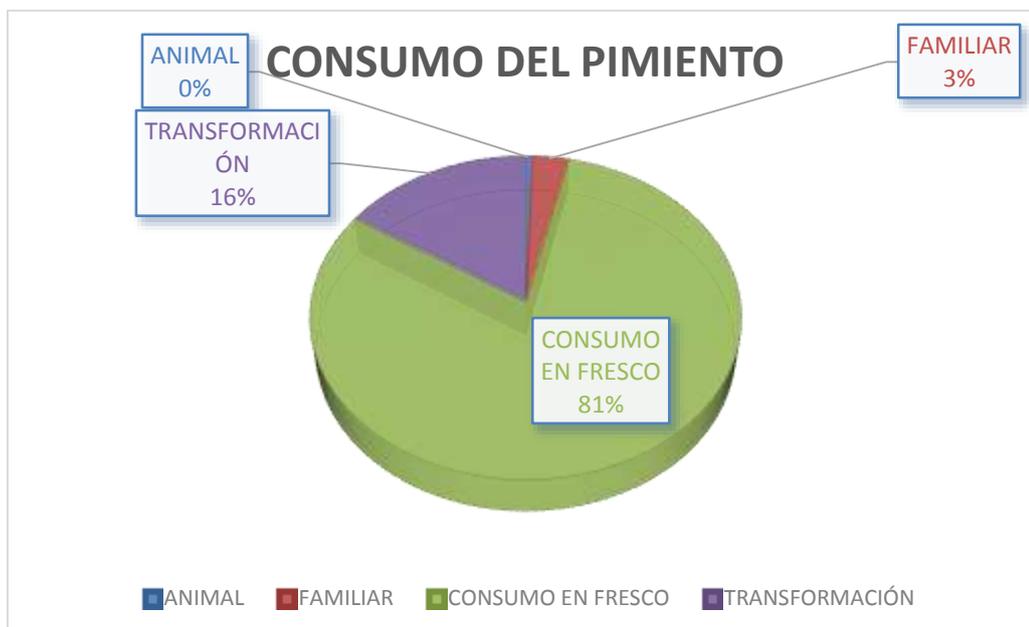
2.1.1 INTRODUCCIÓN

España es el sexto productor del mundo de pimientos con una producción de 921.089 t, siendo el segundo país en exportación de ese producto y siendo el noveno alimento exportado con unas 511.340 t. (Faostat 2011).

La producción de pimiento producida en España reparte su consumo de la siguiente forma:

- Animal: 0,52% 5 200 toneladas.
- Familiar: 3,15% 31 500 toneladas.
- Consumo en fresco: 84,72% 847 000 toneladas.
- Transformación: 11,62% 166 200 toneladas.

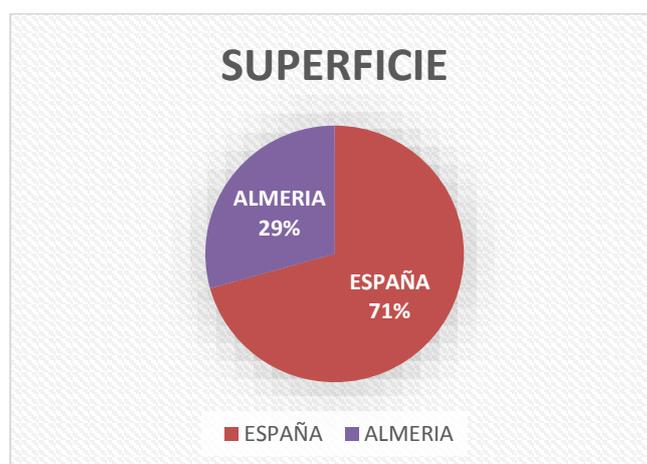
Por tanto, más del 80 % de la producción es para consumo en fresco y el resto para industria.



Gráfica 1: Reparto del consumo de pimiento en España.

Los usos que se le dan al pimiento son principalmente el consumo en fresco, en seco, en polvo, encurtido, en salsas, ensaladas, moles, rellenos, dulces, como fuente de colorantes, en medicina y la industria cosmética (Djian-Caporalino et al, 2006). Los pimientos también se usan como plantas ornamentales en jardines (Bosland, 1994).

Debido a su importancia económica, es uno de los productos hortícolas más importantes de Almería, con una superficie cultivada de 7.300 ha consiguiendo una producción de 470.263 t de las 918.549 t producidas en España en una superficie cultivada total de 17.595 ha. (MARM, 2011).



Gráfica 2: Reparto de la superficie de pimiento



Gráfica 3: Reparto de la producción de pimiento

2.1.2 ORIGEN Y TAXONOMÍA DEL GÉNERO

Parece ser que el pimiento es originario de América del Sur, y como sucedió también con el tomate, los navegantes españoles lo introdujeron en España posiblemente en un principio como planta ornamental más que para cultivarla. Se tiene conocimiento por descubrimientos de restos de semillas, que esta planta ya existió entre los años 8500-8000 a.c., aunque la representación más antigua que hasta hoy conocemos, de frutos de pimiento, grabados sobre piedra, datan de 800 a 1000 años después de Jesucristo. Este hallazgo se realizó en la parte nordeste de los Andes Peruanos.

Originario de la zona central de Sudamérica (Bolivia), donde es el límite del clima de transición del clima templado a sub-tropical, sin heladas, vegetaban muchas especies del género *Capsicum*. Las numerosas expediciones al Nuevo Mundo, finales del siglo XV e inicio del XVI, permiten la introducción del género *Capsicum*, por navegantes españoles y portugueses en Europa, inicialmente en áreas del Mediterráneo, de climas templados y cálidos, siguiendo en África, América del Norte, Indias, China y Oceanía.

Las especies de *Capsicum* spp cultivadas son cinco (*C. annum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. baccatum*) y alrededor de 25 silvestres y semicultivadas (Hernández-Verdugo et al., 1999; Milla, 2006) Dentro de las cinco especies cultivadas, *Capsicum annum* L. es la más extensamente cultivada y la de mayor importancia económica, ya que presenta una distribución mundial (Aguilar-Rincon et al., 2010).

POSICIÓN TAXONÓMICA	NOMBRE CIENTÍFICO
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales

Familia	Solanaceae
Género	Capsicum
Especie	annuum

Tabla 1: Posición del género

2.1.3 BOTÁNICA Y FISIOLÓGÍA DE LA PLANTA

Pertenece a la familia de las Solanáceas y su nombre botánico es *Capsicum annuum* L.

Es una planta herbácea, anual, de tallos ramosos que parten de un tallo principal, el cual parte y se ramifica entre los 10 a 40 cm (según la variedad) en dos, tres ramas que a su vez se bifurcan en forma dicotómica. Este armazón está provisto de hojas y yemas que dan lugar a tallos secundarios. Los frutos van insertados en las ramas principales y más tardíamente en las ramas secundarias, siendo los frutos mejor formados y de mejor calidad los de las ramas principales. La altura de la planta en invernadero es variable, dependiendo de la variedad y de la postura, temprana o más tardía, pero por regla general se puede decir que oscila entre 1 y 2 m. Los tallos del pimiento son muy frágiles y se parten con facilidad a la menor presión; por ello y debido a la altura que ya hemos expresado tienen, necesita tutores para mantener un porte de planta firme.



Figura 1: Plantas de pimientos entutoradas en invernadero

Raíz.- se forma en los primeros 20 días después de la germinación. Es una raíz pivotante, delgada con abundantes raicillas, rodeada de una gran cabellera de raíces secundarias y adventicias. La raíz es profunda (0,5 – 1,25 m), según la textura del suelo con numerosas raíces fasciculadas que van en sentido horizontal llegando a tener una longitud de 0,50 a 1 m, en terrenos enarenados y riego localizado la profundidad de la raíz es menor, de unos 50-60 cm, aunque el 75% del volumen de las raíces se localiza a unos 20-30 cm, con una gran densidad horizontal de raíces que alcanzan una anchura de 50-75 cm. (Camacho, 2003).

Si se realiza aporcado en la base del tallo puede emitir nuevas raíces.

Tallo.- de crecimiento determinado o limitado, erecto, frágil de epidermis brillante, con estrías marcadas longitudinalmente en algunas variedades, en otras no son muy marcadas. Posee ramificaciones de 1.5 cm de grosor, de consistencia tierna al principio, lignificándose más tarde conforme crece la planta, pero no lignifica lo suficiente para mantenerla erguida siendo necesario el entutorado de la planta para que

no se quiebren las ramas, ya que en condiciones óptimas de invernadero pueden crecer más de dos metros (Sobrino y Sobrino, 1992).

Todas las ramificaciones parten del tallo principal que al llegar a una altura que coincide con la cruz, con 10-12 hojas verdaderas en la planta, en días 20-25 días tras trasplante, se ramifica en 2-3 brazos, y éstos a su vez en forma dicotómica tienden a bifurcarse, todo ello dependiendo del tipo de crecimiento y la variedad. En algunas variedades, el crecimiento es diferente, los brotes laterales aparecen muy rápido, antes de la formación de la cruz, al mes del trasplante, conformándose una planta con un tallo principal y ramificaciones laterales de igual grosor, aunque este tipo de pimientos no tienen mucha importancia desde el punto de vista productivo.

De las yemas de las axilas de las hojas del tallo principal, salen nuevas brotaciones secundarias que a su vez pueden emitir otros tallos, hojas, flores y así sucesivamente.

Hojas.- son enteras, lanceoladas y lampiñas, terminadas en ápice muy agudo y de color verde más o menos intenso (según variedad) y brillantes, van insertas en el tallo de forma alterna, y dependiendo de las variedades, unas son más grandes que otras. Parece ser que existe una relación directa entre tamaño de hoja y peso del fruto.

Flores.- suelen aparecer solitarias en cada nudo del tallo, en las axilas de las hojas. Las flores son autógamias, con un porcentaje no muy elevado de alogamia, (no llega al 10%). En la mayoría de las variedades suele salir la primera flor en la primera “cruz” de la planta y suele dar lugar a un fruto grande.

Tienen los pétalos blancos y son pequeñas, el tamaño de la misma también depende de la variedad, por ejemplo, la flor de un pimiento Dulce Italiano es más pequeña que la de un pimiento California. En el pimiento California son más importantes las flores que salen en las ramas principales y su cuajado implica pimientos de más calibre y mejor formados que los de las flores que salen en los tallos secundarios.

La floración se inicia cuando la planta tiene entre 10-15 hojas verdaderas, pudiendo transcurrir entre 25-30 días desde la plantación hasta el inicio de la floración. Estas permanecen receptivas entre 1-3 días desde su apertura o anthesis dependiendo de las condiciones de humedad y temperatura.



Figura 2: Flor de la planta de pimiento

Frutos.- son una baya hueca no jugosa en forma de capsula en posición abatida, al estar el pedúnculo curvado. Posee una piel lisa de color verde al principio y color amarillo, naranja o roja al madurar. Tiene 2, 3 4 lóculos, con un ápice en la punta, redondeado o hendido. Su base está formada por el cáliz soldado a la piel con o sin hombros, una peculiaridad en pimiento es que parece prolongarse y penetrar al interior del fruto formando el conjunto de placenta y las numerosas semillas que le rodean. El compuesto que le da el sabor picante al fruto, es una grasa soluble compuesta por capsicina y dihidrocapsicina (Govindrajan,1985). Estos compuestos se encuentran en la pared del pimiento y en las semillas no encontrándose en los tejidos del pericarpio (Huffman,1978).

El grosor de la carne es mayor en pimiento dulce que en los picantes. El fruto es grande y puede alcanzar un peso de hasta 300 g y 10 cm de diámetro. Dependiendo de los tipos de frutos dulces cultivados, en invernadero pueden alcanzar estos pesos y medidas.



Figura 3: Diferentes frutos de pimiento

Los pimientos de tipo Lamuyo: Son de gran tamaño, largos y de sección cuadrada, rectangulares y de longitud mayor que la anchura, de carne gruesa. En general son plantas de vegetación frondosa y vigorosa. Son menos sensibles al frío que las de tipo california y se cultivan en plantaciones medias tardías y en ciclos largos. Las fechas de trasplantes van desde julio a agosto incluso septiembre. Se recolectan en verde o rojo, aunque también se recolectan en amarillo.



Figura 4: Pimientos Lamuyo entutorado

Los frutos tipo dulce italiano: Son de forma alargada, estrechos, puntiagudos y de sección triangular. Presentan un color verde brillante que vira ligeramente a rojo al madurar, de superficie irregular con carne fina, utilizados mucho para freír. Se plantan desde junio a octubre, aunque los trasplantes más habituales son en los meses de agosto a septiembre para recolectarse en color verde intenso y rojo, principalmente. Tiene un buen aguante para el transporte y son tolerantes al frío, con producciones de 6-7 kg / m² (Nuez et al .,1996).



Figura 5: Pimientos variedad Italiano dulce

Los pimientos tipo California se clasifican para el mercado de la siguiente forma:

A- Primera (I - A): este pimiento ha de ser bien formado, sano, limpio y color propio de cada variedad, exento de marcas por enfermedades o insectos (virus, trips, orugas etc.) y exento de daños fisiológicos en la piel (cracking, rozaduras, etc.).

El pimiento debe ser consistente, duro, sin síntomas de blandeo, y sin deformaciones acusadas, exento de pico en su cierre. El pedúnculo no puede ir rajado, magullado y debe presentar un corte limpio. En cuanto al color, el pimiento rojo puede presentar hasta un 10% de verde (esto depende de las fechas, no es igual en invierno que en otoño).

En el pimiento recolectado en verde, cualquier indicio de color rojo o morado le hace no ser apto para incluirlo en primera, así como también los frutos que presentan manchas blancas por sombreo.

Calibres:

_ GG (90 - 110 mm)

_ G (70 - 90 mm)

_ M (60 - 80 mm)

_ P (40 - 50 mm)

B- Segunda (II - B): el pimiento de segunda será pimiento sano, con deformaciones, algo pintones, inicio de marcas por enfermedades o insectos, con daños en el pedúnculo (rajado, magullado, etc.) con color alterado por diferentes motivos, pico más acusado etc.

Calibres: igual que primera (I - A).

C- Tercera (III - C): en esta clasificación irán los sobremaduros, tiernos, pimientos todavía en crecimiento, con marcas acusadas por virus, insectos, grietas, anaranjados, afligidos, etc. Estos frutos más los pimientos mal cuajados (tipo bola o galleta) se destinan a la industria normalmente.

D- Destrío: pimientos rotos, podridos, muy afligidos, muy afectados de virosis, etc.

Esta clasificación puede sufrir alteraciones dependiendo de la entidad manipuladora y de los mercados a los que exporta.



Figura 6: Pimientos California varios colores

Semillas.- son de forma lenticular u oval, aplanadas y de superficie lisa, de tamaño y forma diversa, constituidas por el endospermo, embrión y la cubierta. Se encuentran concentradas en la parte más gruesa del fruto, insertas en una placenta cónica en forma de huso.

El número de semillas depende de la polinización y así mismo del tamaño del fruto. Puede contener entre 150- 200 semillas, en condiciones normales las semillas debe reunir las siguientes condiciones:

- Poder germinativo: 70%
- Pureza específica: 98%
- Facultad germinativa: 3-4 años.

2.1.4 EXIGENCIAS GENERALES DE CLIMA Y SUELO

2.1.4.1 EXIGENCIAS CLIMÁTICAS

Temperatura

Es una planta que aguanta las altas temperaturas, requiere temperaturas más elevadas que otros cultivos, pero con temperaturas superiores a 35°C, la planta puede sufrir estrés hídrico, pudiendo ocasionar caída de los botones florales o frutos recién cuajados, si la temperatura pasa de los 40°C los estomas se pueden cerrar y la fotosíntesis disminuye, debido a que la raíz puede no ser capaz de suministrar agua.

Estas temperaturas suelen darse en los meses de Julio y Agosto en Almería. Si existe alta temperatura debemos equilibrarla con otros factores como luminosidad y humedad, puesto que puede aumentar la incidencia de Blossom (Reche,2010).

Es una especie sensible al frío, si durante el desarrollo del botón floral las temperaturas son bajas, las flores formadas son morfológicamente diferentes a las producidas con temperaturas adecuadas, presentando en algunos de los casos las siguientes anomalías morfológicas:

- Acortamiento de estambres.
- Engrosamiento del ovario y pistilo, provocando que el pistilo sobresalga de los pétalos.
- Alteración de los pétalos pudiendo quedar estos curvados y sin desarrollar.
- Formación de ovarios adicionales, pudiendo crecer pequeños frutos alrededor del principal.
- Fusión de anteras.

Por debajo de 0°C la planta se hiela y por debajo de 10°C detiene su desarrollo vegetativo, siendo deficiente a partir de los 15°C hacia abajo. La temperatura ideal para el desarrollo del cultivo se encuentra entre 25–27°C por el día y temperaturas nocturnas de 18 - 20°C (Baker y Van Uffelen, 1988), aunque para la floración es mejor temperaturas nocturnas algo menores. El polen se vuelve inviable con temperaturas nocturnas de 8 - 10°C. (Camacho, 2003).

Humedad

El pimiento admite más humedad en el ambiente del invernadero que otros cultivos; su óptimo está comprendido entre el 50% -70%. Si la humedad es más alta y la vegetación es exuberante el cultivo se expone a fuertes ataques de botrytis y otras enfermedades, además de que la fecundación de las flores se ve bastante dificultada. Si la humedad es baja y la temperatura es elevada se origina caída de flores y de frutos recién cuajados.

Luminosidad

Es una planta muy exigente en luz. Cuando la luminosidad es escasa debido a periodos nubosos, por el uso de dobles techos y/o encalados de cubiertas se puede ver afectada la viabilidad del polen con la consiguiente pérdida de fecundación, también caída de flores y alargamiento entre nudos.

Los niveles altos de luminosidad contribuyen a la reducción de las hojas, siendo imprescindible el blanqueo del invernadero.

Anhídrido carbónico

Se ha podido ver la respuesta positiva del pimiento a la fertilización carbónica. Podemos decir que un manejo racional de los invernaderos, proporciona los niveles adecuados para un perfecto funcionamiento del cultivo; ya que aportaciones adicionales de este gas requieren métodos más sofisticados que son difícilmente manejables por el agricultor.

Un exceso de este gas puede producir cierre de estomas, reduciendo por tanto la fotosíntesis.

Los factores climáticos mencionados (temperatura, humedad y luminosidad), están íntimamente relacionados, por lo que al actuar sobre uno de ellos su variación incide en los otros. La mayor o menor incidencia de estos 26 factores viene determinada por la orientación y tipo de invernadero, material de cubierta y situación geográfica, entre otros factores.

2.1.4.2 EXIGENCIAS DEL SUELO

El tipo de suelo ideal son los areno-limosos; no son convenientes los suelos arcillosos, aunque en los terrenos enarenados los admite bien. Los suelos húmedos no les van muy bien, exigiendo un buen drenaje de los mismos.

El pH óptimo de este cultivo varía entre 6,5 a 7; en suelos de cultivo enarenado vegeta perfectamente con un pH de 7 a 8.

El pimiento es menos resistente a la salinidad del suelo y agua de riego que otros cultivos; con salinidad en el suelo y en el agua de riego la planta desarrolla poco y el fruto que se obtiene es de menor tamaño, así como la producción total del cultivo. En algunas comarcas oscila entre los 4 a 5 kg/m², debido a la baja calidad de las aguas de riego, con conductividades que oscilan entre 2,500 dS/m y 4,000 dS/m.

La deficiencia de calcio aumenta la sensibilidad a enfermedades vasculares. En suelos ricos en magnesio, éste interfiere la asimilación del calcio y por ello aumenta el ataque de enfermedades fúngicas.

2.1.5 CICLOS DEL CULTIVO DEL PIMIENTO

El ciclo del cultivo del pimiento en el invernadero puede extenderse durante todos los meses del año estando presente en los mercados durante todo el tiempo. La mayor densidad de plantaciones suele darse en los meses de agosto hasta mayo.

Por tanto las fechas de plantación son muy variables, dependiendo de la zona geográfica de la comarca productora y del tipo de pimiento, para Almería pueden considerarse muy aproximadas las siguientes fechas (Reche, 2010):

Ciclos tempranos: Las recolecciones comienzan a partir de octubre hasta abril o mayo, siendo muy frecuentes las plantaciones en los siguientes meses:

Mayo/ junio	—————→	Pimientos tipo California
Junio/ julio	—————→	Pimiento tipo Lamuyo
Agosto/ septiembre	—————→	Pimiento tipo Dulce Italiano

En la cuenca mediterránea los ciclos de cultivo coinciden con plantaciones tempranas a final de primavera y principios de verano, y a principios de otoño para seguir después en enero o febrero los cultivos de melón y sandía.

Hay que tener en cuenta que el pimiento California es más exigente a las temperaturas que el pimiento Lamuyo y pimiento tipo Italiano largo siendo este último más resistente a temperaturas frías.

Los ciclos largos abarcan desde Julio/Agosto hasta Mayo/Junio, con una duración de 250 a 300 días y los de ciclo corto, bien de otoño o de primavera es de 180 días.

	CICLO LARGO	CICLO CORTO
SEMILLERO	mayo/ agosto	mayo/junio
TRANSPLANTE	julio/septiembre	julio /agosto
RECOLECCIÓN	noviembre/mayo	octubre/febrero
DURACIÓN DEL CICLO	300 días tras trasplante	180 días desde trasplante

Tabla 2: Ciclos del cultivo del pimiento

2.2 EL CONTROL BIOLÓGICO

Actualmente se estima que más del 30% de la producción agrícola mundial se pierde anualmente por problemas fitosanitarios. De esto surge la necesidad de estudiar y proponer medidas de control que permitan disminuir tales perjuicios aumentando la eficiencia productiva (Kimati et al., 1995).

La utilización de productos fitosanitarios en el control de enfermedades de plantas es un elemento clave en la agricultura intensiva, a pesar de que la tendencia es la reducción de su aplicación por diversos motivos tales como una disminución en los niveles de residuos en los productos cosechados, una escasa eficacia de los fitosanitarios frente a los patógenos, y como no, una menor incidencia en el medio ambiente. Por ello,

la aplicación de agentes de control biológico (ACB) puede considerarse como una alternativa o un complemento al control químico.

Uno de los grandes problemas que resulta de la aplicación de antagonistas microbianos es que son microorganismos vivos y como tales, se ven perjudicados por la aplicación de plaguicidas, por lo que su efectividad queda en entredicho.

En la naturaleza, las plantas están en continua interacción con poblaciones de microorganismos. Tomemos, como ejemplo, poblaciones del orden de $4,5 \cdot 10^6$ microorganismos en un 1 g de suelo rizosférico o 10^7 microorganismos viviendo epifíticamente por gramo de hoja (Lindow y Brandl, 2003).

En general, los microorganismos actúan de forma beneficiosa en la planta, y tan sólo una mínima proporción de microorganismos actúa de forma negativa sobre la misma, causándoles enfermedad. En la naturaleza, lo normal es que las plantas estén sanas debido a un mecanismo de autorregulación de poblaciones. A esa autorregulación se le denomina control biológico (Mondino y Vero, 2006).

Cuando se produce la aplicación de agentes de control biológico se debe tener en cuenta, principalmente que tipo de microorganismos están presentes de forma natural en la planta. Ello nos permitiría una mayor eficacia en el control de patógenos. Los microorganismos presentes en una planta de tomate o pimiento, ya sea en la parte aérea como radical, son bien diferentes en muchos casos a los que puede presentar una planta de judía, por ejemplo; aún más si se tiene en cuenta, el clima de la zona, las condiciones del cultivo, etc. La realidad, es que sólo se plantea la aplicación de productos comerciales sin tener en cuenta este hecho. La utilización de microorganismos aislados de sitios semejantes a donde van a ser aplicados, implican una mejor adaptación de los mismos, dando lugar a biocontrol más eficaz.

Un ejemplo de biocontrol natural son los suelos supresivos. El término **suelo o sustrato supresivo** se aplica a aquéllos, en los que las enfermedades causadas por determinados patógenos, no se manifiestan o lo hacen mínimamente, a pesar de que los fitopatógenos están naturalmente presentes o artificialmente introducidos, de cultivar un huésped susceptible y de que el ambiente aéreo sea favorable (Baker y Cook, 1974).

La detección del fenómeno aparece cuando la incidencia o la severidad de una enfermedad es menor de la esperada para las condiciones ambientales existentes o en los suelos que rodean la zona (Cook y Baker, 1983). Para su medida es importante aislar el efecto suelo o sustrato de otras posibles fuentes de variación: como la densidad de inóculo, el cultivar, las condiciones climáticas o el manejo cultural (Couteaudier *et al.*, 1987).

Las respuestas al ACB van vinculadas a que tipo de patógenos se quiere controlar, el tipo de planta, el ACB empleado así como los mecanismos de acción del mismo. Es obvio, que para que un antagonista parasite a su huésped debe entrar en contacto con sus estructuras. Si, por el contrario, su mecanismo de acción es inducir la resistencia de la planta, éste debe ser aplicado antes de la entrada del patógeno. Así, por ejemplo, los frutos pueden ser pulverizados en postcosecha con la formulación biológica, las raíces puede quedar sumergidas en una solución con el antagonista, las semillas pueden venir incorporadas con el agente de control biológico o bien los cortes que se realizan en la planta, pueden quedar impregnados con una pasta que contiene al ACB.

El control biológico carece generalmente de capacidad curativa, por lo que deben ser aplicados de forma preventiva. Lógicamente, hay excepciones como el control de oídios (hongos ectoparásitos) por micoparásitos, pudiéndose realizar el control mediante aplicaciones foliares.

No debemos olvidar, que el agricultor debe de familiarizarse con este método de control, y por tanto, sus aplicaciones deben estar adaptadas a las mismas que se realizan cuando se aplican fitosanitarios químicos. A diferencia de control biológico de plagas, no se puede determinar el establecimiento de los ACB; es imposible cuantificar salvo por métodos analíticos, por lo que el agricultor en muchas ocasiones desiste, por temor a que se desarrolle la enfermedad.

Dentro de los mecanismos que ejercen los antagonistas sobre la propia planta, uno de los más estudiados, como ya hemos comentado anteriormente, es la resistencia inducida. El conocimiento de las bases genéticas y moleculares que controlan estos mecanismos de defensa que ejercen las plantas, hace que se puede establecer una equivalencia con el sistema inmune de los animales. Estos sistemas se saben que son sistémicos, y por tanto, no sólo se activan en el tejido donde se ha detectado o reconocido al patógeno. Esta propiedad puede ser aprovechada en agricultura y se están realizando numerosos estudios cuyo objetivo principal es el desarrollo de productos agroquímicos, que contengan activadores de esa resistencia. Estos estudios van más a allá y se están realizando otros basados en el uso de péptidos antimicrobianos para mejorar la resistencia en plantas transgénicas. Las limitaciones que regulan el uso de organismos modificados genéticamente, impiden la comercialización de estas plantas resistentes a patógenos, aunque estas técnicas ofrecen oportunidades futuras en el control biológico de patógenos.

2.2.1 ECOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

Un sistema agrícola sostenible ideal, es aquél que mantiene y mejora la salud humana, el ambiente se ve beneficiado y produce alimentos suficientes y de calidad para la población mundial (Shankar et al., 2011). Dicha sostenibilidad tiene como punto clave la menor dependencia a los fertilizantes y productos químicos, como los plaguicidas, por lo que el uso de microorganismos con múltiples beneficios sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, encamina el manejo integral de cultivos, buscando el equilibrio idóneo entre sustentabilidad y rentabilidad (Olalde y Aguilera, 1998), asumiendo además que el mundo enfrenta un enorme reto para satisfacer las necesidades de un consumo alimenticio cada vez mayor, con escasas extensiones de tierras cultivables (Xavier y Boyetchko, 2002).

El componente microbiano del suelo es importante para el equilibrio de los ecosistemas (Olalde y Aguilera, 1998). Los procesos agrícolas, así como el manejo de los recursos vegetales inciden sobre este componente afectando tanto la biodiversidad como la densidad de las poblaciones microbianas implicadas, dando como resultados tanto a medio y como a largo plazo, la pérdida de fertilidad de los suelos y su progresiva pauperización (Olalde y Aguilera, 1998; Shankar et al., 2011). En condiciones naturales o con bajo nivel de disturbio en la vegetación silvestre, se ha demostrado que la interdependencia planta-microorganismo ha contribuido al mantenimiento, funcionamiento y la estabilidad de los ecosistemas de las especies en las comunidades vegetales (Aguirre-Medina et al., 2009).

Algunos microorganismos del suelo son fundamentales en los ciclos biogeoquímicos y su aplicación como biofertilizantes ha sido utilizada para aumentar la producción de cultivos por muchos años. La rizosfera es un importante entorno ecológico del suelo para las interacciones planta-microorganismo; es el volumen de suelo adyacente a las raíces donde se presenta una intensa actividad microbiana. Tales interacciones asociadas a la rizosfera son determinantes para la sanidad de las plantas y la fertilidad del suelo, ya que allí habitan tanto microorganismos patógenos como benéficos (Hayat *et al.*, 2010).

El efecto rizosfera es más alto para las bacterias, seguido por los hongos. Estos microorganismos que habitan la rizosfera se pueden clasificar en grupos funcionales como bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, microorganismos solubilizadores de fósforo, microorganismos celulolíticos y amilolíticos, microorganismos proteolíticos y

hongos micorrizales, entre otros (Sylvia *et al.*, 1999). Se destacan entre las bacterias algunos grupos funcionales como amonificantes y nitrificantes (Osorio, 2007). Igualmente, se deben considerar los mecanismos de interacción que existen entre diferentes grupos y las implicaciones en el manejo de sistemas de agricultura sostenible (Johansson *et al.*, 2004).

Las relaciones entre los ciclos de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y otros ciclos biogeoquímicos y los grupos funcionales de microorganismos son altamente influyentes sobre el crecimiento, la productividad de las plantas y el ciclaje de nutrientes, debido a lo que los microorganismos interactúan directamente con las raíces de las plantas (Matsumoto *et al.*, 2005; Torres y Lizarazo, 2006). Muchos de los microorganismos presentes en estos grupos funcionales son considerados como PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) (Kloepper y Schroth, 1978), término que hace referencia a rizobacterias benéficas que inducen incremento en el crecimiento de las plantas.

Los microorganismos considerados como PGPRs cumplen muchas funciones en el suelo, entre ellas, ayudan a solubilizar fosfato mineral y otros nutrientes, aumentan la resistencia de la planta al stress, ayudan a estabilizar los agregados del suelo mejorando su estructura y el contenido de materia orgánica. Hay mayor retención de nitrógeno orgánico del suelo y otros nutrientes aumentado su liberación, lo cual contribuye a la reducción de la aplicación de fertilizantes nitrogenados y fosfóricos (Hayat *et al.*, 2010). Se han reportado también PGPRs en procesos de biorremediación de suelos, degradando e incluso mineralizando compuestos orgánicos recalcitrantes en asocio con plantas (Zhuang *et al.*, 2007). Las PGPRs han sido divididas en dos grupos: las que están involucradas en el ciclaje de nutrientes y la fitoestimulación y las que se relacionan con el biocontrol de patógenos de plantas (Bashan y Holguin, 1998).

Se han reportado géneros con bacterias PGPRs como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, entre otros, (Kloepper, 1983). Así mismo se han caracterizado microorganismos como *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* como potenciales PGPRs por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en forma asimbiótica, colonizar raíces y producir compuestos que regulan las poblaciones de microorganismos de la rizosfera (Kapulnik, 2002).

2.2.2 POTENCIAL ANTANGONISTA DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS (ENDOFÍTICOS)

La palabra endófito se deriva del griego endon , que significa dentro y phyte que significa planta. De Barry fue el primero en utilizar este término, en el año 1866, al referirse a hongos viviendo dentro de los tejidos de una planta (Petrini 1986). A través de los años, diferentes autores han propuesto definiciones más complejas, coincidiendo en que la naturaleza endofítica permite colonizar tejidos internos de plantas sin producir signos visibles de enfermedad (Petrini 1991, Hallmann et al. 1997, Schulz y Boyle 2006).

El concepto de que los endófitos son microorganismos establecidos en los tejidos internos de la epidermis (Kloepper *et al.*, 1992) es actualmente expresada como la asociación biológica en que los microorganismos colonizan tejidos internos vivos de las plantas, sin causar ningún efecto negativo inmediato o daño aparente a la planta (Bacon y White, 2000).

Las primeras evidencias de asociación entre microorganismos endófitos y plantas, se originaron de observaciones en tejidos y hojas fosilizadas, lo que soporta la inferencia de que la asociación planta-endófito pudo haber ocurrido junto con la aparición de las primeras plantas en la tierra (Strobel, 2003).

Como resultado de esa larga asociación es posible que algunos de estos microorganismos endófitos hayan adquirido un sistema genético para transferir información desde la planta hospedera a ellos, o viceversa. Este posiblemente sería un mecanismo rápido y seguro de adaptación a diferentes ambientes y a la planta hospedera, a ejemplo de rutas bioquímicas que resultan en la producción de compuestos químicos y metabolitos secundarios en las plantas asociadas a los endófitos (Germaine, *et al.*, 2004; Tsavkelova *et al.*, 2007).

Se documenta, además, el potencial de estos organismos como agentes controladores de patógenos (Carrol 1988). Este fenómeno de biocontrol se presenta debido a que los endofíticos pueden establecer una relación mutualista con la planta desde su interior, mediante la cual le confieren protección contra factores bióticos y abióticos adversos (Carrol 1990, Schulz y Boyle 2006).

Para considerar un microorganismo endofítico como potencial agente de biocontrol se requieren ciertas características. En primer lugar, que no sea patógeno de plantas, hombres o animales. Debe tener una elevada capacidad de colonización y reproducción en los tejidos internos después de su inoculación en las plantas, ya que una

población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora presente en la planta (Schippers et al. 1987, Weller 1988, Lugtenberg y Dekkers 1999). Además, que tenga capacidad de reducir o suprimir eficientemente la población de nematodos por debajo del nivel crítico. También es muy importante que tenga la capacidad de reproducirse abundantemente en condiciones in vitro para asegurar su reproducción y conservación a nivel comercial; además, debe ser de fácil aplicación (Cook 1993, Hernández y Escalona 2003).

2.2.3 MECANISMOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO EN LAS PLANTAS

En el suelo se encuentran tanto microorganismos deletéreos como benéficos para las plantas. Los saprófitos benéficos de una amplia diversidad de grupos microbiales, son capaces de promover el crecimiento y la sanidad de las plantas. En estos grupos se encuentran los descomponedores de materia orgánica, las PGPRs y los hongos y bacterias antagonistas de patógenos de la raíz (Barea *et al.*, 2005).

Muchas rizobacterias y rizohongos promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas debido, entre otros factores, a la producción de ácidos orgánicos, la solubilización de fosfato, la solubilización de sales insolubles de zinc, la fijación asimbiótica de nitrógeno, el incremento de la nodulación simbiótica de leguminosas por rizobios que fijan N₂ y a la protección indirecta de la planta contra patógenos, debido a sus efectos antagonistas o a la liberación de antibióticos (Kloepper *et al.*, 1991; Wall, 2001; Pal *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2009). Algunos géneros que contienen miembros con estas actividades, incluyen *Streptomyces*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Mortierella*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, entre otros (Hoffland *et al.*, 2004; Ping, 2004; Barea *et al.*, 2005). Generalmente este tipo de microorganismos actúan en tres formas diferentes: sintetizan compuestos particulares para las plantas, facilitan la absorción de ciertos nutrientes del suelo y disminuyen o previenen los problemas de enfermedades en las plantas (Hayat *et al.*, 2010).

Se han propuesto mecanismos directos e indirectos en la promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas por parte de los microorganismos. Los mecanismos indirectos sobresalientes incluyen la prevención de efectos deletéreos de organismos fitopatógenos del suelo mediante la producción de sideróforos y la síntesis de antibióticos; y la producción de ácido cianhídrico (HCN) y de enzimas como la *quitinasa* y la β -1-3 *glucanasa*, que degradan la pared celular de los hongos. Se denota que en este

tipo de mecanismos, el microorganismo libera algún metabolito que afecta otros componentes de la rizosfera, lo que estimula un mejor desarrollo de la planta (Kloepper *et al.*, 1991).

Por otro lado, los mecanismos directos incluyen la producción de metabolitos por parte de algunos PGPRs, los cuales estimulan el crecimiento vegetal y ocurren independientemente del resto de la población microbiana del suelo, indiferente del sustrato en que se encuentren. Entre los metabolitos producidos se conocen hormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico (Hayat *et al.*, 2010).

Las PGPRs tienen el potencial de contribuir a la promoción del crecimiento de las plantas en forma sostenible. Aislar e identificar estos y otros microorganismos del suelo como algunas especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* que combinan la capacidad de fijar nitrógeno con la producción de sustancias capaces de promover el crecimiento en las 12 plantas, podría incrementar significativamente la productividad de muchos cultivos en todo el mundo (Beneduzi y Passaglia, 2011).

2.2.4 PRINCIPALES GÉNEROS DE ENDÓFITOS

2.2.4.1 *Bacillus spp.*

El género *Bacillus* incluye una importante variedad de especies Gram-positivas, no patogénicas, con propiedades antagonistas. Son buenas secretoras de proteínas y metabolitos, fáciles de cultivar y altamente eficientes para el control de plagas y enfermedades (Berg y Hallmann 2006). Los mecanismos de acción de *Bacillus spp.* incluyen **competencia por espacio y nutrientes** (Handelsmann y Stabb 1996), antibiosis (Loeffler *et al.* 1986) e **inducción de resistencia** (Kloepper y Ryu 2006). Además, tienen comprobado efecto en la promoción de crecimiento de las plantas (Kloepper *et al.* 2004). La capacidad de *Bacillus spp.* de formar esporas que sobreviven y permanecen metabólicamente activas bajo condiciones adversas (Rodgers 1989), las hace apropiadas para la formulación de productos viables y estables para el control biológico. *B. subtilis* es **uno de los más eficientes agentes de biocontrol**, el cual exhibe actividad antagonista contra varios hongos y bacterias patogénicos.

Este antagonismo se ha atribuido a la producción de antibióticos y a la capacidad de colonización en la planta (Loeffler *et al.*, 1986, McKeen *et al.*, 1986, Bochow y Gantcheva 1995).

Otros productos comercialmente disponibles son: a) *Bacillus subtilis* cepas GB03 y MBI 600, ampliamente utilizadas para el biocontrol de Rhizoctonia, Fusarium, Alternaria y Aspergillus spp. b) *Bacillus cereus* BP01, utilizada para la promoción de crecimiento en el cultivo de algodón y c) *Bacillus licheniformis* cepa SB3086, antagonista de gran cantidad de hongos fitopatógenos (Haas y Défago 2005, EPA 2007). En Cuba, la determinación de la actividad nematocida de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3 y su posterior extensión a las áreas agrícolas, fundamentalmente en plátano y banano, ha constituido una importante alternativa de control biológico contra *R. similis* y *M. incognita* (Fernández *et al.*, 2003), permitiendo un significativo ahorro de divisas al disminuir las importaciones de plaguicidas, además de incidir en la protección del medio ambiente. El empleo de la cepa LBT-3 como nematocida biológico ha sido introducido en la práctica productiva, fundamentalmente en la provincia de Camagüey, donde se trataron con este nematocida biológico entre 1997 y el año 2001, un total de 6.790 hectáreas de plátano y banano (Mena *et al.*, 2003).

2.2.4.2 *Pseudomonas* spp.

Las rizobacterias del género *Pseudomonas* han sido estudiadas como importantes **agentes de biocontrol por su capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos patógenos**, como bacterias, hongos, nematodos y virus, mismos que podrían llegar a reducir considerablemente las cosechas en los cultivos establecidos tanto en invernadero como en campo. Estos organismos ejercen ciertos mecanismos de acción antagonista que involucran la producción de compuestos bacterianos, como sideróforos, ácido cianhídrico (HCN) y antibióticos (Loper 1988, Hamdan *et al.*, 1991, Mazzola *et al.*, 1992, Thomashow y Weller 1995, Haas y Défago 2005, Berg y Hallmann 2006). Además, se ha comprobado que en algunos casos inducen un sistema de resistencia en las plantas que hace que puedan tolerar el ataque de diversos patógenos del suelo (Weller y Cooke 1983, Kloepper y Ryu 2006).

Con relación a la producción de antibióticos, *P. fluorescens* y *P. putida* tienen la capacidad de sintetizar algunos compuestos que causan la muerte de aquellos microorganismos que entren en contacto con ellas (Hamdan *et al.*, 1991). Los sideróforos son producidos por muchos microorganismos para capturar hierro en la rizosfera en condiciones limitantes de este elemento y le dan a *Pseudomonas* la capacidad de tener

actividad fungistática y bacteriostática cuando el hierro es bajo (Loper 1988, Haas y Défago 2005). *P. putida* produce pseudobactina la cual es un tipo de sideróforo que incrementa el antagonismo de *F. oxysporum* no patogénico contra el *F. oxysporum* patogénico, ya que hace a esta raza patogénica más sensitiva a la competencia por glucosa (Alabouvette y Couteaudier 1992).

En cuanto al control de nematodos, cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* han demostrado actividad antagonista contra *Radopholus similis* y *Meloidogyne spp.* en banano, maíz y tomate (Becker *et al.*, 1988, Aalten *et al.*, 1998). Un aislamiento endofítico de *P. aeruginosa* produjo compuestos tóxicos in vitro que resultó en alta mortalidad de los estadios juveniles de *M. javanica* (Siddiqui y Ehteshamul-Haque 2001). Asimismo, el compuesto 2,4- diacetylpholoroglucinol producido por *P. fluorescens* redujo la eclosión de huevos de *M. javanica* (Siddiqui y Shaukat 2003). Núñez (2006) encontró que aislamientos endofíticos de **Pseudomonas spp.** redujeron significativamente la población de *R. similis* en plantas de banano bajo condiciones de invernadero, en comparación con plantas no tratadas.

La promoción de crecimiento en las plantas inoculadas con rizobacterias ocurre por varios factores; uno de ellos es la síntesis de ciertas sustancias reguladoras de crecimiento, como giberelinas, citocininas y auxinas, las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, aumentando así la cantidad de raíces en las plantas.

Esto favorece la capacidad de absorción de agua y nutrimentos, permitiendo que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas (Lugtenberg y Dekkers 1999, Hernández y Escalona 2003, Vessey 2003, Berg y Hallmann 2006). Los mecanismos involucrados en este proceso incluyen la fijación de nitrógeno, solubilización del fósforo y la producción de fitohormonas (Kloepper *et al.*, 1991). Por ejemplo, las *Pseudomonas spp.* al solubilizar algunos elementos poco móviles del suelo, como el fósforo, mejoran el ingreso de este macronutriente hacia la planta, lo que se traduce en una mayor producción de biomasa.

Otras especies, como *Rhizobium sp.* y *Bradyrhizobium sp.*, aumentan el aporte de nitrógeno, influyendo directamente en el crecimiento, desarrollo y rendimiento. Además, ciertos metabolitos secundarios, que funcionan como antagonistas de microorganismos perjudiciales, permiten que las plantas se desarrollen en un ambiente idóneo libre de patógenos (Thomashow y Weller 1996, Lugtenberg y Dekkers 1999, Berg y Hallmann 2006).

Estas rizobacterias, que pertenecen mayormente al grupo de *Pseudomonas* y *Bacillus*, son antagonistas de importantes patógenos de la raíz en muchos cultivos de

importancia económica (Schroth y Hancock 1982, Hallmann y Berg 2006). Bajo condiciones de invernadero, su aplicación ha generado prometedores resultados en vegetales, frutas y plantas ornamentales. Por otra parte, poblaciones endofíticas, tanto de *Pseudomonas* como de *Bacillus*, aisladas de tejidos internos de banano, han evidenciado un gran potencial como agentes biológicos de control de *Radopholus similis* en condiciones de invernadero (Núñez, 2006). En cuanto a condiciones de campo, algunos aislamientos han demostrado eficacia y consistencia como agentes de biocontrol y actualmente se reproducen a nivel comercial, especialmente *Bacillus* (Mena *et al.*, 2003, Hass y Défago 2005).

Debido al abuso de los agentes químicos como herramienta para el control, como antes se explicó, ante la necesidad de cambio, se establece la opción del control biológico, “La microbiota endófito” definido por (Sikora *et al.*, 2007), como organismos que viven dentro de tejido vegetal con efecto neutral, benéfico o en detrimento del hospedero. (Rodríguez, 1997) explica que en todas las plantas vasculares estudiadas hasta el presente, se encuentran comunidades de endófitos, los cuales están ampliamente diseminados en la naturaleza.

Estos endófitos, han sido estudiados beneficiando a la planta en la absorción de nutrientes, protección al ataque de plagas y enfermedades, la cual, ha promovido la búsqueda y desarrollo de investigación para identificar microorganismos actualmente utilizado comercialmente para el control de enfermedades (Backman, 2008).

Además, se ha demostrado que tienen el potencial para eliminar los contaminantes del suelo mediante la mejora de la fitorremediación y puede jugar un papel en la fertilidad del suelo mediante solubilización de fosfato y la fijación de nitrógeno. Existe un interés creciente en el desarrollo de las potenciales aplicaciones biotecnológicas de endófitos para mejorar la fitorremediación y la producción sostenible de cultivos no alimentarios para la producción de biomasa y biocombustibles. (Ryan *et al.*, 2007).

El uso de agentes antagonistas para el control de enfermedades causadas por fitopatógenos, destaca entre las alternativas más prometedoras al uso indiscriminado de plaguicidas en la agricultura, convirtiéndose en una herramienta emergente de control biológico.

Las investigaciones están dirigidas a la búsqueda de estos microorganismos en la sección de la filosfera y la rizosfera de las plantas, lográndose mayores desarrollos para el control biológico a patógenos del suelo con respecto a los que afectan la parte aérea. (Melgarejo y De Cal, 2006).

Diferentes antagonistas están disponibles en el mercado o en proceso de desarrollo y registro para proteger tomate y otros vegetales contra *Botrytis cinerea* (Whipps y Davis, 2000; Elad y Steaward, 2004; Utkhede y Mathur, 2006). Por otra parte, (Lee *et al.*, 2006) evaluaron distintas formulaciones de *Bacillus licheniformis* como biocontrol de *B. cinerea* afectando el tomate, logrando control de 90,5% bajo condiciones de producción.

La tendencia actual de biocontrol de fitopatógenos, es el uso combinado de varios antagonistas. (Junior *et al.*, 2006), reportaron bajos valores de severidad del patógeno *Phytophthora infestans* cuando combinaron antagonistas aisladas de la sección epífita en sistemas de producción convencional y orgánico de tomate (*Aspergillus* sp., *Cellulomonas flavigena.*, *Candida* sp., y *Cryptococcus* sp.) y el *Bacillus cereus* de la sección de la rizosfera. (Le Floch *et al.*, 2009), combinaron los hongos antagonistas *Fusarium oxysporum* cepa Fo47, *Trichoderma harzianum* y *Pythium oligandrum*, indican que éstos protegieron a la planta de tomate contra infecciones de la hoja causada por *Botrytis cinerea*.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 INTRODUCCIÓN

Para la realización de este estudio hemos evaluado la capacidad promotora de crecimiento vegetal de seis endófitos que han sido extraídos de la filosfera sobre la rizosfera de plantas de pimiento, los cuales los hemos aplicado sobre semillas, bajo condiciones de semillero.

De un modo más concreto se ha evaluado la influencia de los distintos tratamientos sobre el desarrollo de:

- Nuevo sistema radicular
- Parte aérea.
- Determinación de los distintos índices de calidad de plántulas:
 - Índice tallo raíz (ITR) (Iverson, 1984)
 - Índice de calidad de Dickson (QI) (Dickson et al., 1960)
 - Índice de esbeltez de Schmidt-Vogt (IE) (Schmid-Vogt, 1980)

La realización del estudio se ha dividido en dos partes, una parte que ha sido realizada en el laboratorio, para la cual se ha empleado el laboratorio de Producción Vegetal de la Escuela Superior de Ingeniería de Universidad de Almería, donde se han realizado todas las operaciones previas y posteriores al trabajo, como diseño de los tratamientos, preparación de disoluciones, toma de datos (pesos secos de las distintas partes de las plántulas, diámetro medio del tallo etc.).

La otra parte ha sido de campo donde se han empleado las instalaciones de un semillero comercial de la provincia de Almería, concretamente el semillero Vitalplant S.L, localizado en Paraje Balsa Seca situado en el Término Municipal de San Isidro, Níjar, en este semillero se han realizado la inoculación, así como todas las operaciones que se derivan de la producción de plántulas de pimiento (*Capsicum annum L.*) perteneciente a la familia de las Solanáceas.

El tratamiento que se evaluó en éste trabajo es la aplicación de seis bacterias endófitas no identificadas y además de otro tratamiento sin inóculo que fue considerado como el testigo.

En cada tratamiento se utilizaron dos bandejas de poliestireno (700 cc de volumen) y otras dos para el testigo (T 20), son seis tratamientos de aislados bacterianos (BP-62, BP-63, BP-65, BP-69, BP-70, BP-71, BP-74), cada bandeja que consta de 96 alveolos en dos partes, con lo cual se obtendrán 4 repeticiones (R1, R2, R3, R4) para cada tratamiento en concreto, que corresponde a 48 alveolos por repetición (gráfica 4).



Gráfica 4: Diseño del ensayo

La codificación por tratamiento:

TRATAMIENTO	AISLADO
- Tratamiento 9	- Aislado BP-62
- Tratamiento 10	- Aislado BT-63
- Tratamiento 11	- Aislado BP-65
- Tratamiento 12	- Aislado BP-69
- Tratamiento 13	- Aislado BP-70
- Tratamiento 14	- Aislado BP-71
- Tratamiento 15	- Aislado BP- 74
- Tratamiento 20	- Testigo

Tabla 3: Codificación de los tratamientos

3.2 MULTIPLICACIÓN Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Este ensayo se realizó en el laboratorio de Protección Vegetal ubicado en la Escuela Superior Ingeniería de la UAL en la primavera del año 2011. Los aislados evaluados procedían de los aislamientos microbianos de la filosfera de plantas de pimiento, procedentes de sistemas de producción ecológica. Esta selección y evaluación de aislados microbianos están enmarcadas en un proyecto de tesis doctoral. De ellos fueron seleccionados 49 aislados, los cuales mostraron antagonismo a los principales patógenos evaluados, como es: *Botrytis cinerea* y *Phytophthora parasitica*.

Estos aislados bacterianos fueron conservados en micro tubos a -20°C , los cuales fueron descongelados a temperatura ambiente. Éstos se homogenizaron empleando un agitador vortex y posteriormente, se extrajo una muestra con un asa de metal estéril y se esparció en estrías, extendiéndola en cuatro direcciones perpendiculares sobre la superficie de las placas de Petri, con medio selectivo Triptona Soya Agar (TSA) (4 g TSA, Cultimed®, 18 g agar, 1 l agua destilada). Una vez sembradas, las placas se incubaron a 25°C durante 24 horas. Transcurrido este periodo, con palillos de dientes estéril, se tomaron muestras de cada colonia de bacterias y se colocaron en bote de orina conteniendo 60 ml de caldo nutritivo (8 g caldo nutritivo, Cultimed®, 1 l agua destilada), con el propósito de promover el crecimiento de las bacterias. Los botes se colocaron en un agitador orbital a 120 rpm durante 48 horas a 26°C .

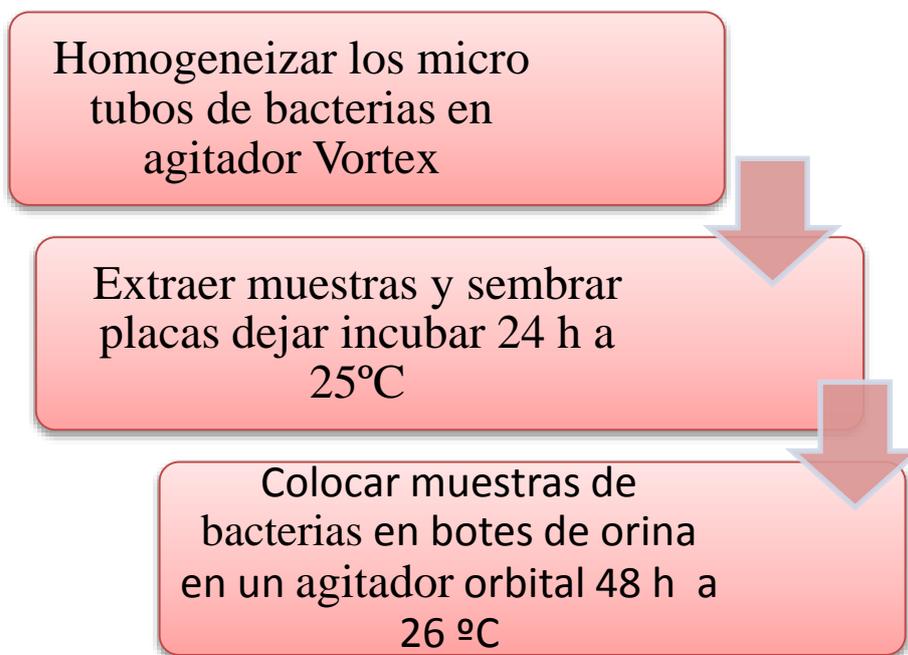


Grafico 5: Esquema de preparación de aislados bacterianos

3.3 INOCULACIÓN EN SEMILLERO

Una vez preparados todos los inóculos en laboratorio se procedió a realizar las siguientes prácticas: en un frasco con una capacidad de 500 ml, se le añadieron 200 ml del medio PD (0.2% glucosa) y colonias de cada uno de los seis aislados bacterianos previamente seleccionados de ensayos *in vitro*. Estos fueron incubados a 25°C por 150 rpm en un agitador orbital por 36 horas.



Gráfica 6: Esquema preparación de inóculos

Las bandejas de turba, las suministró el semillero preparadas para proceder a la inoculación (**figura 7**).



Figura 7: Bandejas de turba antes de la inoculación

Las semillas fueron sembradas en una mezcla de turba comercial y cubiertas con vermiculita. Después de dos días en un cuarto de germinación con unas condiciones de humedad relativa del 95 % y una temperatura 25°C.

A continuación las semillas fueron inoculadas directamente en el semillero con 5 ml de la suspensión con las bacterias correspondiente a cada aislado, el tratamiento testigo fue regada con 5 ml de agua destilada estéril (**figura 8**).



Figura 8: Inoculación en las bandejas

El procedimiento fue manualmente vertiendo el inóculo alveolo por alveolo, menos en el testigo. Se ha optado por esta técnica, por ser la que más se asemeja a la utilizada en el semillero para incorporar el fertilizante a las plántulas; es decir disuelta en agua.

Una vez finalizada la inoculación, las bandejas se extendieron de manera aleatoria por el semillero (**figura 9**).



Figura 9: Colocación de bandejas en semillero

Las bandejas se mantuvieron durante 49 días en el semillero bajo sus condiciones, durante este periodo se le realizó todo el manejo adecuado para alcanzar un buen desarrollo de las plántulas como son fertilización, riego, manejo de plagas y enfermedades, entre otros. (**figura 10**).



Figura 10: Detalle de plántulas de pimiento

Una vez transcurrido ese tiempo las plántulas estaban listas para ser trasladadas al laboratorio para su evaluación.



Figura 11: Plántulas de pimiento tras su traslado a las instalaciones de la Universidad de Almería

3.4 EVALUACION DEL ESTADO Y CALIDAD DE LAS PLANTULAS.

A las plantas se les realizó el seguimiento y las labores culturales como son el riego, el control de plagas y enfermedades habituales del semillero durante 25- 30 días, hasta la fecha de trasplante. Estas condiciones no han sido reveladas para la realización del presente estudio ya que son propiedad del semillero.

En las medidas realizadas en el cálculo de la calidad pre-trasplante de las plántulas de pimiento, no se han visto afectadas todas las plántulas, si no que se han escogido 8 plántulas al azar de cada repetición, tomando de cada bandeja las plántulas que se encuentran siempre en la misma disposición.

Posteriormente se realizaron las mediciones correspondientes a los parámetros morfológicos siguientes de las plantas (**figura 12**):

- Número de hojas por planta
- Longitud del tallo desde la base al ápice
- Diámetro del tallo a la altura de los cotiledones
- Peso seco del tallo, raíz y hojas de cada planta

➤ Área foliar



Figura 12: Plántulas para ser evaluadas

1.- Número de hojas por planta:

A la hora de cuantificar el número de hojas se ha prestado especial atención a la distinción entre hojas verdaderas y cotiledones. No se consideraron como hojas aquellas que no estaban desplegadas casi en su totalidad.

Se separan las hojas del tallo cortando mediante bisturí por la axila de las hojas dejándole a éstas su peciolo y se procede al recuento de hojas, incluidos los dos cotiledones.



Figura 13: Separación de las hojas del tallo mediante bisturí

2.- Longitud del tallo:

Usando el mismo criterio para todos los tallos la longitud se mide desde la superficie del substrato hasta el ápice del tallo.

Se realizan las medidas con una cinta métrica con una precisión en la medida de ± 1 mm.



Figura 14: Medida de la longitud del tallo

3.- Diámetro del tallo:

Se mide por debajo de los cotiledones con un calibre electrónico, con una precisión de 0,05 mm.

Tomando dos diámetros perpendiculares, uno paralelo a los cotiledones y otros perpendicular a éstos. Posteriormente, se calculó el diámetro medio del tallo.



Figura 15: Medida del diámetro del tallo

4.- Área foliar:

Para calcular el área foliar de cada plántula primero se separan las partes aéreas de las raíces con ayuda de una tijera. Se cogen los folíolos de cada plántula, y se colocan en una tabla de color blanco que contiene una regla de 30 cm de forma que cada fila de hojas correspondía a una plántula. También se procuró colocar las hojas de forma que estuvieran lo más planas posibles para evitar errores.

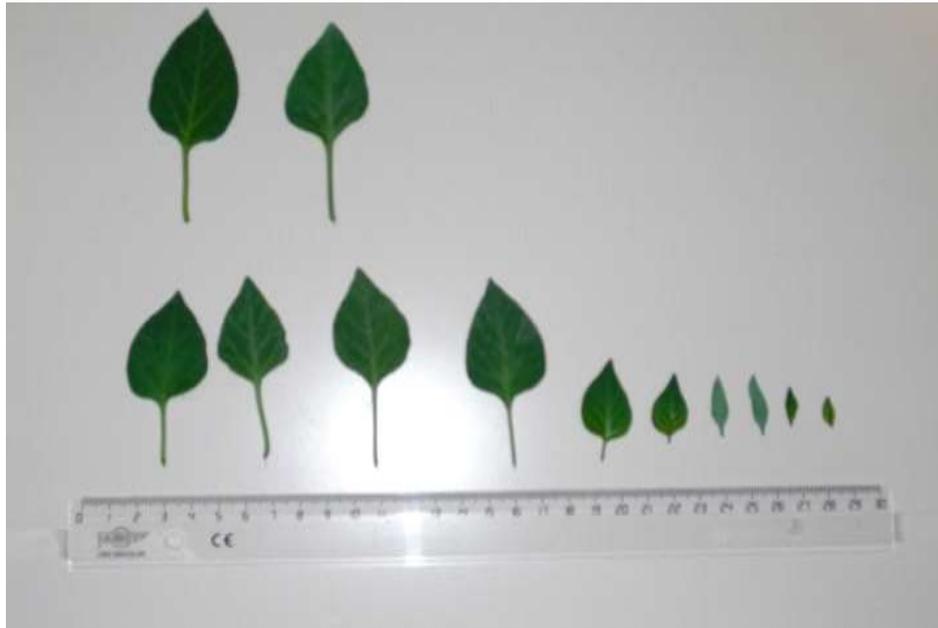


Figura 16: Hojas colocadas para ser fotografiadas

Una vez colocadas se introduce la tabla en el armario para ser fotografiada mediante una cámara digital.

La foto pasa al ordenador donde mediante el programa informático (WinDIAS 3.1.lnk), calculamos el área foliar de cada plántula. (**figura 17**). Las fotografías se analizaron con el programa, el cual identificaba las diferentes tonalidades de verde de las hojas, midiendo la superficie total que ocupaban las hojas de cada plántula. Sobre el tablón se colocó un elemento de longitud conocida, para que el programa identificara a qué escala estaba hecha la fotografía de las hojas.

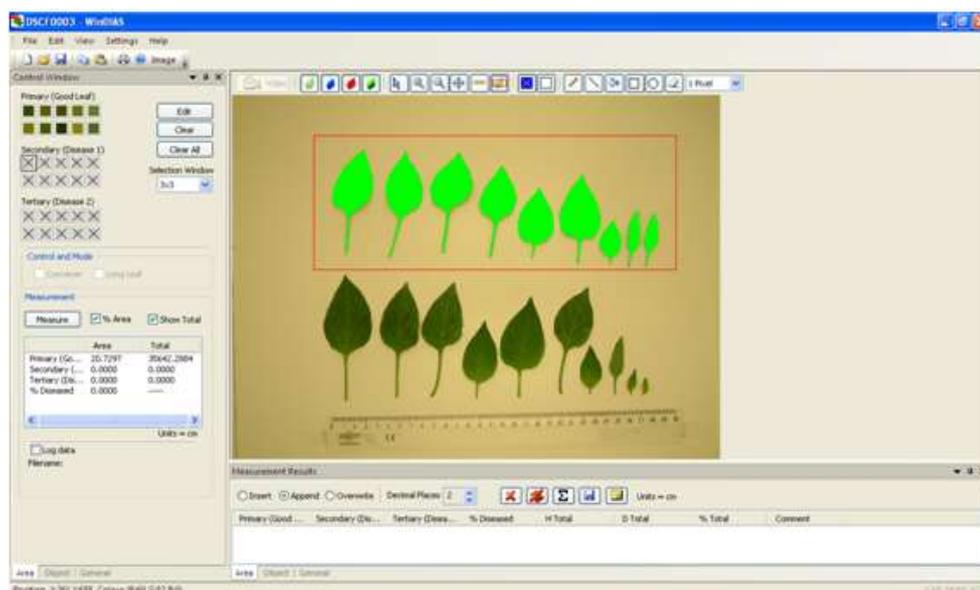


Figura 17: Calculamos el área foliar con el programa WinDIAS 3.1 Ink

5.- Peso seco:

Después de haber medido los distintos parámetros se introducen las raíces que habían sido lavadas para eliminar restos de sustrato y escurridas, así como las hojas y tallos en unos sobres (Figura 18).



Figura 18: Introducción de las raíces lavadas y secas en sobres

A continuación, estos sobres fueron introducidos en la estufa a 70 °C durante 48 horas.



Figura 19: Sobres colocados dentro de la estufa

Para así posteriormente proceder al pesado de las raíces tallos y hojas secas en la balanza de precisión (COBOS, CB-Completo), para calcular la materia seca total por plántula y por sus distintas partes (**figura 20**).





Figura 20: Balanza de precisión para las medidas de las diferentes partes

Con todos estos parámetros se ha procedido, a la evaluación y cálculo de la calidad pre-trasplante de las plántulas en los distintos tratamientos, para ello se han utilizado distintos índices ya desarrollados que a continuación se comentan.

Índice tallo raíz (ITR) (Iverson, 1984)

Indica que la mejor calidad de una planta se obtiene cuando la parte aérea es relativamente pequeña y la raíz es grande, lo que puede garantizar una mayor supervivencia ya que se evita que la transpiración exceda la capacidad de absorción (May, 1984).

$$\text{ITR} = \frac{\text{peso seco del tallo (g)}}{\text{peso seco de la raíz (g)}}$$

Índice de calidad de Dickson (QI) (Dickson et al., 1960)

Combina la información de los dos índices anteriores y los ajusta por el efecto del tamaño de la planta, por lo que un aumento en el índice representa a plantas de mejor calidad, lo cual implica que, por una parte, el desarrollo de la planta es grande y que, al mismo tiempo, las fracciones aérea y radical están equilibradas (Oliet, 2000).

$$QI = \frac{\text{peso seco total (g)}}{\frac{\text{altura tallo (mm)}}{\text{diámetro tallo (mm)}} + \frac{\text{peso seco tallo (g)}}{\text{peso seco raíces (g)}}}$$

Índice de esbeltez de Schmidt-Vogt (IE) (Schmidt- Vogt, 1980)

Relaciona la resistencia de la planta con la capacidad fotosintética de la misma. Valores altos de este índice serán indicativos de una planta más robusta y con menos probabilidad de daño de algún tipo en el trasplante (Toral, 1997).

$$IE = \frac{\text{diámetro tallo (mm)}}{\frac{\text{altura tallo (cm)}}{10} + 2}$$

Área foliar específica (AFE).

Es el cociente entre el área foliar (cm²) y la materia seca de las hojas (g). Según Masson et al., (1991) valores bajos de este índice, implica la existencia de plantas que resisten mejor el choque del trasplante.

$$AFE = \frac{\text{área foliar (cm}^2\text{)}}{\text{materia seca de las hojas(g)}}$$

Coficiente de área foliar (CAF).

Es el cociente entre el área foliar (cm²) y la materia seca total (g). Masson e t a l. , (1991), recomiendan la utilización del AFE para calcular la calidad pre-trasplante, de igual modo se recomiendan valores bajos.

$$\text{CAF} = \frac{\text{área foliar (cm}^2\text{)}}{\text{materia seca total (g)}}$$

Índice de calidad de plántula hortícola pretrasplante (ICHP)

Este índice intenta compilar toda la información que relaciona los parámetros deseados o buscados en plántulas al pre-trasplante dedicadas a la producción hortícola en intensivo. Se considera que valores altos de este índice muestran plántulas con menor estrés al trasplante, por este motivo aparece en el numerador, el peso seco aéreo (tallo más superficie foliar), peso seco raíz y calibre; por el contrario, penaliza una alta área foliar. De igual modo en el denominador aparece el peso seco de la raíz, esta relación nos garantiza que exista un sistema radical bien desarrollado que permita que la transpiración no exceda la capacidad de absorción. La razón existente entre el calibre y el tallo, garantiza plántulas con un sistema vascular bien desarrollado evitando plántulas etioladas.

$$\text{ICHP} = \frac{\text{peso seco parte aérea (g)}}{\text{área foliar (cm}^2\text{)}} \times \frac{\text{peso seco raíz (g)}}{\text{peso seco total (g)}} \times \frac{\text{calibre (cm)}}{\text{altura del tallo (cm)}}$$

Análisis estadístico.

Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV para Windows. Los análisis de varianzas y las separaciones de medias de los tratamientos fueron comparando utilizando la prueba de Mínima Diferencia Significativa (MDS) a $P \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

La inoculación de cultivos agrícolas con organismos PGPRs puede reportar grandes beneficios, bien por aumento de producción, así como por mejora de la salud de la planta frente a determinados estreses, ya sea de tipo biótico o abiótico.

El objetivo de este proyecto consiste en la evaluación de la capacidad bioestimulante, de aislados bacterianos en un semillero, en comparación con un tratamiento testigo, donde no se hace aplicación alguna, y que sirve para contrastar los resultados obtenidos.

Los tratamientos evaluados fueron seis, más el tratamiento testigo, correspondiéndole las siguientes codificaciones: BP-62, BP-63, BP-65, BP-69, BP-70, BP-71, BP-74 y el testigo, con cuatro repeticiones por cada uno (R1, R2, R3, R4). Cada repetición constaba de 48 alveolos, requiriéndose 2 bandejas de 96 alveolos por cada tratamiento.

Los parámetros morfológicos que se analizaron fueron los siguientes:

- Longitud del tallo
- Diámetro del tallo
- Número de hojas
- Peso seco de las hojas
- Peso seco de las raíces
- Peso seco del tallo
- Peso seco total
- Área foliar

Los índices de calidad foliar evaluados fueron:

- Área foliar específica (AFE)
- Coeficiente de área foliar (CAF)

Los índices de calidad pre-trasplante estudiados son:

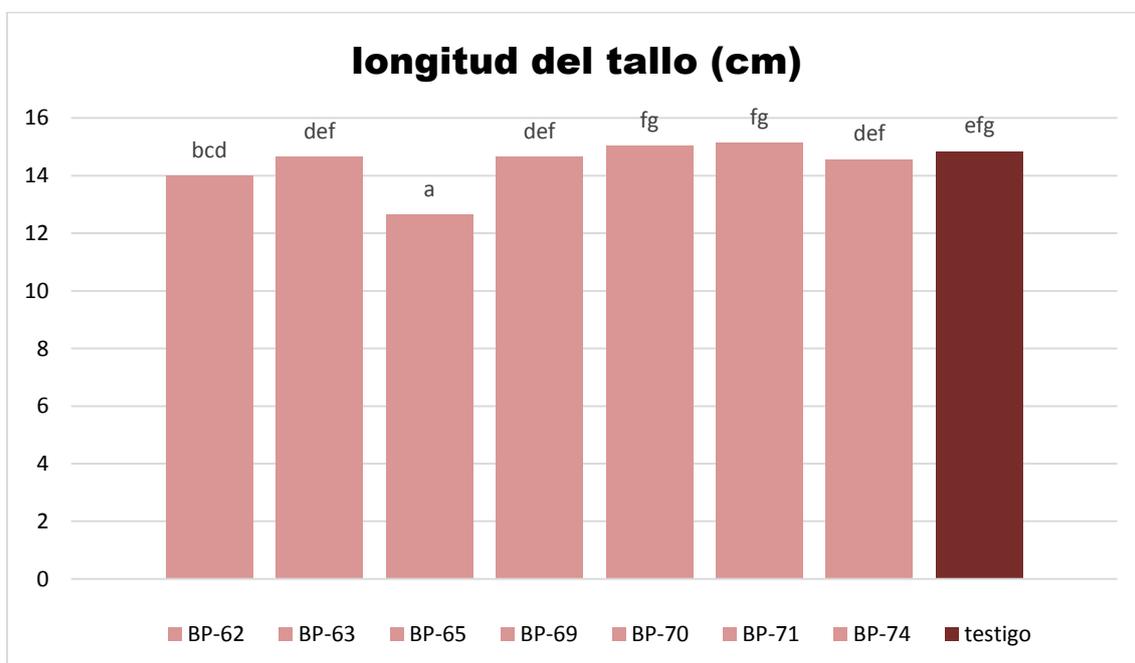
- Índice de tallo-raíz (ITR)
- Índice de esbeltez de Schmidt-Vogt (IE)
- Índice de calidad de Dickson (QI)

4.1.1 Evaluación de la influencia de los diferentes tratamientos sobre la parte aérea y sistema radical de las plántulas de pimiento:

4.1.1.2 Parámetros morfológicos

1.-Longitud del tallo

A continuación se presenta los resultados obtenidos para el parámetro longitud del tallo (gráfica 7).

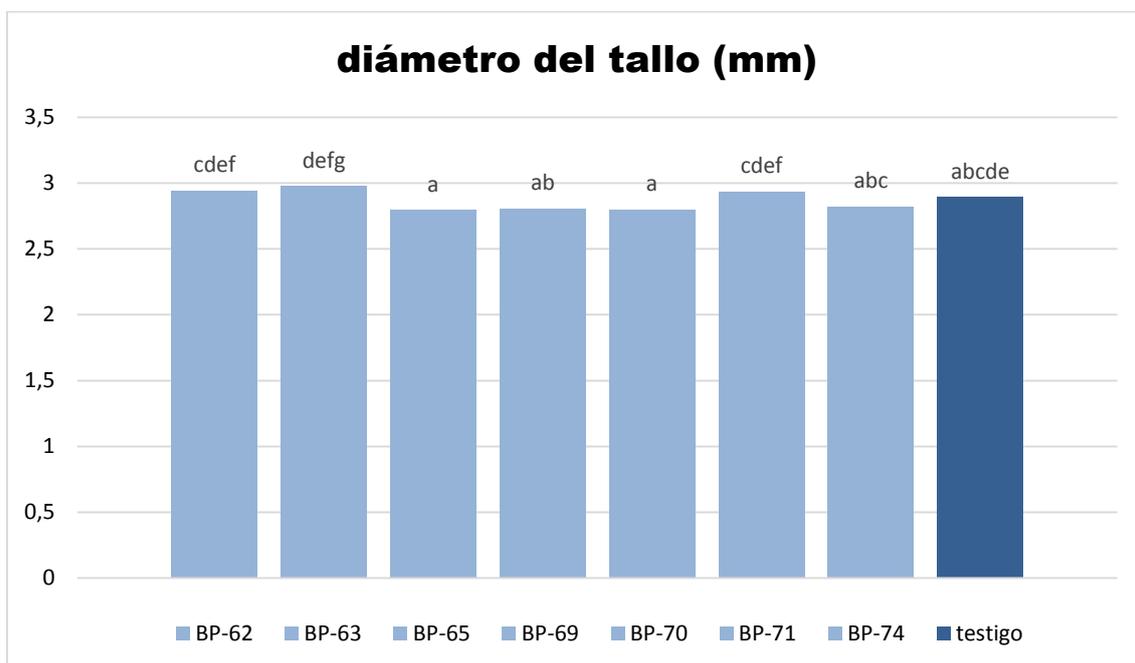


Gráfica 7: Alturas medias de las plántulas (cm) inoculadas con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar. (ANOVA, LSD al 95%).

Se puede observar en la gráfica 5 que las plántulas pertenecientes al tratamiento BP-70 y BP-71 son las que tienen mayor altura aunque no difiere mucho del testigo ni de las otras, la única que difiere bastante del resto es el tratamiento BP-65 que queda muy por debajo en valor de las demás.

2.- Diámetro del tallo

Los resultados obtenidos para el diámetro del tallo son los siguientes (**gráfica 8**).

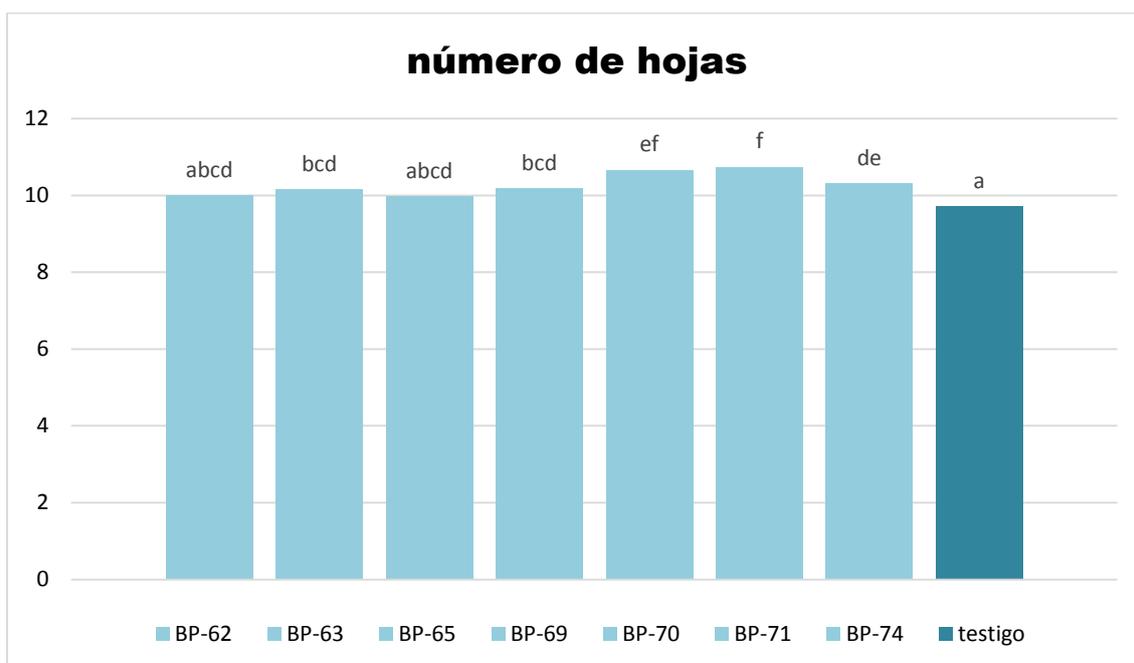


Gráfica 8: Calibre medio del tallo por plántula (mm) inoculada con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar. (ANOVA, LSD al 95%).

En esta gráfica se observa como el tratamiento BP-63 tiene un diámetro mayor que los demás tratamientos, seguida del tratamiento BP-62 y BP-71 que tienen valores próximos, esos tres tratamientos tienen valores superiores al testigo, pero sin presentar diferencias significativas, sin embargo los demás tratamientos codificados como BP-65, BP-69, BP-70 y BP-74 tienen valores por debajo de las plántulas sin tratar, igualmente sin diferencias significativas.

3.- Número de hojas

A continuación se muestran los resultados obtenidos en cuanto al número de hojas (gráfica 9).

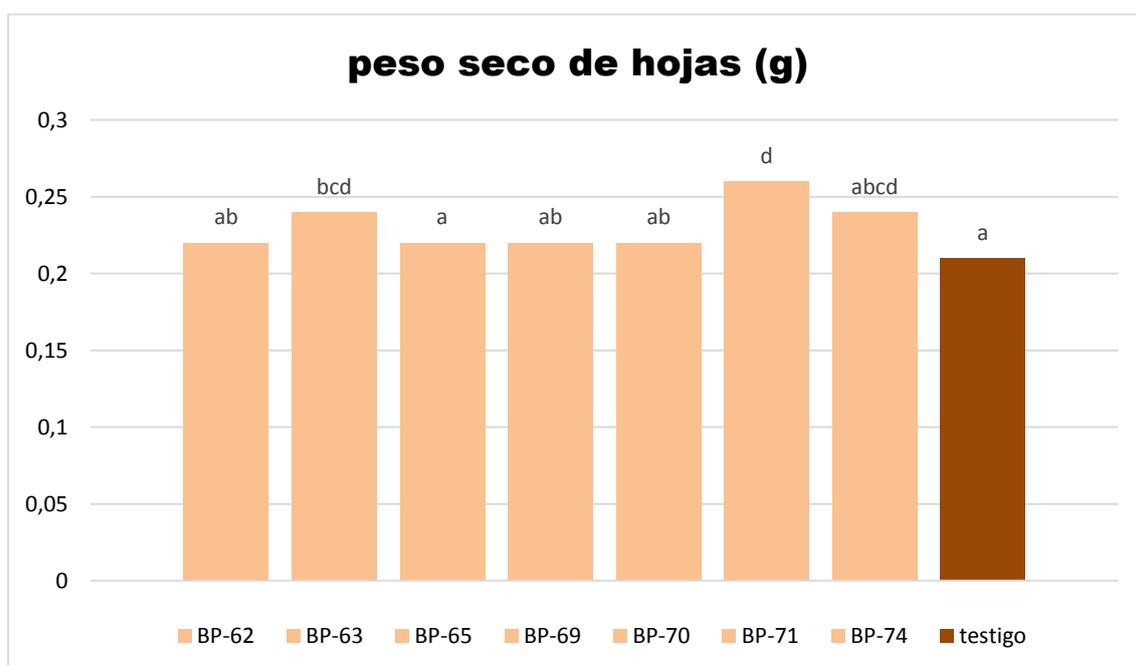


Gráfica 9: Número medio de hojas verdaderas por plántula inoculada con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar. (ANOVA, LSD al 95%).

En cuanto al número de hojas podemos decir que todos los tratamientos BP-62, BP-63, BP-65, BP-69, BP-70, BP-71 y BP-74 tienen valores más elevados que las plántulas del testigo siendo entre ellos dos de los tratamientos BP-70 y BP-71 los que indican mayor número de hojas. Todos los tratamientos han mostrado diferencias significativas salvo los tratamientos BP-62 y BP-65.

4.- Peso seco de las hojas

Los resultados obtenidos para el peso seco de hojas son los mostrados a continuación en la **gráfica 10**.

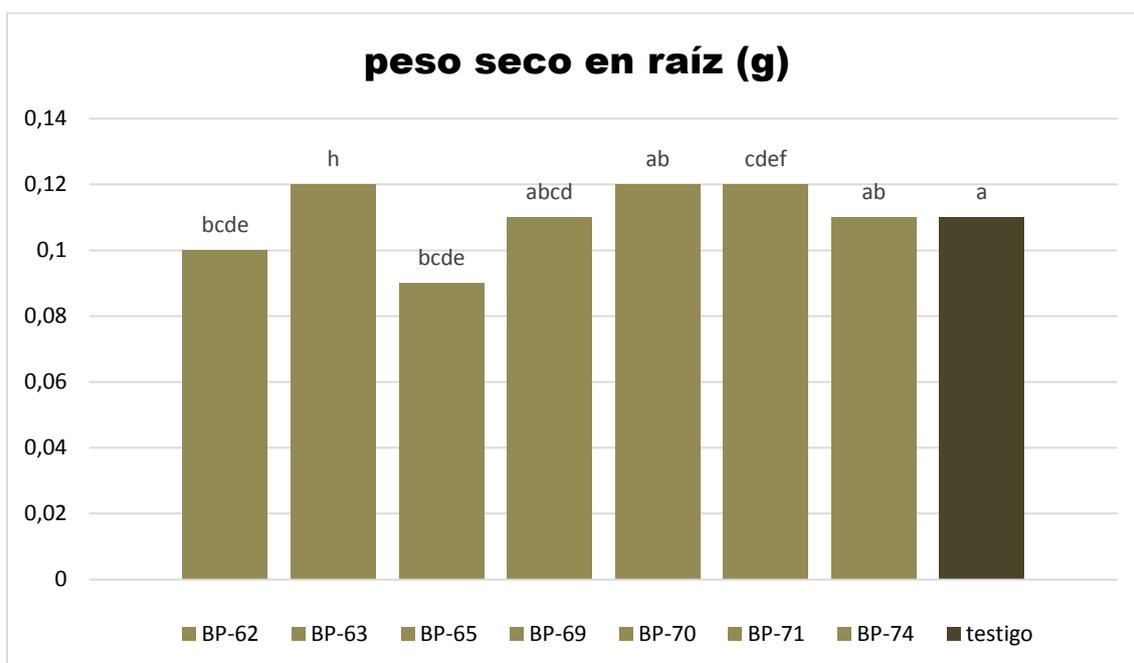


Gráfica 10: Peso seco medio de hojas verdaderas por plántula inoculados con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar. (ANOVA, LSD al 95%).

En este caso se ve claramente como las plántulas tratadas con el tratamiento BP-71 se diferencian del resto de forma notable, como podemos observar en la **gráfica 10**, y la mayor diferencia que se observa es con las plántulas testigo. Los demás tratamientos se encuentran con pesos mayores que las plántulas testigo pero aun así siguen siendo menores que ese tratamiento BP-71.

5.- Peso seco de la raíz

A continuación en la **gráfica 11** se muestran los valores obtenidos para los pesos secos de raíz.

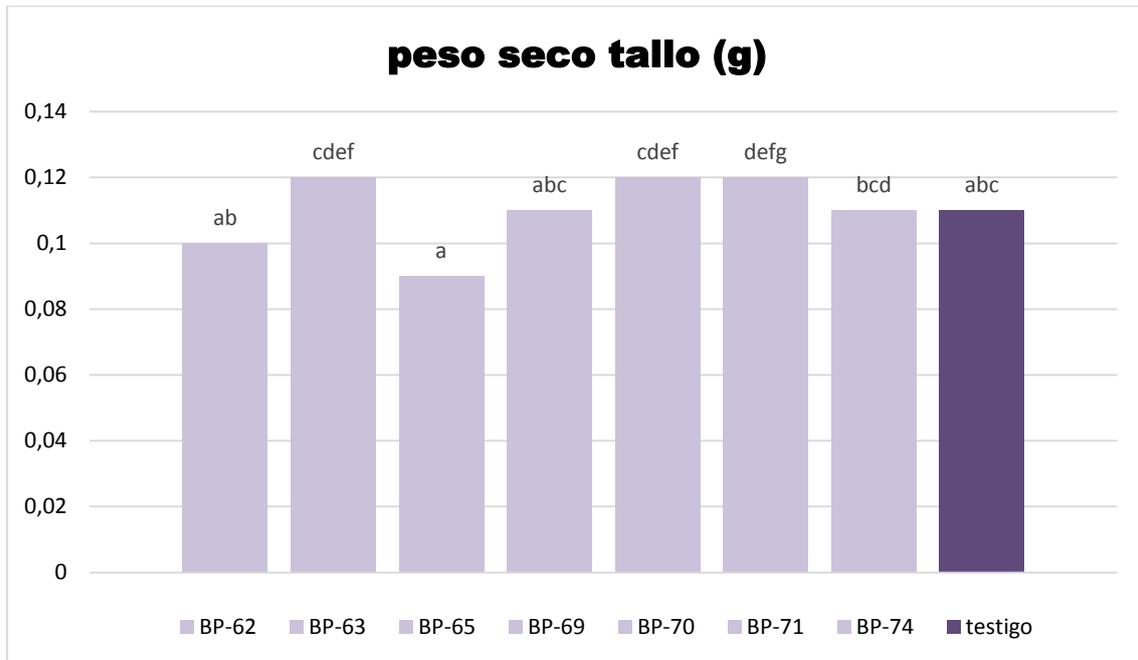


Gráfica 11: Peso seco medio de raíz por plántula expresado en gramos inoculada con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar. (ANOVA, LSD al 95%).

Como podemos observar en esta **gráfica 11** las diferencias más significativas corresponden al tratamiento BP-65, el cual se ve más desfavorecido teniendo los valores más bajos en cuanto a peso en raíz seca quedando muy por debajo del tratamiento testigo y de los demás tratamientos. En cuanto a los tratamientos BP-63, BP-70 y BP-71 tienen valores similares entre ellos siendo los de mayor valor con respecto a los otros.

6.- Peso seco del tallo

A continuación se muestran los datos obtenidos para el valor de peso seco del tallo en gramos (**gráfica 12**).

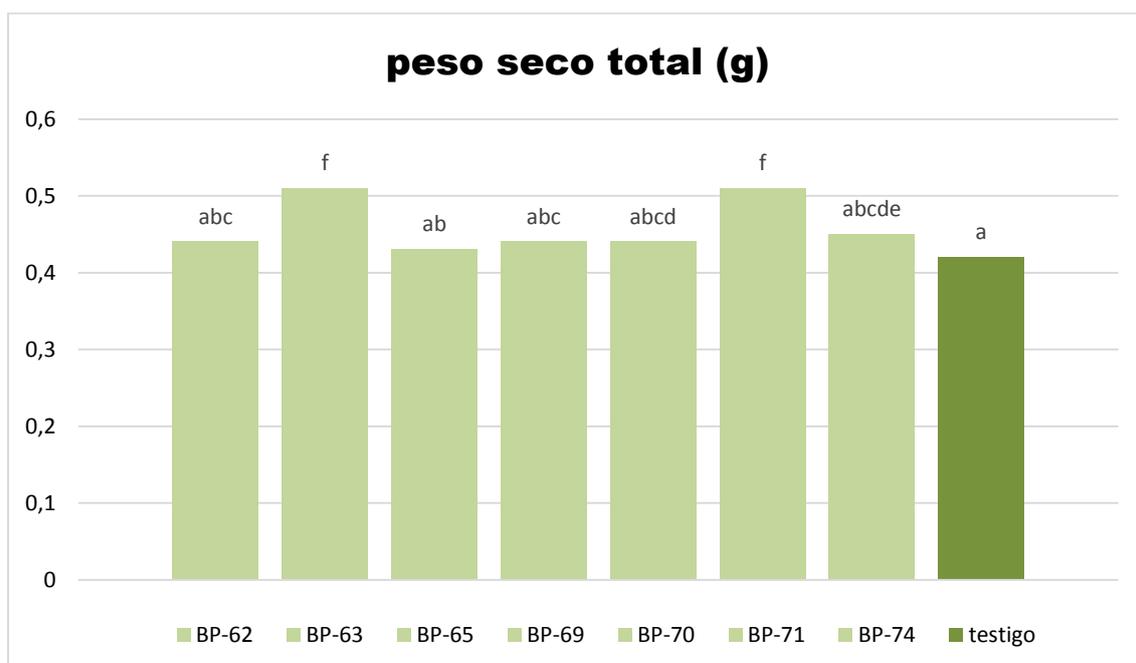


Gráfica 12: Peso seco medio de tallo por plántula expresado en gramos inoculada con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar. (ANOVA, LSD al 95%).

Como podemos observar en la **gráfica 12** los tratamientos BP-62 y BP-65 han obtenido valores muy bajos que quedan por debajo de los valores del testigo. Los tratamientos que se han visto favorecidos aumentando su peso seco en tallo son el BP-63, BP-70 y BP-71 estos tienen valores superiores al testigo. Los demás tratamientos tienen valores similares al testigo.

7.- Peso seco total

A continuación se muestran los resultados obtenidos para el peso seco total en gramos (**gráfica 13**).

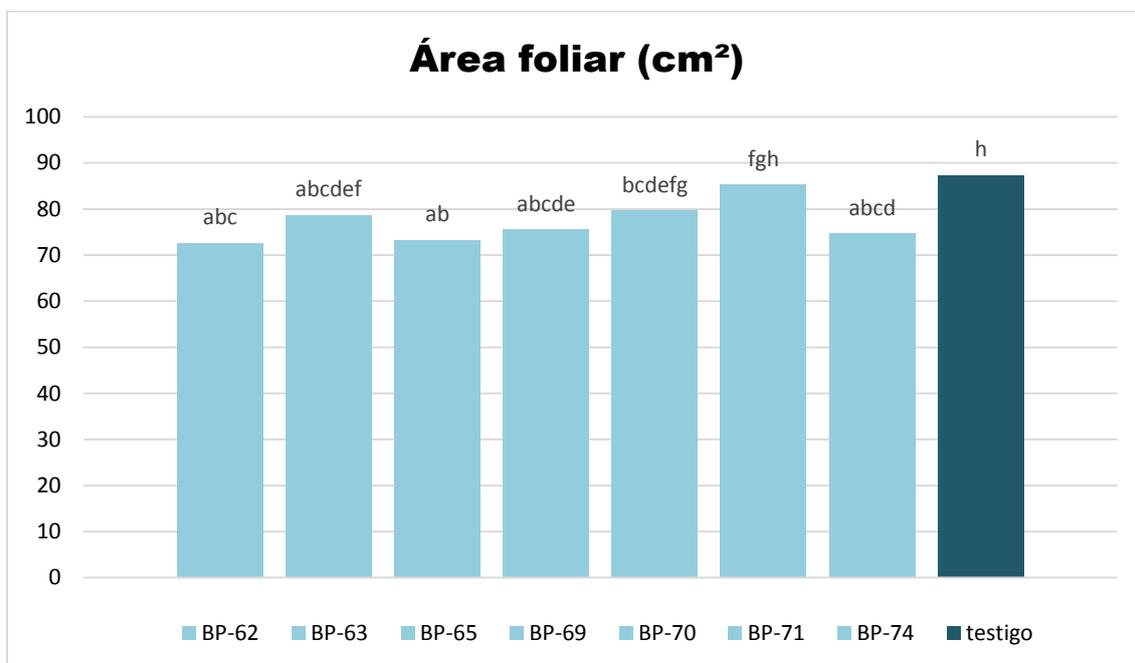


Gráfica 13: Peso seco medio total por plántula expresado en gramos inoculada con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar. (ANOVA, LSD al 95%).

En esta **gráfica 13** vamos a evaluar los resultados del peso seco total compuesto por todas las partes de la planta incluidas las raíces también. Como se observa en esta **gráfica 13** los tratamientos con el que se ha obtenido un mayor peso seco total son con el tratamiento BP-63 y con el tratamiento BP-71, siendo sus valores mayores que el resto de los tratamientos y teniendo los menores valores de peso seco total las plántulas testigo.

8.- Área foliar

A continuación se muestran los resultados obtenidos en cuanto al área foliar siendo los siguientes (**gráfica 14**).



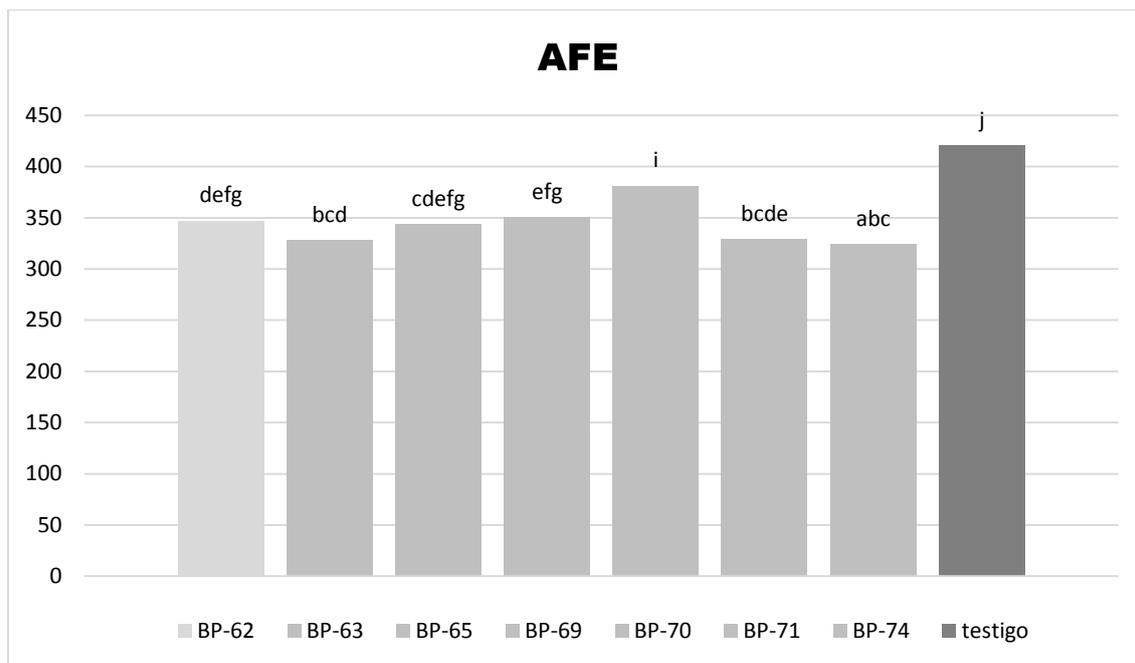
Gráfica 14: Área foliar media por plántula expresada en cm² inoculados con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar. (ANOVA, LSD al 95%).

En esta **gráfica 14** se observa como esta vez son las plántulas sin tratar es decir las correspondientes al testigo las que tienen mayor valor en cuanto al área foliar todos los demás tratamientos tienen valores por debajo del testigo, siendo el tratamiento BP-71 el único de todos que tiene valores próximos al de las plántulas testigo, aunque sin diferencias significativas.

4.1.1.3 Índices de calidad foliar

10.- Área foliar específica

Los valores que se muestran a continuación son en cuanto al área foliar específica (gráfica 15).

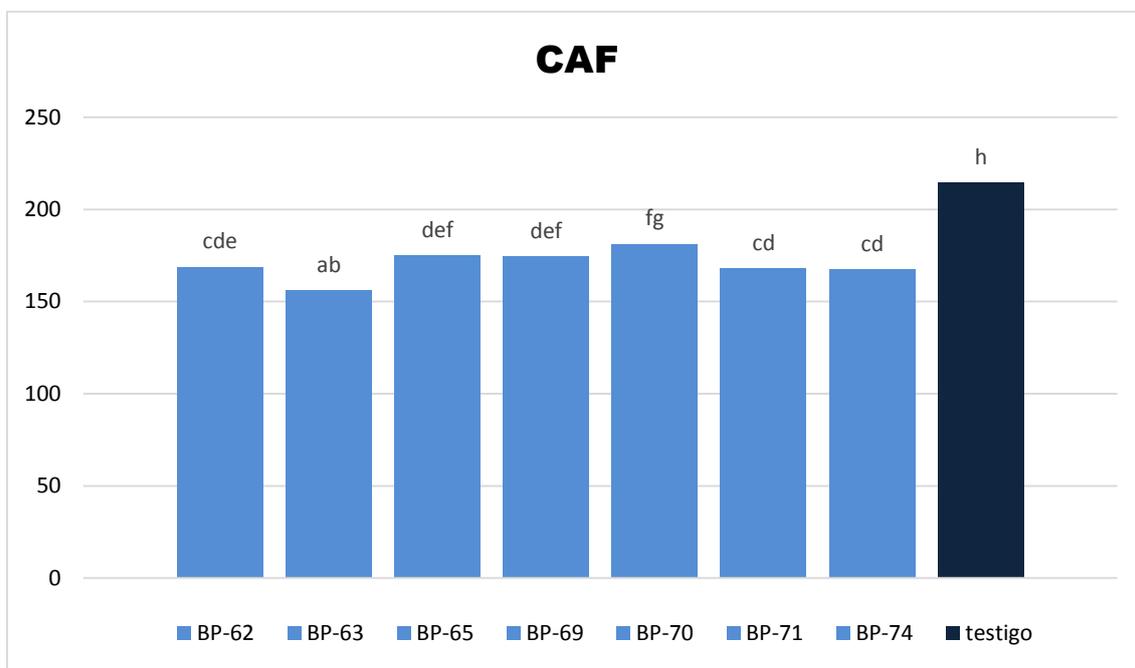


Gráfica 15: Área foliar específica del ensayo expresada en cm²/g inoculados con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar. (ANOVA, LSD al 95%).

El área foliar específica (AFE), es el cociente que relaciona el área foliar con el peso seco de las hojas. Masson *et al.*, (1991) sugiere valores bajos para este índice, los cuales se manifiesta en plántulas que resisten mejor el estrés del trasplante. En la **gráfica 15** se observa que los valores para este índice es mayor en las plantas testigo comparadas a los otros tratamientos evaluados, existiendo diferencia significativa (ANOVA LSD 95%) para el tratamiento BP-74 siendo el más efectivo.

11.- Coeficiente de Área foliar

Los resultados obtenidos a continuación (**gráfica 16**) muestran los datos para el cociente de área foliar.



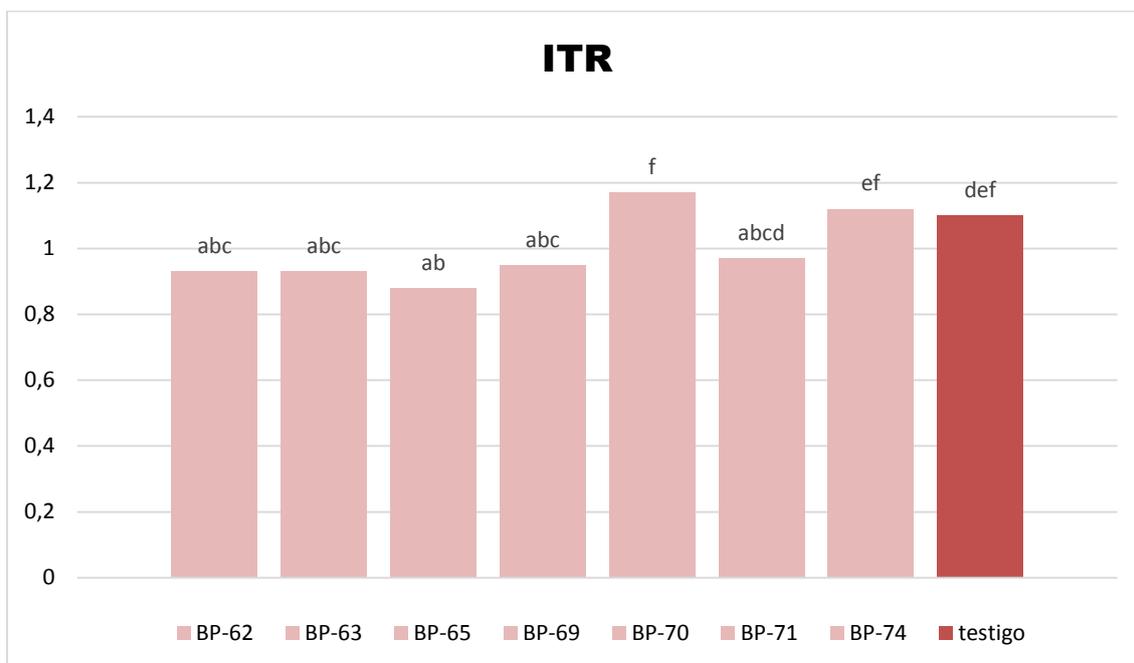
Gráfica 16: Coeficiente de área foliar del ensayo expresada en cm²/g inoculados con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar. (ANOVA, LSD al 95%).

El coeficiente de área foliar (CAF) corresponde al cociente que relaciona el área foliar con el peso seco total de las plántulas. De igual manera como se aplica para el AFE, se sugieren valores bajos para éste índice. En esta **gráfica 16** se observa como todos los valores están muy por debajo de los de las plántulas sin tratamiento siendo el más significativo (ANOVA, LSD al 95%) el tratamiento BP-63.

4.1.1.4 Índices de calidad pre-trasplante

12.- Índice tallo-raíz

A continuación se muestran los valores para el índice de tallo-raíz (**gráfica 17**).

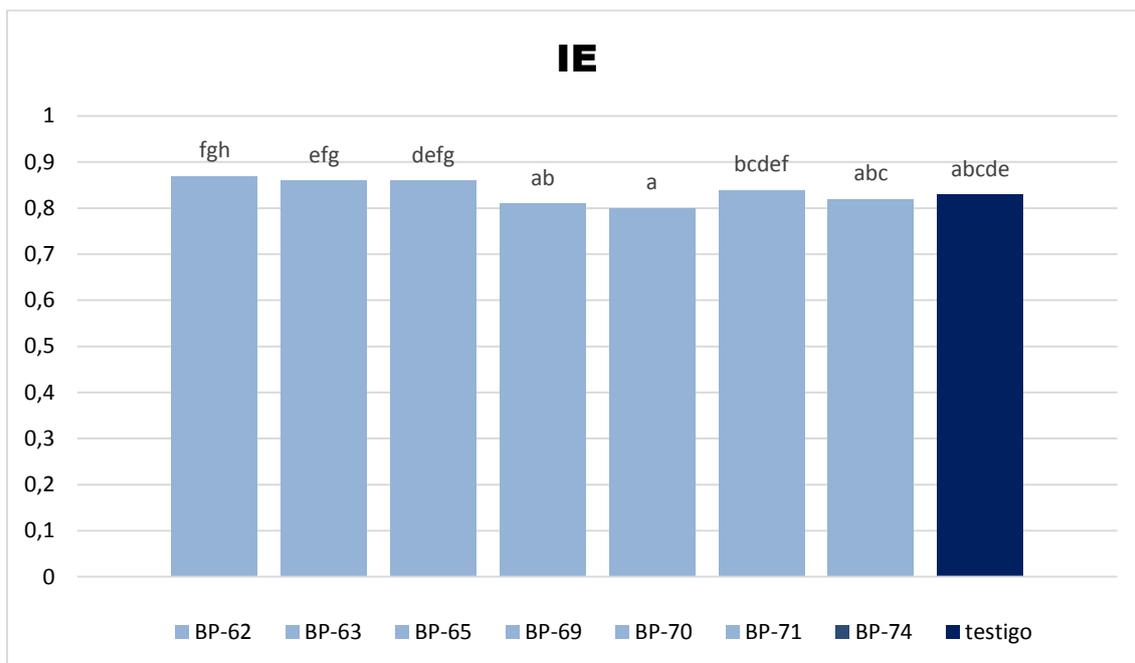


Gráfica 17: Índice de tallo raíz del ensayo expresada en conidias/ml inoculados con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar. (ANOVA, LSD al 95%).

El Índice tallo raíz indica que la mejor calidad de una planta se obtiene cuando la parte aérea es relativamente pequeña y la raíz es grande, lo que puede garantizar una mayor supervivencia ya que se evita que la transpiración exceda la capacidad de absorción (May, 1984). Según esto podemos decir que los mejores valores de calidad para el (ITR), son valores bajos, que se alcanzan en el tratamiento BP-65 el cual garantiza mayor supervivencia de las plantas próximos a él se encuentran los demás tratamientos siendo los de peor resultados las plántulas sin tratar y las del tratamiento BP-70 y BP-74 como indica la **gráfica 17**.

13.- Índice de esbeltez de Schmidt-Vogt

A continuación se muestran los resultados obtenidos para el índice de esbeltez de Schmidt-Vogt (**gráfica 18**).



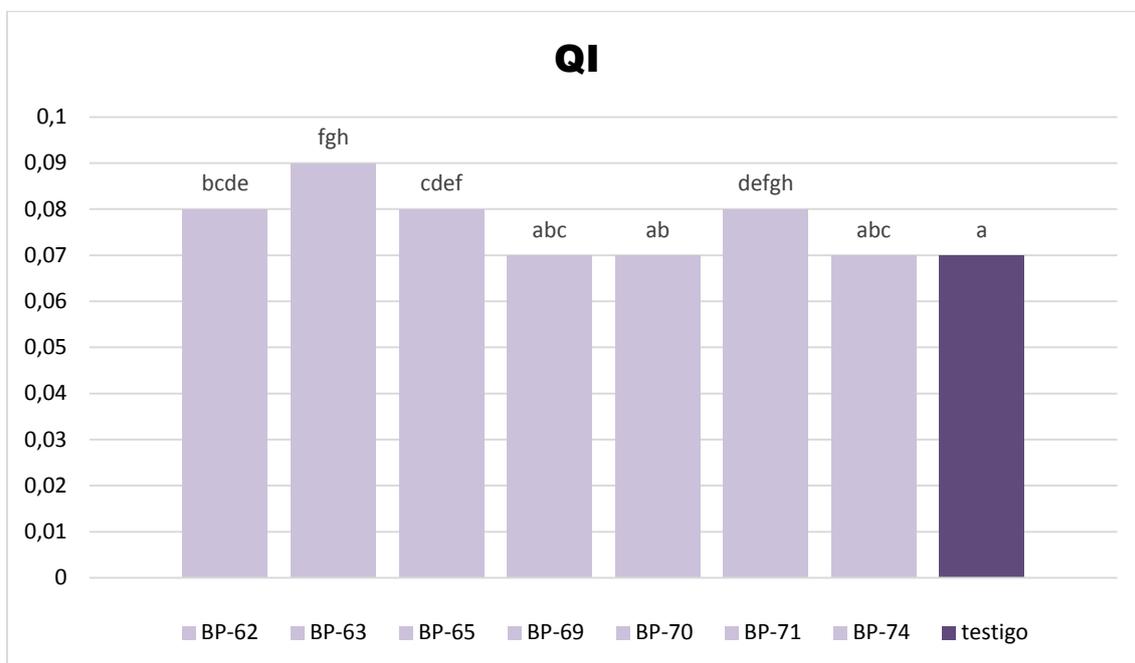
Gráfica 18: Índice de esbeltez del ensayo expresada en conidias/ml inoculados con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar. (ANOVA, LSD al 95%).

El índice de Esbeltez relaciona la resistencia de la planta con la capacidad fotosintética de la misma. Valores altos de este índice serán indicativos de una planta más robusta y con menos probabilidad de daño de algún tipo en el trasplante (Torral, 1997). Como observamos en la **gráfica 18** no hay diferencias significativas entre los tratamientos aunque teniendo una leve diferencia el tratamiento BP-62 sobre los demás.

14.- Índice de calidad de Dickson

Este índice combina la información de los dos índices anteriores y los ajusta por el efecto del tamaño de la planta, por lo que un aumento en el índice representa a las plantas de mejor calidad, lo cual implica que, por una parte, el desarrollo de la planta es

grande y que, al mismo tiempo, las fracciones aérea y radical están equilibradas (Oliet, 2000). Según esto consideramos que el mejor tratamiento es el BP-63 con diferencias significativas sobre el testigo.



Grafica 19: Índice de calidad de Dickson del ensayo expresada en conidias/ml inoculados con los distintos tratamientos comparados con el testigo sin tratar (ANOVAS, LSD al 95%).

4.2 DISCUSIÓN

Para dar una valoración general sobre los parámetros más relevantes de los datos obtenidos, trabajos previos señalan que una plántula que presente raíces vigorosas, mayor altura, mejor grosor del tallo, mayor número de hojas y área foliar, pueden ser los más deseables y recomendables para el trasplante. En este sentido, “la manera de evaluar que una planta va a resistir mejor o peor el estrés, está relacionada con el contenido de materia seca” (Herrera *et al*, 2009). Parece ser éste el mejor parámetro para evaluar la sensibilidad de la plántula y suele ocurrir que cuanto mayor es el contenido en materia seca más resistente es la planta al estrés (Herrera *et al*, 2009).

Según esto consideramos que los tratamientos codificados como BP-63 y BP-71 presentan en general los valores más altos en cuanto a peso en materia seca de cada una de las partes de las plántulas.

Comparando con el resto de parámetros: hojas, calibre y altura, parece razonable pensar que con mayor altura y número de hojas se tendrá una plántula de mejor calidad.

El tratamiento codificado como BP-71 sería el mejor tratamiento considerando los demás parámetros como longitud del tallo, diámetro del tallo y número de hojas. Estos parámetros en los otros tratamientos se mantienen en general, parecidos al testigo y en algunos casos, con valores inferiores a éste.

En cuanto a los índices correspondientes a calidad foliar: Área foliar específica (AFE) y Coeficiente de área foliar (CAF), son calculados mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{AFE} = \frac{\text{área foliar (cm}^2\text{)}}{\text{peso seco hojas (g)}}$$

$$\text{CAF} = \frac{\text{área foliar (cm}^2\text{)}}{\text{peso seco total (g)}}$$

El AFE recomienda que valores bajos de este índice, implica valores de materia seca altos en las hojas en relación a la superficie foliar, objetivo perseguido como anteriormente se ha explicado. Masson et al., (1991) descubrieron que para evaluar la resistencia de las plantas al estrés post-trasplante este es el índice que mejor se comporta ya que relaciona el área foliar con el peso seco de las hojas, encontrando que en pimiento, las plantas con bajo AFE resisten mejor el choque del trasplante. Todos los tratamientos obtuvieron un valor por debajo del valor de las plantas testigo, y siendo el tratamiento codificado como BP-74 el de menor valor.

En cuanto al CAF comprobamos que como ocurre con el AFE, todos los tratamientos están por debajo de los valores del testigo, siendo el que menor valor tiene de todos el tratamiento codificado como BP-63. Herrera (2009), considera que el AFE evalúa mejor la capacidad de la planta para resistir el choque de trasplante que el CAF.

Con respecto a los índices de calidad pre-trasplante: Índice tallo raíz (ITR), Índice de esbeltez de Schmidt-Vogt (IE), Índice de calidad de Dickson (QI):

El ITR indica que la mejor calidad de una planta se obtiene cuando la parte aérea es relativamente pequeña y la raíz es grande, lo que puede garantizar una mayor supervivencia ya que se evita que la transpiración exceda la capacidad de absorción, según May, (1984).

$$\text{ITR} = \frac{\text{peso seco del tallo (g)}}{\text{peso seco de la raíz (g)}}$$

Este índice por sí solo no puede considerarse en esta evaluación ya que inicialmente se desarrolló para plantas forestales, y aunque es de uso común para todas las plantas, no parece el más apropiado en este caso.

En cuanto a los valores obtenidos fueron todos los tratamientos menores obteniendo el valor más pequeño el BP-65, los tratamientos codificados como BP-70, BP-74 y el testigo tienen valores elevados.

El Índice de esbeltez de Schmidt- Vogt, (1980) relaciona la resistencia de la planta con la capacidad fotosintética de la misma. Valores altos de este índice serán indicativos de una planta más robusta y con menos probabilidad de daño de algún tipo en el trasplante. Toral (1997) calcula el índice de esbeltez mediante el cociente de la altura y el diámetro del tallo, para el que Thomson (1985), y Cibrian y Bello (2000) recomiendan valores bajos, no obstante en este caso, el cálculo se ha realizado según el índice de esbeltez propuesto por Schmidt-Vogt (1980), en el que se puede observar que se corresponde con la inversa del índice calculado por Toral multiplicado por un coeficiente, por lo que se deduce rápidamente que para este índice, los valores recomendados deben tener valores altos, y serán indicativos de una planta más robusta y con menos probabilidad de daño de algún tipo en el trasplante.

$$\text{IE} = \frac{\text{diámetro tallo (mm)}}{\frac{\text{altura tallo (mm)}}{10} + 2}$$

Al estudiar este parámetro los tratamientos que han obtenido mayores valores son los codificados como BP-62, BP-63, BP-65 y BP-71.

El Índice de calidad de Dickson combina la información de los dos índices anteriores y los ajusta por el efecto del tamaño de la planta, por lo que un aumento en el índice representa a plantas de mejor calidad, lo cual implica que, por una parte, el desarrollo de la planta es grande y que, al mismo tiempo, las fracciones aérea y radical están equilibradas (Oliet, 2000).

$$\text{QI} = \frac{\text{peso seco total (g)}}{\frac{\text{altura tallo (cm)}}{\text{diámetro tallo (mm)}} + \frac{\text{peso seco total (g)}}{\text{peso seco raices (g)}}}$$

Según esta fórmula, la altura y el peso seco de las plántulas afectan negativamente a la calidad pre-trasplante de las mismas. El índice de calidad de Dickson intenta combinar los dos índices anteriores, por lo que sigue suponiendo que existe una buena correlación entre el peso seco del tallo y el área foliar. Este índice fue desarrollado y actualmente se aplica para evaluar la calidad pretrasplante de plántulas forestales, más concretamente, los primeros cultivos sobre los que se evaluó fue sobre plántulas de *Picea glauca*, *Pinus strobus*, *Pinus resinosa*, árboles típicamente forestales, por lo que, queda justificado que, no es aplicable al menos en sentido literal, a plántulas de cultivos hortícolas intensivos.

Se observan valores notables superiores en las plántulas inoculadas con el tratamiento BP-63.

Debido a la dificultad de aplicación de estos índices a plántulas destinadas a cultivos hortícolas intensivos, y teniendo en cuenta el análisis realizado en esta discusión, se propone un índice con la siguiente expresión matemática:

15.- Índice de calidad hortícola al pre-trasplante.

$$\text{ICHP} = 10.000 * \frac{\text{peso seco parte aérea (g)}}{\text{área foliar (cm}^2\text{)}} * \frac{\text{peso seco raíz (g)}}{\text{peso seco total (g)}} * \frac{\text{calibre (cm)}}{\text{altura tallo (cm)}}$$

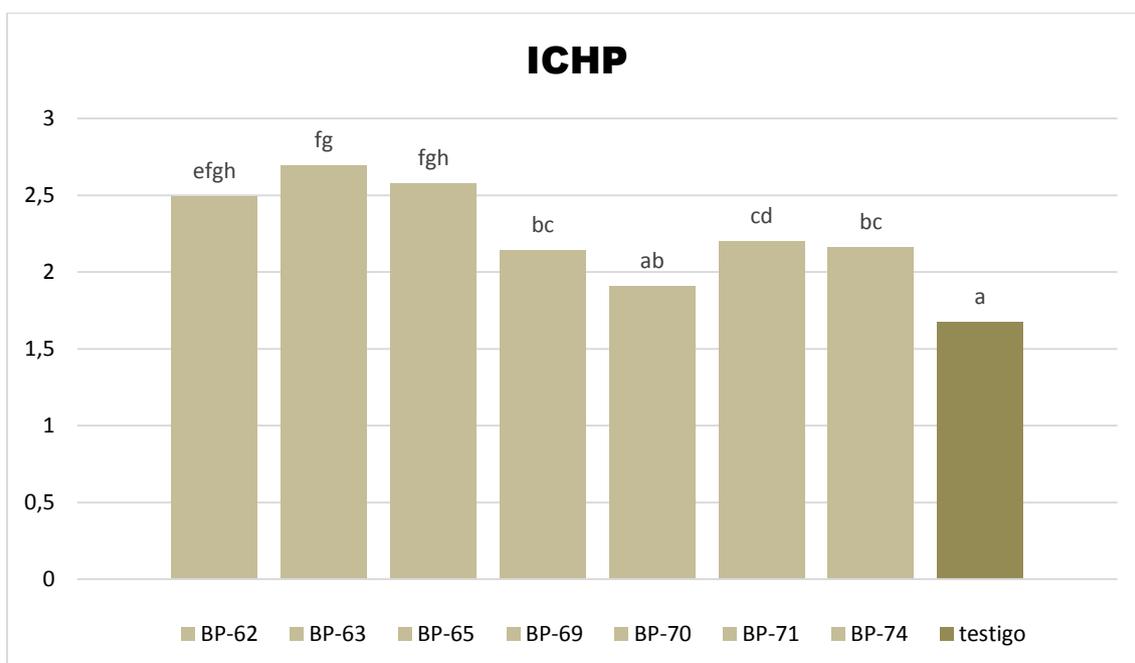
Por este motivo aparece en el numerador, el peso seco aéreo (tallo más superficie foliar), peso seco raíz y calibre; por el contrario, penaliza una alta área foliar por dos motivos:

- Plántulas con alta área foliar en un sistema tan confinado como es una bandeja multi-alveolada, presenta problemas de competición por la luz.
- Plántulas con alta área foliar, puede presentar problemas de deshidratación, por una excesiva transpiración.

De igual modo en el numerador aparece el peso seco de la raíz, esta relación nos garantiza que exista un sistema radicular bien desarrollado que permita que la transpiración no exceda la capacidad de absorción. La razón existente entre el calibre y el tallo, garantiza plántulas con un sistema vascular bien desarrollado evitando plántulas etioladas.

No se pretende justificar los resultados del trabajo únicamente con este índice, ya que se trata meramente de una propuesta en la que, en todo caso deberá ser estudiada su aplicabilidad.

Esta es la **gráfica 20** obtenida del índice de calidad hortícola al pre-trasplante para los diferentes tratamientos.



Gráfica 20: Índice de calidad hortícola al pre-trasplante (IHP), para el ensayo de pimiento inoculado con los distintos tratamientos medido en conidias/ml. Comparación con un testigo sin tratar (ANOVA, LSD 95%).

El índice de calidad hortícola pre-trasplante es superior en valor en todos los tratamientos comparados con el testigo siendo el tratamiento codificado como BP-63 el de valor superior a todos.

Según lo observado podemos concluir que según este índice el tratamiento BP-63 es el que mejor valor ha obtenido pero en los parámetros anteriores el tratamiento BP-71 obtuvo también muy buenos resultados. Debido a todo esto no se puede decir con claridad cuál de ambos tratamientos es el que mayor calidad aporta a la planta, ya que dependerá de la importancia que se le dé a cada índice a la hora de decidir que plántula es la que mejor se adaptará al trasplante.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1.- La aplicación de bacterias endófitas del pimiento en plántulas de pimiento ha favorecido en general, la obtención de una planta de mayor calidad, siendo los aislados más favorables las bacterias BP-71 y BP-63:

1a.- Teniendo en cuenta los índices de calidad foliar, los resultados obtenidos fueron satisfactorios, con lo cual las plantas resistirán mejor al trasplante, resultando ser más eficaz el tratamiento codificado como BP-63.

1b.- Para los índices de calidad pre-trasplante, la inoculación con los distintos tratamientos, garantiza una mayor supervivencia de las plántulas, una planta de mejor calidad y más robusta siendo el más efectivo de todos el tratamiento de aislados bacterianos codificado como BP-63 como las más significativas con valores superiores.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- **Aalten, PM; Vitour, D; Blanvillain, D; Gowen, SR; Sutra, L.** 1998. Effect of rhizosphere fluorescent *Pseudomonas* strains on plant-parasitic nematodes *Radopholus similis* and *Meloidogyne* spp. *Letters in Applied Microbiology* 27:357-361.
- **Alabouvette, C; Couteaudier, Y.** 1992. Biological control of *Fusarium* wilts with nonpathogenic fusaria. In Tjamos, EC; Papavizas, GC; Cook, R. eds. *Biological control of plant diseases: progress and challenges for the future*. New York, Plenum Press. p. 415-426.
- **Aguilar-Rincón, V. H., T. Corona Torres, P. López López, L. Latournerie Moreno, M. Ramírez Meraz, H. Villalón Mendoza y J. A. Aguilar Castillo.** 2010. *Los chiles de México y su distribución*. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN. Montecillo, Tex coco, Estado de México. 114 pp.
- **Aguirre-Medina, J. F., M. B. Irizar G., A. Durán P., O. A. Grajeda C., M. A. Peña R., C. Loredó O. y A. Gutiérrez B.** 2009. *Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México*. Tuxtla Chico, Chiapas, México, marzo de 2009. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Rosario Izapa. Pp. 5-31.
- **Backman,** 2008 *Introduction Endophytes: An emerging tool for biological control*. *Biological Control* 46, 1-3.
- **Bacon y White,** 2000. *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, New York Pages 487.
- **Baker, J.C. and Van Uffelen, J.A.** (1988). The effects of diurnal temperatura regimes on growth and yield of sweet pepper. Ed. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. Amsterdam.
- **Baker K.F., Cook R.J.** 1974. *Biological control of Plant pathogens*. Freeman. San Francisco, USA.

- **Barea J.M., Pozo M.J., Azcón R., and Azcón-Aguilar C.** 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot* 56(417): 1761-1778.
- **Bashan Y. and Holguin G.** 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem* 30: 1225-1228.
- **Becker, JO; Zavaleta-Mejia, E; Colbert, SF; Schroth, MN; Weinhold, AR; Hancock, JG; Van Gundy, SD.** 1988. Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. *Phytopathology* 78:1466-1469.
- **Beneduzi A. and Passaglia L.M.P.** 2011. Genetic and Phenotypic Diversity of Plant Growth Promoting Bacilli, 1-20 pp. *En: Maheshwari D.K. (Ed.). Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses.* Springer, NY.
- **Benítez, T., A.M. Rincón, M.C. Limón, A.C. Codón.** 2004 Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7, 249-260.
- **Berg, G; Hallmann, J.** 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacteria endophytes. In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. *Microbial root endophytes.* Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 53-69. (Soil Biology Vol. 9).
- **Bochow, H; Gantcheva, K.** 1995. Soil introductions of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent and its population and activity dynamic. *Acta Horticulturae* 382:164-172.
- **Bosland, P.W.** 1994. Chiles: history, cultivation, and uses. In: Charalambous, G. ed. *Spices, herbs and edible fungi.* Charalambous (ed). p. 347-366.
- **Camacho Ferre, F. Coordinador** (2003). *Técnicas de producción en cultivos protegidos.* Edt. Instituto de Estudios de Cajamar. Madrid.
- **Carrol, GC.** 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1):2-9.
- **Carrol, GC.** 1990. Fungal endophytes in vascular plants: Mycological research opportunities in Japan. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 31:103-116.

- **Cibrián T. y Bello L.,** 2000. Calidad de planta. En: Memorias del Primer Congreso Nacional de Reforestación. SEMAR-NAP-Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.

- **Cook R.J., Baker K.F.** 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Third printing Ed. APS Pres, St. Paul, Minnesota.

- **Cook, R.J.** 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 31: 53-80.

- **Couteaudier Y., Louvet J., Alabouvette C.** 1987. Les problèmes pathologiques en culture hors sol. En: Les cultures hors sol. Second Ed. INRA Publications, Versailles. pp. 321-332.

- **Djian-Caporalino, Lefebvre, V., Sage-Daubèze, A. M., Palloix, A,** 2006. Capsicum. In: Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement. Vol. 3. Vegetable Crops. R J Singh (ed.). CRC Press. Boca Raton, FL. pp: 185-243.

- **Elad, Y.; Stewart, A.,** 2004. Microbial control of *Botrytis* spp. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- **EPA (Environmental Protection Agency, US).** 2007. Biopesticide ingredient and product lists.

- **FAOSTAT** faostat.fao.org/site/339/default.aspx

- **Fernández, E; Mena, J; González, J; Márquez, ME.** 2003. Biological control of nematodes in banana. In Turner, DW; Rosales, FE. eds. Banana root system: towards a better understanding for its productive management. Proceedings of an international symposium held in San José, Costa Rica, 3-5 November 2003. San José, CR, CORBANA. p. 193-200.

- **Germaine K.; Keogh E; Garcia-Cabellos G.; Borremans B.; Van der Lelie D.; Barac T.; Oeyen L.; Vangronsveld J.; Porteous Moore F.; Moore E. RB.; Campbelcolin D.L.; Ryan D.; Owling D.N.** 2004. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiology Ecology*.
- **Govindajaran, V.S.** (1985). *Capsicum production, technology, chemistry, and quality*. Ed. Critical reviews in food Science and Nutrition. London.
- **Hallmann, J; Quadt-Hallmann, A; Mahaffee, WF; Kloepper, JW.** 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43:895-914.
- **Hamdan, H; Weller, DM; Thomashow, LS.** 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Applied and Environmental Microbiology* 57:3270-3277.
- **Handelsmann, J; Stabb, EV.** 1996. Biocontrol of soilborne pathogens. *Plant Cell* 8:1855-1869.
- **Harman, G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I Chet, M. Lorito.** 2004 Trichoderma species-Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews* 2, 43-56.
- **Hass, D; Défago, G.** 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3(4):307-319.
- **Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., and Ahmed I.** 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60(4): 579-598.
- **Hernández, LG; Escalona, MA.** 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR (en línea). *La ciencia y el hombre. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana* 16(1). Consultado 27 nov. 2006. Disponible en <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol16num1/articulos/microorganismo/s/mic ro.htm>

- **Hernández-Verdugo, S., González, R. A., Sánchez, P. P., Casas, A. y Oyama, K.** 2006. Estructura y diferenciación genética de poblaciones silvestres y domesticadas de chile en el noreste de México analizadas con isoenzimas y RAPDS. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29 (2): 25-29.
- **Herrera f., Castillo J.E., Chica, A.F. and López bellido, L.** 2009. Use of municipal Solid Waste Compost (MSWC) as a Growing Medium in the Nursery Production of Tomato Plants. *Bioresource Technology*, 99 (2), 287-296.
- **Hoffland E., Kuyper T.W., Wallander H., and Haselwandter K.** 2004. The role of fungi in weathering. *Front Ecol Environ* 2(5): 258-264.
- **Huffman, V. L., Schadle, F.R.** Volatile components and pungency in fresh and processed Jalapeno peppers. Ed. *Journal of Food Science*. London.
- **Johansson J.F., Paul L.R., and Finlay R.D.** 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *Microb Ecol* 48 (1): 1-13.
- **Junior, V. L., Maffia, L.A., Da Silva Romeiro, R., Mizubuti, E.S.G.** 2006. Biocontrol of tomato late blight with the combination of epiphytic antagonists and rhizobacteria. *Biological Control* 38, 331-340.
- **Kapulnik Y.** 2002. Plant growth promoting by rhizosphere bacteria. *Plant roots the hidden half*. Ed Marcel Dekker. N.Y. USA. 869-887 p.
- **Kimati H.; Amorim L.; Rezende J.A.; Bergamin Filho A.; Camargo L.;** *Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos*. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995.
- **Kloepper J.W., and Schroth M.N.** 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proc. 4th Int. Conf. Plant. Path. Bact. Angers*. 879-882.
- **Kloepper J.W.** 1983. Effect of seed piece inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on populations of *Erwinia carotovora* on potato roots and in daughter tubers. *Phytopathology* 73: 217-219.

- **Kloepper J.W., Zablutowicz R.M., Tipping E.M., and Lifshitz R.** 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers, 315-326 p. *En: Keister D.L and Cregan P.B. (Eds). The rhizosphere and plant growth. The Netherlands.*

- **Kloepper, JW; Zablutowicz, RM; Tipping, EM; Lifshitz, R.** 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In Keister, DL; Cregan, PB. eds. The rhizosphere and plant growth. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. Wageningen, Netherlands, p. 310-330.

- **Kloepper J.W.; Schippers B.; Bakker P.A.** 1992. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 855-886.

- **Kloepper, JW; Ryu, C-M; Zhang, S.** 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266.

- **Kloepper, JW; Ryu, C-M.** 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. *Microbial root endophytes.* Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 33-52. (Soil Biology Vol. 9).

- **Lee SW, Han SW, Bartley LE, Ronald PC,** 2006 From the Academy: colloquium review. Unique characteristics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* AvrXa21 and implications for plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA.*

- **Le Floch G, Vallance J, Benhamou N, Rey P.** 2009. Combining the oomycete *Pythium oligandrum* with two other antagonistic fungi: Root relationships and tomato grey mold biocontrol. *Biol. Control.*

- **Lindow S.E. Brandl M.T.** 2003. *Microbiology of the Phyllosphere.* Applied Environmental Microbiology 4; 1875-1883.

- **Loeffler, W; Tschen, SM; Vamittanakoon, N; Kugler, M; Knorpp, E; Hsieh, TF; Wu, TG.** 1986. Antifungal effects of Bacilysin and Fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *Journal of Phytopathology* 115:204-213.

- **Loper, J.** 1988. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology* 78:166-172.

- **Lugtenberg, BJ; Dekkers LC.** 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology* 1(1):9-13.
- **Masson J., Tremblay ,N and Grosselin, A.** 1991. Nitrogen fertilization and HPS supplementary lighting influence vegetables transplant production. Transplant growth. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 116 (4):594-598.

- **Matsumoto L.S., Martines A.M., Avanzi M.A., Albino U.B., Brasil C.B., Saridakis D.P., Rampazo L.G.L., Zangaro W., and Andrade G.** 2005. Interactions among functional groups in the cycling of, carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. *Appl Soil Ecol* 28(1): 57–65.

- **May J.,** 1984. Lifting and field packing. En: May J., Belcher E. Cordell C., Filer T., South D. and Lantz (eds). *Southern Pine Nursery Handbook*. USDA Forest Service. Southern Region. pp: 81-82.

- **Mazzola, M; Cook, RJ; Thomashow, LS; Weller, DM; Pierson, LS.** 1992. Contribution of Phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 58(8):2616-2624.

- **McKeen, CD; Reilly, CC; Pusey, PL.** 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 76:136-139.

- **Melgarejo y De Cal,** 2006. Biofungicidas y control biológico de hongos fitopatógenos: aplicación en la filosfera. *Phytoma*, N° 182, 59-63.

- **Mena, J; Pimentel, E; Veloz, L; Hernández, AT; León, L; Ramírez, Y; Sánchez, I; Mencho, JD; López, A; Pujol, M; Borroto, C; Ramos, E; Álvarez, JM; Marín, M; Jiménez, G; García, G; Pico, VM; Expósito, M; Coca, Y; Gómez, M; Olazabal, A; Hernández, A; Falcón, V; De la Rosa, M; Menéndez, I; Raíces, M.** 2003. Aislamiento y determinación de cepas bacterianas con

actividad nematocida. Mecanismo de acción de *C. paurometabolum* C-924 sobre nematodos. *Biotecnología Aplicada* 20(4):248-252.

- **MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACION Y MEDIO AMBIENTE.**

http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2012/AE_2012_13_06_28_02.pdf

http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2012/AE_2012_13_06_28_01.pdf

magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/

- **Modino P., Vero S.** 2006. Control biológico de patógenos de plantas. Universidad de Agronomía. Montevideo, Uruguay.
- **Nuez Viñals, F.; Ortega Gil, R.; Costa García, J.** (1996). El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Ed. Mundi-Prensa.
- **Nuñez, CT.** 2006. Estudio de poblaciones de bacterias endofíticas de la rizosfera del banano para el bicontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 62 p.
- **Olalde P., V. y L. I. Aguilera G.** 1998. Microorganismos y biodiversidad. *Terra Latinoamericana* 16: 289-292.
- **Oliet J.,** 2000. La calidad de la postura forestal en vivero. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes de Córdoba. España.
- **Osorio N.W.** 2007. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Rev Fac Nac Agron* 60(1): 3621-3643.
- **Pal K., Bhatt D., and Chauchan S.** 2000. Plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* enhanced peanut growth, yield and nutrient uptake. National research center for groundt. Guajarat, India. No.5.

- **Petrini, O.** 1986. Taxonomy of endophytic fungi in aerial plant tissues. In Fokkema, NJ; van den Heuvel, J. eds. *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge, UK, Cambridge University. p. 175-187.
- **Petrini, O.** 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In Andrews, J; Hirano, S. eds. *Microbial ecology of leaves*. Berlin Heidelberg, New York, Springer. p. 179-197.
- **Ping L.** 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Plant Sci* 9(8): 263-266.
- **Reche Marmol J.,2010.** Cultivo del pimiento dulce en invernadero. Estudios e informes técnicos. Consejería de Agricultura y pesca.
- **Rodgers, PB.** 1989. Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. *Pesticide Science* 27:155-164.
- **Rodríguez K.F.,** 1997. Fungal endophytes of palms. In Redlin, S.C, Carris, L.M (Eds.). *Endophytic fungi in grass and woody plants. Systematic Ecology and Evolution*. APS Press. St Paul, MN,pp. 121-132. 223p.
- **Ryan, R.; Germaine K.; Franks A; Ryan, D; Dowling, N.** 2007. Bacterial Endophytes: Recent developments and applications.
- **Segarra, G., E. Casanova, D. Bellido, M.A. Odena, E. Oliveira, I. Trillas.** 2007. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* 7, 3943-3952.
- **Schippers, B; Bakker, AW; Bakker, PAHM.** 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology* 25:339-358.
- **Schmidt-Vogt H.,** 1980. Characterization of plant material, IUFRO Meeting. S1.05- 04. In Röhring E, Gussone HA. *Waldbau. Zweiter band. Sechste Auflage, Neubearbeitet*. Hamburg und Berlin, 1990. 314 p.
- **Schroth, MN; Hancock, JG.** 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216:1376-1381.

- **Shankar S., J., V. Chandra P. and D. P. Singha.** 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 140: 339-353.
- **Sharma S.K., Dandge V., Sharma M.P., Ramesh A., Joshi O.P.** 2009. Isolation and assessment of zinc-solubilizing *Bacillus* isolates from Nimar region of Central India, 133 pp. *En: S.Desai, M.S.Reddy, V.Krishna Rao, Y.R.Sarma, B.Chenchu Reddy, K.R.K. Reddy (Eds.) Abstracts of the First Asian PGPR Congress for Sustainable Agriculture.* yderabad, Angra.
- **Shulz, B.** 2006. Mutualistic interactions with fungal root endophytes. In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. *Microbial root endophytes.* Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 261-279. (Soil Biology Vol. 9).
- **Siddiqui, IA; Ehteshamul-Haque, S.** 2001. Suppression of the root rot-root knot disease complex by *Pseudomonas aeruginosa* in tomato: the influence of inoculum density, nematode populations, moisture and other plant-associated bacteria. *Plant Soil* 237:81- 89.
- **Siddiqui, IA; Shaukat, SS.** 2003. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1615-1623.
- **Sikora R.A.; Schafer K.; Dababat A.A.** 2007. Modes of action associated with microbially induced in plant suppression of plant parasitic nematodes. *Australian Plant Pathology* 36, 124-134.
- **Sobrinho Illescas, E.I. y Sobrinho vesperinas, E.,** 1992. *Tratado de horticultura herbácea.* Ed. Aedos, Barcelona, 356pp.
- **Strobel,** 2003; Hua Wei 2006. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products *microbiol. Microbiol. Mol. Biol. Rev.,* 67: 491-502.
- **Sylvia D.M., Fuhrmann J.J., Hartel P.G., and Zuberer D.A.** 1999. *Principles and applications of soil microbiology.* Prentice Hall, New Jersey. 550 p.

- **Tello, J.C.** 2003. Evolución de las enfermedades hortícolas en el sureste español. Perspectivas de futuro y alternativas a las aplicaciones fitosanitarias actuales. En: Técnicas de producción en cultivos protegidos. Tomo 1. Ed: Caja Rural Intermediterránea, Cajamar, Almería. 373 pp.
- **Thomashow, LS; Weller, DM.** 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and antifungal metabolites. In Stacey, G; Keen, NT. eds. Plant-Microbe Interactions, Volume 1. New York, Chapman and Hall. p. 187-236.
- **Thompson B.,** 1985. Seedling morphological evaluation: what you can tell by looking. En: Duryea M. (ed). Evaluating seedling quality; principles, procedures, and predictive abilities of major test. Forest Res. Lab., Oregon State University, Corvallis, OR, USA. Pp: 59-71.
- **Toral M.,** 1997. Concepto de calidad de plantas en viveros forestales. Documento Técnico 1. Programa de Desarrollo Forestal Integral de Jalisco. SEDER., Fundación Chile, Consejo Agropecuario de Jalisco. México.
- **Torres M.V. y Lizarazo L.M.** 2006. Evaluación de grupos funcionales (ciclo del C, N, P) y actividad de la fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá (Colombia). Agronomía Colombiana 24(2): 317-325.
- **Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A.; Botina S.G.; Netrusov A.I.** 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiological Research.
- **Utkhede y Mathur,** 2006. Tratamientos preventivos y curativos para el control de Botrytis cinerea, cancro del tallo de tomate de invernadero BioControl.
- **Vessey,** 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255: 571-586.
- **Wall L.** 2001. Consequences of an overview on PGPR work in Argentina: the field should be wider. Programa de investigación en interacciones biológicas. Universidad Nacional de Quilmes, Argentina.

- **Weller, DM; Cooke, RJ.** 1983. Suppression of take-all of wheat by seed-treatment with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 73:463-469.
- **Weller, DM.** 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26:379-407.
- **Whipps JM; Davies KG.,**2000. Success in biological control of plant pathogens and nematodes by microorganisms. In: Gurr G, Wratten SD, eds. *Measures of success in biological control*. Dordrecht: The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- **Xavier L., J.C. and S. M. Boyetchko.** 2002. Arburcular mycorrhizal fungi as biostimulants and bioprotectants of crops. In: G. G. Khachatourians and D. K. Arora (ed). *Applied mycology ande biotechnology*. Vol: (2) Agriculture ande food production. Elsevier science. Amsterdam, The Netherlands. Pp:311-324.
- **Zhuang X., Chen J., Shim H., and Bai Z.** 2007. New advances in plant growthpromoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment int* 33: 406-413.