

AUTOR:

PABLO CORREA GUTIÉRREZ

TÍTULO:

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROMOTORA DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS EXTRAIDOS DE SUELOS SUPRESIVOS SOBRE PLÁNTULAS DE TOMATE Y SU INFLUENCIA EN LA CALIDAD DE PLÁNTULA.

FECHA DE DEFENSA:

JUNIO DE 2011

DIRECTORES DEL PROYECTO:

DR. DÑA. MILAGROSA SANTOS HERNÁNDEZ

D. FRANCISCO CARRETERO ESTEBAN



EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROMOTORA
DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS
EXTRAIDOS DE SUELOS SUPRESIVOS SOBRE
PLÁNTULAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) Y
SU INFLUENCIA EN LA CALIDAD DE PLÁNTULA.

Trabajo monográfico

Ingeniero Técnico Agrícola
Especialidad: Hortofruticultura y Jardinería

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA
UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

ALUMNO: Pablo Correa Gutiérrez

DIRECTORES: Dr. Dña. Milagrosa Santos Hernández

D. Francisco Carretero Esteban

Almería, Junio de 2011

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a las personas que han sido cercanas a mí, ya que ellos me han ayudado a ser quien soy.

A mi padre, por enseñarme a tener presente el sentido de la responsabilidad, para cualquier área en el que me mueva, siempre poder hacer las cosas algo mejor.

A mi madre, por desprender paciencia a todos sus cercanos, ya que esta virtud ayuda día a día a que lo demás tenga sentido.

A mis hermanos, por aportarme los primeros ingredientes desde que tengo recuerdos. Ellos han sido mis segundos padres, tanto en educación, como en alegrías, y su apoyo incondicional a todas mis decisiones.

A Mila, Fran, Fran, y Jose, por la gran experiencia que he tenido el placer de compartir en este proyecto de carrera, así como aguantar mis continuas visitas al laboratorio.

A mis amigos, pero en especial, a Julian, Jose Francisco, Antonio luís, Daniel, Javier y Juan Jose por haber compartido los mejores momentos y sobretodo por haber estado ahí cuando los he necesitado, durante estos difíciles años de carrera universitaria.

Y por último, agradacer a aquellos que no han creído en mí. Muchas gracias, sin vosotros, no me hubiera completado como persona.

Indice:

1. Interés	1
2. Objetivos	3
3. Revisión bibliográfica	4
3.1.- Producción de tomate	4
3.2.- El uso de biofertilizantes en la agricultura	4
3.2.1.- Fijadores de nitrógeno	7
3.2.2.- Hongos micorrízicos	8
3.2.3.- Promotores del crecimiento vegetal	12
3.2.3.1.- Bacterias	12
3.2.3.1.1.- Mecanismos implicados en la actividad PGPR	15
3.2.3.1.1.1.- Producción de Sideróforos	16
3.2.3.1.1.2.- Fijación no simbiótica de nitrógeno	17
3.2.3.1.1.3.- Solubilización de fosfatos insolubles	18
3.2.3.1.1.4.- Producción de quitinasas	19
3.2.3.1.2.- Interacciones entre MA y rizobacterias	21
3.2.3.1.2.1.- Mycorrhiza helper bacteria (MHB)	21
3.2.3.1.2.2.- Interacciones relacionadas con la promoción del crecimiento de las plantas	23
3.2.3.2.- Hongos	25
3.2.3.2.1.- Genero: <i>Paecilomyces</i>	25
4. Material y Métodos	28
4.1.- Introducción:	28
4.2.- Cuantificación de esporas:	32
4.3.- Evaluación de la capacidad bioestimulante de cuatro cepas de <i>Paecilomyces</i> , una levadura, y dos aislados sin identificar para inoculación directa sobre las semillas a $1 \cdot 10^8$ conidias/mL	35

Indice

4.3.1- Evaluación del estado y calidad de las plántulas	37
4.3.2.- Modo de realización	37
4.3.1- Evaluación del estado y calidad de las plántulas	39
4.3.2.- Modo de realización	39
4.3.5.- Preparación de medio de cultivo Agar-malta	40
4.4.- Evaluación <i>in vitro</i> de las actividades enzimáticas	41
4.4.1.- Análisis de las actividades enzimáticas	42
4.4.2.- Actividad proteolítica	43
4.4.3.- Solubilización del fósforo	45
4.4.4.- Producción de Sideróforos	46
4.4.5.- Producción de Ácido Idol Acético	47
5. Resultados	51
5.1.- Introducción	51
5.2- Evaluación de la capacidad bioestimulante de cuatro cepas de <i>Paecilomyces</i> , PAE 1, PAE 2, PAE 3, PAE 4, una levadura, LEV 4, y dos aislados, AIS 29, y AIS 36, en inoculación directa sobre las semillas a 1×10^8 conidias/mL	51
5.2.1.- Resultados obtenidos en las distintas mediciones del ensayo en función de su tratamiento	51
5.2.2.- Análisis de: Índice de calidad de Dickson (QI), Índice tallo raíz (ITR), e Índice de esbeltez	60
5.2.3.- Correlaciones entre los distintos parámetros	63
5.2.4.- Cuadros de correlación	79
5.2.4.1- Cuadros resumen de los valores para la correlación en función de longitud	79
5.2.4.2.- Cuadros resumen de los valores para la correlación en función del diámetro	80
5.2.4.3.- Cuadros resumen de los valores para la correlación en función del peso seco total	81
5.2.5.- Presencia de <i>Paecilomyces</i> en las raíces	82
5.3.- Evaluación <i>in vitro</i> de las actividades enzimáticas	87

Indice

5.3.1.- Determinación de la presencia o ausencia de halo de degradación o solubilización	87
5.3.2.- Actividad proteolítica	87
5.3.3.- Solubilización del fósforo	88
5.3.4.- Actividad proteolítica	88
5.3.5.- Determinación de la producción de sideróforos	89
5.3.6.- Determinación de la producción de Sideróforos mediante el medio Caldo Casimino Ácido (CAS)	90
5.3.7.- Determinación de la producción de Sideróforos mediante el medio KING B.	91
5.3.8.- Determinación de la producción de ácido Indol Acético (AIA)	92
5.3.9.- Comparación entre el Medio TBS con Triptófano y sin triptófano	95
6. Discusión	96
7. Conclusiones	100
8. Bibliografía	101

1. Interés

En la agricultura actual, se busca tener una mayor eficacia en el control de patógenos. Por ello, la aplicación de microorganismos, incluidos los que estén presentes de forma natural en la planta, puede favorecer el desarrollo de la planta y por el contrario el de los patógenos. Éste efecto beneficioso de los microorganismos de biocontrol puede ser de varios tipos, como ser antagonistas frente a enfermedades determinadas, o su efecto promotor del crecimiento para las plantas, facilitando los nutrientes para su consumo. (Baker y Cook, 1974).

Un ejemplo de biocontrol natural son los suelos supresivos. El término suelo o sustrato supresivo se aplica en aquéllos en los que las enfermedades causadas por patógenos determinados, no se manifiestan o lo hacen mínimamente, a pesar de que los fitopatógenos están naturalmente presentes o artificialmente introducidos (Baker y Cook, 1974). Para nuestro interés en este proyecto, tendremos en cuenta los microorganismos promotores del crecimiento provenientes de los suelos supresivos.

Las bacterias pertenecientes a PGPR, término que proviene del inglés: “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”, participan en diversos procesos del ecosistema, que incluyen el reciclaje y solubilización de nutrientes, establecimiento de plántulas, fijación de nitrógeno, síntesis de fitohormonas, control de patógenos de plantas, además de ser utilizados para propósitos forestales (Weller y Thomashow, 1993; Glick, 1995; Rodríguez y Fraga, 1999; Elo *et al.*, 2000; Vessey, 2003; Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005). Las PGPR son componentes importantes en el agroecosistema porque no solo contribuyen en la disponibilidad de nutrientes que promueven el crecimiento vegetal, sino también en la degradación de moléculas orgánicas de origen vegetal y animal que son fuente de carbono y energía (Gobat *et al.*, 2004). Además, favorecen la tasa de germinación, el crecimiento de las raíces, incrementa el contenido de proteínas, aumenta la tolerancia vegetal a factores que originan estrés y también funcionan como agentes de biocontrol

Interés y Objetivos

(Glick, 2004; Bashan y de-Bashan, 2005).

Para el caso específico de los hongos promotores del crecimiento, su aplicación ha producido en varias especies, el incremento de la velocidad y porcentaje de germinación; reducción de los efectos causados por condiciones de estrés ambiental (Björkman *et al.*, 1998); aumento de la altura de las plantas, aumento de peso seco y tamaño de las raíces; el adelantamiento de los momentos de floración y cosecha; aumento del número de flores por planta y mayor tamaño de los frutos (Kleifeld y Chet, 1992).

Dentro de los hongos promotores del crecimiento descubiertos en suelos supresivos, podemos destacar los *Paecilomyces*. *Paecilomyces* es un género de los hongos pertenecientes a la familia *Trichocomaceae*. Los hongos pertenecientes al género *Paecilomyces* son hongos filamentosos cosmopolitas que están aislados del suelo y del material vegetal en descomposición, y a menudo asociados en la procesación de productos nutritivos. (Vera, 1999). *Paecilomyces* sobretudo es conocido por su poder nematocida. Se han realizado recientemente investigaciones sobre la relación de la capacidad promotora del crecimiento con el efecto nematocida, con resultados positivos frente a otras especies de hongos, como *Pichia guilliermondii*, *Calothrix parietina* y *Control*, y comparable su efecto promotor a *Pseudomonas* (Hashem y Kamal, 2011).

En éste ensayo se determinará la promoción de plantas mediante el uso de microorganismos procedentes de suelos supresivos y comparar los resultados de las distintas cepas con los testigos.

2. Objetivos

I. Evaluación de la capacidad promotora del crecimiento de hongos aislados de suelos supresivos sobre plantas de tomate en semillero.

II. Evaluación de la calidad de la plántula obtenida mediante el cálculo de diferentes índices.

III. Determinación de niveles de producción de ácido indol acético, sideróforos y solubilización de fósforo.

3. Revisión bibliográfica

3.1.- Producción de tomate:

Nadie duda de la importancia económica que representan las hortalizas en España. Las 400,000 ha cultivadas (datos del año 2006), suponen unos ingresos para el Sector, incluidos los numerosos servicios auxiliares que conlleva. Una de estas especies es el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), fruto que desde muchos años atrás está garantizando la rentabilidad de las explotaciones y la supervivencia de los agricultores en comparación con otras especies que han ocasionado algunos años cierta incertidumbre. El cultivo del tomate, mantiene su superficie no ya sólo por su rentabilidad sino por el abanico de posibilidades que le rodea: variedades más productivas y de mayor calidad, resistencia a plagas y enfermedades, incorporación de la técnica del injertado que le proporciona una mayor protección contra hongos del suelo, variedades larga vida, recolección en racimo, diversidad de procesados a partir de tomate y por sus aportaciones nutritivas a la dieta diaria. Además el tomate tiene una oferta y demanda a lo largo de todo el año, al contrario de otras hortalizas más estacionarias, como melón y sandía, que nos obliga a reflexionar que la actividad agraria es competitiva porque uno de sus pilares es el tomate (Reche, 2010).

3.2.- El uso de biofertilizantes en la agricultura:

Biofertilizante es una sustancia que contiene microorganismos vivos, los cuales, cuando se aplican a semillas, superficies de plantas o suelos, colonizan la rizosfera o el interior de la planta, y promueven el crecimiento al incrementar el suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios a la planta huésped. Esta definición separa a los biofertilizantes de los fertilizantes orgánicos. Estos últimos contienen compuestos orgánicos, los cuales, sea directamente o por descomposición, incrementan la fertilidad

Revisión bibliográfica

del suelo. Asimismo, el término biofertilizante no debe ser usado de forma intercambiada con los términos abono verde, abono, intercultivo, o fertilizante químico con suplemento orgánico (Vessey, 2003).

Ciertos microorganismos del suelo pueden incrementar la disponibilidad de nutrientes para las plantas, otros producen compuestos como vitaminas, hormonas y antibióticos que contribuyen a la salud vegetal y a la obtención de altos rendimientos. El hombre con el desarrollo tecnológico aplicó métodos microbiológicos para estudiar estos microorganismos y utilizarlos posteriormente, bajo el nombre genérico de biofertilizantes, en las prácticas agrícolas contemporáneas (Compagnoni, 1997; Guet, 1997).

La importancia económica de los biofertilizantes ha crecido en los últimos años; factores del mercado y el creciente predominio de una cultura de la sustentabilidad en el desarrollo económico son los dos principales fenómenos que impulsan la producción y el consumo de biofertilizantes en el mundo (Martínez y Ramírez, 2000).

La sostenibilidad de los sistemas agrícolas a largo plazo debe fomentar el uso y manejo efectivo de los recursos internos de los agroecosistemas. En este sentido, los biofertilizantes constituyen un componente vital de los sistemas sostenibles, ya que son un medio económicamente atractivo y aceptable de reducir los insumos externos y de mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos (Mejía, 1995).

En general, se puede decir que el funcionamiento de un ecosistema edáfico depende en gran medida de la actividad microbiana del suelo, dado que los microorganismos protagonizan diversas acciones que producen beneficios para las plantas a las que se asocian (Kennedy y Smith, 1995; Barea, 1998; Bowen y Rovira, 1999). Entre otras acciones, los microorganismos beneficiosos facilitan la captación de nutrientes, producen fitohormonas que favorecen el enraizamiento, protegen a la planta

Revisión bibliográfica

frente a patógenos, descomponen sustancias tóxicas y mejoran la estructura del suelo (Barea, 1998).

Entre los beneficios del uso de microorganismos en la agricultura están su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, la descomposición de residuos orgánicos, la desintoxicación con plaguicidas, la supresión de enfermedades en las plantas, el aporte de nutrientes al suelo y la producción de compuestos bioactivos como vitaminas y hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas (Martínez, 2002).

Mayea (1995), señala que los microorganismos utilizados como biofertilizantes tienen un triple papel como suministradores de nutrientes, fitohormonas y antagonistas de hongos fitopatógenos.

Entre los principales microorganismos presentes en el suelo capaces de lograr este efecto se encuentran el hongo antagonista *Trichoderma harzianum*, del cual se ha comprobado su efecto como estimulador de crecimiento en múltiples cultivos y los hongos formadores de micorrizas arbusculares (Parets, 2002; Fernández, 1999).

Los microorganismos con efectos benéficos sobre las plantas tienen un potencial considerable como biofertilizantes y como agentes de biocontrol. Pueden distinguirse tres grandes grupos (Kloepper *et al.*, 1998):

1) fijadores de nitrógeno

2) hongos micorrízicos

3) promotores del crecimiento vegetal, entre los que encontramos bacterias y hongos

Revisión bibliográfica

3.2.1.- Fijadores de nitrógeno:

Existen algunas especies de microorganismos que poseen la habilidad de convertir el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4^+) mediante la acción de la enzima nitrogenasa. Estas especies son denominados diazótrofos y requieren de energía para realizar su metabolismo. Dentro de los diazótrofos capaces de realizar este proceso se encuentran los denominados fijadores de vida libre, los cuales fijan N_2 atmosférico sin la cooperación de otras formas vivas, siendo la familia *Azotobacteriaceae* la que agrupa uno de los géneros más importantes utilizados en la biofertilización a diferentes cultivos. El género *Azotobacter* es uno de los microorganismos utilizados como biofertilizantes. Sus propiedades beneficiosas se ponen de manifiesto en una gran variedad de hortalizas, granos y viandas (Mayea *et al.*, 1998). Bhattacharya y Chaudhuri (1993) afirman que es capaz de fijar de 20 a 30 kg de N/ha año, pero tanto *Azotobacter* como *Azospirillum* en determinadas condiciones su efecto beneficioso no se debe solamente a la cantidad de N_2 atmosférico fijado, sino a la capacidad de producir vitaminas y sustancias estimuladoras del crecimiento (ácido indolacético, ácido giberélico, citoquininas y vitaminas) que influyen directamente en el desarrollo vegetal (Rodelas, 2001).

Otro grupo de microorganismos que se convierten en fijadores de N_2 cuando viven en asociaciones simbióticas con organismos superiores de vida son las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, las cuales establecen relaciones simbióticas con plantas leguminosas (Bauer, 2001).

Entre los diferentes sistemas biológicos capaces de fijar N_2 atmosférico, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa constituye con la mayor cantidad aportada al ecosistema y a la producción de alimentos. Se estima que esta puede oscilar entre 200 y 250 kg N/ ha año (FAO, 1995), calculándose que puede alcanzar el 20% de la cantidad fijada anualmente sobre el planeta, constituyendo la asociación más elaborada y eficiente entre plantas y microorganismos (Burdman *et al.*, 1998).

3.2.2.- Hongos micorrízicos:

Dentro de este grupo de microorganismos beneficiosos, se encuentran los hongos formadores de micorrizas. Las micorrizas son asociaciones mutualistas que se establecen entre ciertos hongos del suelo y la mayoría de las plantas terrestres. Las micorrizas se encuentran prácticamente en todos los hábitats de la tierra, desde ecosistemas acuáticos a desiertos, en bosques tropicales, en diferentes altitudes y latitudes (Allen, 1991).

En la naturaleza, el 95% de las plantas poseen hongos micorrízicos (Trappe, 1977).

Se reconoce de los hongos micorrízicos su capacidad para mejorar la estructura del suelo gracias al crecimiento del micelio y la secreción de glomalinas (Faggioli *et al.*, 2008). Asimismo, actúan como una prolongación del sistema radicular (Peterson *et al.*, 2004), facilitando la adquisición de agua y nutrientes de baja movilidad como potasio (K), zinc (Zn) y especialmente fósforo (P). Al incrementar el flujo de P a la raíz, de manera indirecta se mejoran otros procesos fisiológicos en que participa este nutriente. Por su menor diámetro, las micorrizas tienen mayor superficie de absorción que las raíces del vegetal. Si bien utilizan P bajo las mismas formas que las plantas, tienen mayor afinidad por P y una concentración crítica en solución más baja para lograr su absorción (García *et al.*, 2006).

La proliferación e importancia agronómica de las micorrizas es más relevante en suelos deficientes de P (Covasevich *et al.*, 1995). Ante situaciones de carencia, contribuyen con la síntesis de proteínas de estrés en planta. El estrés conduce a la expresión diferencial de la información genética, produciendo cambios en la síntesis de nuevas proteínas, llamadas micorrizinas, las cuales posiblemente dotan a las plantas con la capacidad de adaptación al estrés. La respuesta agronómica en rendimiento podría estar asociada a suelos con baja disponibilidad de P, pero no se ha visto afectada por la dosis de fertilizante agregado (Ferraris y Couretot, 2008).

Revisión bibliográfica

Los hongos micorrízicos necesitan oxígeno para vivir, por ello las poblaciones son muy bajas en suelos de drenaje pobre y anegables. También en suelos salinos y/o sódicos (Abbot y Robson, 1991). En cambio un suelo poroso y bien estructurado las favorece. Cultivos de cobertura aumentan mucho la micorrización, lo mismo que la siembra de maíz y sorgo, que tienen alta dependencia micorrítica e incrementan su población (Faggioli *et al.*, 2008). Las labranzas rompen el entramado de micelios del hongo, destruyendo el efecto benéfico sobre la estructura del suelo (Schalamuk *et al.*, 2006). Dosis medias de fertilizante no afectan a las micorrizas, al igual que insecticidas y herbicidas, a dosis normales (Coyne, 1999).

Existe una gran diversidad en cuanto a morfología y fisiología de las asociaciones micorrícicas, lo que permite reconocer varios tipos de micorrizas diferentes. Las micorrizas que forman la mayoría de plantas de interés agrícola son las endomicorrizas, en las cuales el hongo coloniza de forma intracelular la raíz, y dentro de éstas, las micorrizas arbusculares (MA), que se caracterizan porque el hongo presenta, dentro de la raíz, hifas intercelulares, arbuscúlos (hifas intracelulares muy ramificadas, formadas por divisiones dicotómicas sucesivas) y vesículas intra o intercelulares. De todos los tipos de micorrizas, las MA son las más extendidas en la naturaleza, formando esta asociación plantas pertenecientes al 80- 90% de las familias botánicas (Honrubia *et al.*, 1992). Los hongos formadores de MA, son simbiontes biotrofos obligados puesto que sólo pueden completar su ciclo de vida cuando colonizan las raíces de la planta hospedadora.

La introducción de hongos micorrícicos arbusculares en los suelos de cultivo agrícolas, y también forestales, mejora el crecimiento y la tolerancia de las plantas frente a problemas de salinidad y sequía (Morte *et al.*, 2000; Morte *et al.* 2001; Dell'Amico *et al.* 2002).

El desarrollo óptimo del cultivo del tomate demanda una elevada aplicación de fertilizantes minerales y pesticidas. El uso de dichos insumos químicos implica no solo un costo y requerimiento energético elevados, sino que su aporte indiscriminado pudiera provocar problemas de salinización y contaminación del manto freático. El desarrollo

Revisión bibliográfica

vegetal puede incrementarse con la utilización de elementos biológicos que actúan de forma coordinada en la interfase suelo-raíz, entre estos y como factores imprescindibles se encuentran los hongos formadores de micorrizas-arbusculares (Barea *et al*; 1991 y Fernández, 1999).

En el marco de una agricultura sostenible, la utilización de hongos formadores de micorrizas-arbusculares (MA) debe ser considerada en el diseño de cualquier sistema de producción agrícola, pues además de ser estos microsimbiontes, componentes inseparables de los agroecosistemas, realizan diversas funciones en su asociación con las plantas, pues pueden constituir sustitutos biológicos de los fertilizantes minerales (Thompson, 1991).

La utilización de las micorrizas arbusculares (MA) no implica que se pueda dejar de fertilizar, sino que la fertilización se hace más eficiente y se puede ahorrar cantidades importantes de fertilizantes minerales al tiempo que se logra una mayor absorción de los nutrientes disponibles en el suelo por parte de las plantas (Tejeda,1998).

Se sabe desde hace tiempo que una correcta selección y aplicación de hongos micorrícicos, considerados como fertilizantes biológicos o biofertilizantes, mejora la nutrición vegetal (Smith y Read, 1997; Allen, 1992; Harley y Smith, 1983; Morte y Honrubia, 2002), incrementa la resistencia de las plantas y, sobre todo, su capacidad de recuperación frente a situaciones de estrés abiótico (Augé, 2001; Morte *et al.*, 2001) y biótico, al aumentar la resistencia de las plantas frente a patógenos (Linderman, 2000; Borowicz, 2001).

En los invernaderos de Almería se hacen cultivos ecológicos desde 1.994, incrementando cada año el número de agricultores implicados y la superficie en producción (unas 170 Ha hortícolas en invernadero en el año 2006). Actualmente no existen en el mercado variedades ecológicas adaptadas al cultivo bajo abrigo. Por ello en los cultivos ecológicos se utilizan las mismas variedades híbridas que en los

Revisión bibliográfica

convencionales, pero sin tratamientos químicos. Estas variedades son muy productivas y por tanto muy exigentes en nutrientes, especialmente en la época de desarrollo y maduración de los frutos. (González-Vizcaíno *et al.*, 2007)

Por otra parte, el Reglamento CE2092/91 sobre Agricultura Ecológica marca una limitación de 170 unidades fertilizantes de nitrógeno por hectárea y año. Por tanto, es obvia la necesidad de alternativas, conforme a la normativa asociada a este tipo de agricultura, que siendo respetuosas con el medio ambiente, optimicen el aprovechamiento de los nutrientes disponibles por parte de la planta y mejoren la tolerancia de éstas frente a estreses. (González-Vizcaíno *et al.*, 2007)

Una de las estrategias agrícolas que permitirían una productividad sostenible con bajo coste ecológico y económico es la aplicación y manejo de microorganismos beneficiosos que estimulen el crecimiento vegetal. A este respecto la investigación relativa al posible papel de las micorrizas arbusculares en los sistemas agrícolas tiene especial interés, ya que se ha descrito su influencia positiva sobre el vigor y el estado sanitario de las plantas en especies vegetales muy diversas (Azcón-Aguilar y Barea, 1997; Jeffries *et al.*, 2003; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007). Sin embargo, hasta ahora la aplicación de las micorrizas en los sistemas agrícolas de producción ha sido limitada, probablemente debido a dos problemas fundamentales (Harrier y Watson, 2003):

1) Las condiciones de cultivo empleadas en las prácticas de agricultura intensiva no favorecen el desarrollo de la simbiosis, principalmente por el abuso de fertilizantes de síntesis.

2) No existen suficientes estudios dirigidos a adecuar las condiciones de cultivo y compatibilizarlas con aquellas favorables para el establecimiento y desarrollo de la micorriza.

Revisión bibliográfica

La agricultura ecológica, en cuanto conlleva un menor uso de fertilizantes y pesticidas, y promueve prácticas menos agresivas de laboreo, constituye un marco más favorable para el desarrollo de la simbiosis micorrícica y por tanto, favorece la expresión del potencial de los hongos formadores de micorrizas como biofertilizantes (Harrier y Watson, 2003).

3.2.3- Promotores del crecimiento vegetal:

3.2.3.1.- Bacterias:

Las bacterias PGPR o Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal comenzaron a ser aisladas, clasificadas y estudiadas hacia fines del siglo XIX. Durante el siglo XX se profundizaron los conocimientos sobre las características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y genéticas de cada uno de estos grupos bacterianos. Es a partir de fines del siglo pasado y principios del actual siglo XXI, cuando comenzaron a evaluarse estos microorganismos bajo condiciones extensivas de campo con el propósito de estudiar sus efectos benéficos sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos (González, 2009).

PGPR (del inglés: "Plant Growth Promoting Rhizobacteria") es el término utilizado para nombrar a las rizobacterias beneficiosas, es decir, bacterias que colonizan la raíz y el suelo rizosférico con un efecto positivo en la planta. Desempeñarán funciones claves para la planta tales como:

- Control biológico de los patógenos mediante efectos antagonistas o de Inducción de Resistencia Sistémica (van Loon *et al.*, 1998).

- Incremento de la biodisponibilidad de elementos minerales como por ejemplo la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno.

Revisión bibliográfica

- La fitoestimulación al propiciar la emergencia o el enraizamiento. La fitoestimulación provocada por la inoculación de PGPR ocurre por varios mecanismos. Uno de ellos se basa en la síntesis de sustancias reguladoras de crecimiento, como giberelinas, citoquininas y auxinas, las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, lo que incrementa a su vez la capacidad de absorción de agua y nutrientes y permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas, como la sequía. La literatura científica que describe tales actividades es amplia (Kloepper *et al.*, 1991; Hass, 1991; O'Gara *et al.*, 1994; Wellner & Thomashow, 1994; Glik, 1995; Van de Broek & Vanderleyden, 1995; Bashan & Holguin, 1998; Barea, 2000; Gutierrez-Mañero *et al.*, 2001 y 2002; Probanza *et al.*, 2002; de Boer *et al.*, 2003; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Barea *et al.*, 2004; Zahir *et al.*, 2004; Gamalero *et al.*, 2004).

Las PGPR están asociadas a muchos tipos de plantas y se encuentran comúnmente presentes en diversos ambientes. Algunas rizobacterias colonizan la superficie de la raíz y la interfase del suelo subsiguiente; algunas otras pueden tener características endofíticas en raíz, vástago, hojas, tubérculos y otros órganos (Compant *et al.*, 2005). Las PGPR deben cumplir tres características intrínsecas:

- Ser capaces de colonizar la raíz y/o su zona de influencia;
- Sobrevivir y multiplicarse en los micro-hábitat asociados a la superficie de la raíz donde compiten con la microbiota natural, al menos el tiempo suficiente para ejercer de forma efectiva su actividad promotora del crecimiento;
- Estimular el crecimiento vegetal (Kloepper, 1994).

En el proceso de colonización de la raíz o rizosfera la bacteria es atraída por quimiotaxis basada en compuestos presentes en los exudados radicales, para posteriormente unirse a la superficie radical. Algunas bacterias como por ejemplo *Azospirillum* spp., pueden incluso llegar a penetrar en la raíz y colonizar los espacios

Revisión bibliográfica

intercelulares, aunque no forman estructuras especializadas como ocurre en el caso de la asociación *Rhizobium*-Leguminosa. Dentro de este grupo se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Kloepper *et al.*, 1989; Bashan & Levanony, 1990; Okon & Lavandera, 1994; Tang, 1994; Barea *et al.*, 2004).

En resumen, se acepta que las PGPR pueden afectar al crecimiento de las plantas, bien de forma directa mediante el suministro de determinados compuestos a las planta, o facilitando la captación de nutrientes solubles del suelo (como hace *Azospirillum* spp.), o bien pueden actuar de forma indirecta evitando los efectos deletéreos de uno o más organismos fitopatógenos (fundamentalmente *Pseudomonas* spp.), de ahí que actualmente se tienda a clasificar o dividir a las PGPR en dos grupos: “PGPB” (del inglés “Plant Growth Promoting Bacteria”) y “Biocontrol-PGPB” (Bashan & Holguin, 1998; Cattelan *et al.*, 1999). El cambio del término “PGPR” por “PGPB” se debe a que muchas bacterias que ejercen efectos beneficiosos sobre la planta no son buenas colonizadoras. Bashan & Levanony (1990) defienden la actuación conjunta de diversos mecanismos, siendo los mecanismos individuales menos importantes que si operan de manera conjunta.

En lo referente a los efectos indirectos son de destacar los basados en la producción de antibióticos y cianuros de hidrógeno (HCN) que generan un decrecimiento en la población de fitopatógenos (Zahir, 2004). La producción de sideróforos es la base de otra actividad de las PGPR ya que estos metabolitos que actúan mediante dos mecanismos: la captación de hierro que puede beneficiar directamente a la planta aumentando la disponibilidad del elemento o indirectamente como agente patógeno para otros microorganismos o plagas por cumplir esta misma labor. La conjunción de todos los mecanismos de acción ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas, un incremento en la emergencia, el vigor y el peso de plántulas, un mayor

Revisión bibliográfica

desarrollo en sistemas radicales y un incremento hasta de 30% en la producción de cultivos de interés comercial, tales como la patata, rábano, tomate, trigo y soja (Jiménez, 2001).

3.2.3.1.1.- Mecanismos implicados en la actividad PGPR:

Aunque brevemente mencionados en el apartado anterior, en este apartado se amplía la información sobre los mecanismos implicados en la actividad PGPR, que será interesante para entender la promoción del crecimiento en plantas con cualquier hongo, bacteria o microorganismo agregado.

La formación de órganos en la planta y su consecuente desarrollo, están mediados por factores internos de vital importancia. Los reguladores del crecimiento en las plantas (PGR del inglés "Plant Growth Regulators") son conocidos como hormonas vegetales; pequeñas moléculas que afectan el desarrollo y crecimiento vegetal a muy bajas concentraciones (García Breijo, 2006). Se sabe que los niveles endógenos hormonales generan cambios en los procesos fisiológicos, que repercuten en la floración, fructificación y rebrote de hojas principalmente. Las hormonas vegetales pertenecen a cinco grupos conocidos de compuestos que ocurren en forma natural, cada uno de los cuales exhibe propiedades fuertes de regulación en el crecimiento de las plantas. En estos grupos se incluyen auxinas, etileno, giberelinas (GA), citoquininas y ácido abscísico, todas son moléculas que se encuentran en un rango de peso molecular entre 28 Da (etileno) y 346 Da (GA) (Kamara, 2001). En el presente estudio se concede a las auxinas un interés preferencial por lo que se amplía algo la información sobre esta fitohormona.

La auxina típica es el ácido indol acético (AIA), hormona de la cual aun se conoce poco sobre los mecanismos de su expresión, metabolismo, transporte y distribución final. Su efecto en las células es controlar los tropismos que se manifiestan como inclinaciones, giros o curvaturas del tallo y desarrollo del sistema radical. Se conoce que esta hormona

Revisión bibliográfica

vegetal otorga beneficios a la planta puesto que su división a nivel celular incrementa, lo cual se representa en un aumento de tamaño de los frutos y número de hojas (Uggla *et al.*, 1996; Garcia Breijo, 2006).

La promoción del desarrollo del sistema radical característico de este tipo de reguladores de crecimiento vegetal, es uno de los parámetros utilizados para determinar la efectividad de determinadas bacterias rizosféricas (Fett *et al.*, 1987; Torres-Rubio *et al.*, 2000). El rápido establecimiento de raíces, ya sea por elongación de la raíz primaria o por surgimiento de raíces laterales secundarias, permite a las semillas jóvenes tener pronto un acceso a nutrientes y agua provenientes de su medio ambiente (Patten y Glick, 2002).

El AIA es similar en estructura al aminoácido triptófano, y probablemente es éste el precursor del AIA formado en la planta viva; aunque se conocen cuatro vías de formación de dicha auxina cada una de ellas con un intermediario distinto (García Breijo, 2006). Diferentes grupos de plantas emplean diversas rutas para producir AIA a partir del triptófano. En bacterias, la producción de AIA ocurre a partir del triptófano por medio de la indol-acetamida que se encuentra implicada en la generación de tumores en la planta; existe una ruta alternativa tomada por otras bacterias que involucra la utilización del ácido 3 indol pirúvico como intermediario (Fett *et al.*, 1987; Patten y Glick, 2002).

3.2.3.1.1.1.- Producción de Sideróforos:

Los sideróforos son compuestos producidos por diferentes microorganismos en el suelo que basan su actividad en fenómenos de quelación, un fenómeno rutinario en los sistemas biológicos (Neilands, 1995; Sánchez, 2006). La gran mayoría de los microorganismos fijadores de nitrógeno producen sideróforos para obtener el hierro, elemento necesario para llevar a cabo la fijación de N, ya que la enzima nitrogenasa, que está compuesta de varias unidades protéicas, requiere 36 átomos de hierro para su correcto funcionamiento (Sylvia, 2005).

Revisión bibliográfica

Teniendo en cuenta la importancia del hierro en las funciones vitales de los microorganismos en general, se entiende la eficiencia de los mecanismos de captación generados por estos mismos. Las bacterias aerobias y las aerobias facultativas tienen una alta afinidad por los sistemas transportadores de hierro, razón por la cual se excretan sideróforos que auxilian la toma eficiente de este elemento (Jurkevitch *et al.*, 1992). Existen varios trabajos donde se menciona la capacidad por parte de los actinomicetos de capturar hierro de su hábitat, por medio de ciertos tipos de sideróforos. Así, especies de *Nocardia*, *Streptomyces* y *Arthrobacter* se han descrito como productoras de sideróforos de tipo hidroxamato (Müller & Raymond, 1984; Müller *et al.*, 1984).

Diversos estudios han demostrado que entre las diferentes clases de sideróforos existentes, los primeros identificados son los de tipo catecol (Figura 4a) e hidroxamato (Figura 4b) (Neilands, 1995). Recientemente se han descrito ciertos α -cetoácidos con características y actividad similar a la de los sideróforos.

3.2.3.1.1.2.- Fijación no simbiótica de nitrógeno:

La fijación de nitrógeno atmosférico (N₂) es un proceso indispensable para el desarrollo de la planta; dicho elemento es primordial en la formación de estructuras moleculares como los ácidos nucleicos, aminoazúcares, aminoácidos, entre otros. A nivel microbiano, el complejo nitrogenasa ha sido ampliamente estudiado en la fijación del elemento, pues se presenta en varias bacterias de tipo rizosférico. La fijación biológica de nitrógeno con microorganismos del suelo es considerada uno de los principales mecanismos por el cual las plantas encuentran beneficio de la asociación, uno de los beneficios más estudiados es la relación mantenida con microorganismos diazotróficos, que proveen a la planta de nitrógeno y esta en retorno, proporciona fuente de carbono disponible por los exudados (Zahir, 2004).

3.2.3.1.1.3.- Solubilización de fosfatos insolubles:

El fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos, y en suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas. No es posible capturarlo biológicamente del aire como ocurre con el nitrógeno (Alexander, 1980; Nautiyal, 1999). Las concentraciones de P en las soluciones del suelo son pequeñas, desde 0.01 a 0.3 mg P·L⁻¹ (Ozanne, 1980). Aunque el fósforo presente en la solución del suelo es solo una parte pequeña del contenido total del P en el suelo, es de esa parte de donde las plantas toman la mayoría de sus requerimientos en P inmediatos (Bolán, 1991). En ausencia de niveles significativos de P inorgánico relativamente lábil, de manera que en todos los suelos es constante la razón P inorgánico lábil/P en solución (Stewart & Sharpley, 1987). La solución del P en el suelo solamente es adecuada si el P inorgánico lábil es solubilizado al menos tan rápidamente como las raíces pueden extraerlo del suelo (Russell, 1980). Cuando las plantas toman P de la solución del suelo, el P utilizado, es repuesto a partir de las formas lábiles y moderadamente lábiles de P inorgánico. Cuando estas fuentes están agotadas entonces la fuente de P no lábil es el factor que determina la concentración de P soluble en el suelo (Stewart & Sharpley, 1987).

La concentración de P asimilable es muy baja, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 mg·kg⁻¹. Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas. Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos (Alexander, 1980; Atlas, 2002). La disponibilidad del fósforo inorgánico depende de diferentes factores como: los fluidos y minerales presentes en el suelo, el pH, la actividad microbiológica, la presencia de enzimas y ácidos orgánicos, y la intensidad de la demanda del nutriente. Los agentes de origen biológico son posibles de manejar y prácticamente tienden a mantener

Revisión bibliográfica

el fósforo en sus estados de mayor disponibilidad, incrementando y manteniendo altas tasas de mineralización e inmovilización. Por lo tanto, los microorganismos son fundamentales para asegurar un mejor y mayor uso del fósforo en el suelo. El mantenimiento de altas tasas de nutrientes limitantes es un desafío grande para los agricultores, quienes se ven obligados a implementar técnicas, que en algunas ocasiones, no resultan muy benéficas para el mismo suelo (Azcón & Barea, 1997, Atlas, 2002; Nautiyal *et al.*, 2000).

El propósito principal de las bacterias solubilizadoras de fosfato es optimizar la disponibilidad para la planta de dicho elemento en el suelo, lo que como resultado genera un incremento en el rendimiento de cosechas ya que cambia las formas insolubles del P en el suelo en formas solubles (Chen *et al.*, 2006).

3.2.3.1.1.4.- Producción de quitinasas:

La quitina es un homopolímero formado por residuos de N-acetil-D-Glucosamina con enlaces β -1,4. Es el recurso renovable más abundante después de la celulosa. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza como un componente estructural de crustáceos, hongos, protozoos e insectos (Hoster *et al.*, 2005).

La quitina y sus derivados presentan un especial interés por encontrarse involucrados en diferentes actividades biológicas como inmunoadyuvantes, floculantes de lodos en aguas residuales y disminución del uso en agroquímicos. El uso comercial de la quitina se centra en la necesidad de desarrollar soluciones enzimáticas de quitinasas estables y de bajo costo, los residuos de mariscos han reportado ser una adecuada fuente de quitina, lo cual promueve aún más el valor económico de los productos marinos (Wang y Chang, 1997).

Revisión bibliográfica

La quitina es hidrolizada por un complejo quitinasa que comprende tres enzimas: exoquitinasa, endoquitinasa y quitobiasa, la primera de estas libera dímeros solubles de bajo peso molecular, la segunda libera multidímeros de N-Acetil glucosamina y la última hidroliza quitobiasas de N-Acetil glucosamina (Gomes *et al.*, 2000).

Las quitinasas son glicosil hidrolasas y se encuentran presentes en una gran variedad de organismos tales como bacterias, hongos, insectos, plantas y animales. Estas enzimas juegan papeles fisiológicos y ecológicos importantes. Los invertebrados requieren quitinasas para la degradación parcial de sus exoesqueletos viejos y las plantas como un mecanismo de defensa contra hongos patógenos (Hoster *et al.*, 2005). Las bacterias producen quitinasas principalmente para degradar quitina y usarla como fuente de energía. Adicionalmente, algunas quitinasas de bacterias quitinolíticas, son agentes potenciales para el control biológico de enfermedades de plantas causadas por diversos hongos fitopatógenos, pues hidrolizan la quitina presente en la pared celular del hongo. Las bacterias fitopatógenas también pueden ser controladas por estas enzimas quitinasas debido a que algunas presentan actividad lisozimal, lo cual permite la degradación de la pared celular bacteriana (De la Cruz *et al.*, 1992). Estas enzimas pertenecen a muchas especies bacterianas, entre las más conocidas se encuentran los géneros *Aeromonas*, *Serratia*, *Myxobacter*, *Vibrio*, *Streptomyces* y *Bacillus* (Hoster *et al.*, 2005).

Los actinomicetos se consideran los organismos dominantes en la descomposición de quitina en el suelo (Ames, 1989), en especial el género *Streptomyces* ha sido descrito como microorganismo productor de enzimas extracelulares líticas entre las que se encuentran las quitinasas, son catalogados como agentes antagonistas prometedores para el biocontrol, debido a la reacción de hidrólisis que catalizan estas enzimas sobre el micelio de los hongos en suelos ácidos y hojarasca (Gomes *et al.*, 2001).

Revisión bibliográfica

3.2.3.1.2.- Interacciones entre MA y rizobacterias:

3.2.3.1.2.1.- Mycorrhiza helper bacteria (MHB):

El concepto de “mycorrhiza helper bacteria” (MHB) fue introducido en un “Tansley Review”: *Helper Bacteria: una nueva dimensión de la simbiosis micorrízica* (Garbaye, 1994), que ha conllevado a nuevas investigaciones en el sistema modelo planta-hongo, en cuanto al significado de estas bacterias que promocionan la formación de las micorrizas y ocasionan muchos efectos fisiológicos de la interacción mutualista. El concepto de MHB es genérico, este depende del tipo de simbiosis micorrízica pero no de la posición taxonómica de la bacteria. En relación con las MA, han sido descritos muchos ejemplos (Abdel-Fattal & Mohamedin, 2000; Barea *et al.*, 2005; Artusson *et al.*, 2006). Ciertos actinomicetos (*Rhodococcus*, *Streptomyces* y *Arthrobacter*) han sido identificados como bacterias que se asocian al micelio de hongos ectomicorrízicos (Burke *et al.*, 2006), y solo hay una referencia de *Streptomyces coelicolor* asociado a *Glomus intraradices* en cultivos de sorgo (Abdel-Fatah & Mohamedin, 2000).

En general, se conoce la capacidad de algunos microorganismos para influir en la formación y el funcionamiento de las simbiosis MA, mediante actividades de distinta índole como son la activación de propágulos infectivos del hongo en estadios presimbióticos (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Giovannetti *et al.*, 2002), facilitar la formación de puntos de entrada en la raíz (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986a; Linderman, 1988; Vivas *et al.*, 2003) e incrementar la tasa de crecimiento (Mosse, 1959; Mayo *et al.*, 1986; Carpenter-Boggs *et al.*, 1995).

Se ha descrito que la trehalosa (carbohidrato resultante de la transformación de carbono vegetal a carbono fúngico) puede estar implicada en la selección de comunidades específicas bacterianas en la micorizosfera de árboles forestales (Frey *et al.*, 1997; Izumi *et al.*, 2006; Uroz *et al.*, 2007). Adicionalmente se ha encontrado que este

Revisión bibliográfica

carbohidrato ayuda a la formación de películas bacterianas sobre las células hifales (Frey-Klett *et al.*, 2007).

Las MHB mejoran la formación de la micorriza aunque una misma MHB puede beneficiar la micorrización para determinados hongos y ser negativa para otros (Garbaye & Duponnois, 1992; Tarka & Frey-Klett, 2008). Lo anterior refleja la especificidad fúngica por aislado, que ejemplifica la distancia genética entre aislamientos de diferente origen. Recientemente, Riedlinger *et al.* (2006) identificaron un antibiótico nuevo (auxofurán) responsable de la promoción del crecimiento del hongo ectomicorrícico *Amanita muscaria* generado por la bacteria *Streptomyces* sp. Ach505, el cual actúa de forma benéfica frente al hongo y a su proceso de micorrización.

Dentro de los mecanismos que presentan las MHB se encuentran:

1. *Promoción del establecimiento de la simbiosis por estimulación de la extensión micelial.* La germinación de las esporas y el crecimiento micelial son mejorados por la producción de factores de crecimiento (Hildebrandt *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2006; Riedlinger *et al.*, 2006).
2. *Incremento del contacto y colonización raíz – hongo.* Incremento del número de raíces laterales, mediado por la producción de fitohormonas (Bending *et al.*, 2002; Aspray *et al.*, 2006). Mejora de la colonización radical por inducción de la producción de flavonoides (Xie *et al.*, 1995).
3. *Reducción del impacto a factores ambientales adversos sobre el micelio del hongo micorrícico.* Las bacterias pueden realizar una detoxificación de suelos, restaurando la conductividad del mismo, de forma similar lo liberan de la contaminación generada por metales pesados (Brulé *et al.*, 2001) y reducen las concentraciones de compuestos fenólicos antagonistas

Revisión bibliográfica

producidos por los mismos hongos micorrícicos (Duponnois & Garbaye, 1990).

3.2.3.1.2.2.- Interacciones relacionadas con la promoción del crecimiento de las plantas:

Los microorganismos rizosféricos tienen también efecto sobre el crecimiento de las plantas, llegándose a registrar un efecto de sinergismo, donde la presencia de la MA y del otro microorganismo produce un incremento del crecimiento, vigor y protección de la planta (Barea *et al.*, 2005; Artursson *et al.*, 2006). Estos efectos están basados en actividades tales como la adquisición de nutrientes, inhibición del crecimiento de hongos patogénicos (Budi *et al.*, 1999) y mejora de la ramificación radicular (Gamalero *et al.*, 2004).

En adición a estos efectos producidos por la bacteria sobre los hongos MA, la micorriza a su vez, produce un impacto en la composición de comunidades bacterianas (Artursson *et al.*, 2005). Este impacto puede ser retransmitido a través de la raíz de la planta porque el establecimiento de la micorriza ha demostrado cambiar la composición química de los exudados de la raíz y éstas son a menudo una fuente de alimentos a las bacterias asociadas en la micorrizosfera (Azcón-Aguilar & Bago, 1994; Barea, 1997; Gryndler, 2000; Artursson *et al.*, 2006). Sin embargo, los cambios en la composición y la actividad del hongo MA en las comunidades bacterianas, también se le han atribuido a interacciones más directas, incluyendo la competición para los elementos inorgánicos (Christensen & Jakobsen, 1993).

Aunque hay numerosos estudios referentes a las interacciones de los hongos MA y rizobacterias, asociaciones entre MA y actinomicetos se conocen escasamente, por lo que se requieren investigaciones que permitan la confirmación experimental adicional sobre actividades y mecanismos relacionados. Las investigaciones en micorrizas deben por lo

Revisión bibliográfica

tanto esforzarse hacia una comprensión mejorada de los mecanismos funcionales involucradas en las interacciones en la micorrizosfera, para poder desarrollar la biotecnología *ad hoc* que permita aplicar las combinaciones optimizadas de microorganismos como inoculadores eficaces dentro de sistemas sostenibles de la producción vegetal (Andrade *et al.*, 1997; Artursson *et al.*, 2006).

Los microorganismos descubiertos y estudiados son numerosos y se sabe que quedan muchos por aislar e investigar. No obstante, hoy se disponen de grupos bacterianos que son capaces de proporcionar impactos productivos interesantes en cultivos como el Maíz. Uno de éstos es el de *Pseudomonas sp.*, y particularmente, un pequeño grupo de cepas denominadas *Pseudomonas fluorescens* (González, 2009):

Todas las propiedades bacterianas son esenciales a la hora de emplear un microorganismo por sus efectos benéficos sobre determinados cultivos. Pero, al mismo tiempo, es fundamental sumar a estas excelentes características todos los avances tecnológicos que nos aseguran su implementación bajo condiciones extensivas de campo (González, 2009).

Las PGPR son componentes importantes en el agroecosistema porque no solo contribuyen en la disponibilidad de nutrientes que promueven el crecimiento vegetal, sino también en la degradación de moléculas orgánicas de origen vegetal y animal que son fuente de carbono y energía (Gobat *et al.*, 2004). Además, favorecen la tasa de germinación, el crecimiento de las raíces, incrementa el contenido de proteínas, aumenta la tolerancia vegetal a factores que originan estrés y también funcionan como agentes de biocontrol (Glick, 2004; Bashan y de-Bashan, 2005).

Revisión bibliográfica

3.2.3.2- Hongos:

En este trabajo se ha evaluado la capacidad bioestimulante de algunas cepas de *Paecilomyces*, por ello para conocer más sobre las características del género *Paecilomyces*, éste se describe en el siguiente apartado.

3.2.3.2.1- Genero: *Paecilomyces*

Paecilomyces es un género de los hongos pertenecientes a la familia *Trichocomaceae*. Los hongos pertenecientes al género *Paecilomyces* son hongos filamentosos cosmopolitas que están aislados del suelo y del material vegetal en descomposición, y a menudo asociados en la desintegración de productos nutritivos. También considerado como nematocida, a través de patogénesis, es una alternativa biológica en la lucha contra los nematodos. *Paecilomyces* es generalmente considerado como un contaminante, así como un extraño hongo patógeno en los seres humanos (Vera, 1999).

Sus colonias se caracterizan por tener la superficie blanco-crema y algunos tonos naranja, pero con el tiempo el color acaba oscureciéndose. A los 4 días de crecimiento en agar maltosa 4% a 25°C, la colonia alcanza un diámetro de 3,3-4,3 mm. Formándose colonias de textura algodonosa, densa, con borde lobulado, pigmento extracelular amarillo oscuro. La presencia de esclerocios dan lugar a una apariencia flocosa y un color café uniforme. El diámetro de las hifas es de 3,1-3,3 µm. Las hifas y los conidióforos son de color verde claro. Los conidióforos son largos (68,8-375 x 1,2-1,3 µm), con ramificaciones espaciadas, perpendiculares y con una única fiálide terminal. Fiálides de 6,3-11,3 x 2-2,8 µm, de cuello largo 1,9-3 µm. Conidios citriformes, finamente equinulados, de 2,5-5 x 3-7 µm. Los esclerocios son de color café verdoso con un diámetro de 87,5 – 212,5 µm. Y las clamidosporas son de color verde y un diámetro de 1,9 µm (Vera, 1999).

Revisión bibliográfica

Como anteriormente se ha comentado, *Paecilomyces* sobretodo es conocido por su poder nematocida. En recientes investigaciones sobre “el manejo de los nódulos de la raíz provocado por el nematodo *Meloidogyne incognita* en tomate con diferentes combinaciones de organismos de biocontrol” (Hashem y Kamal, 2011), se demuestra que *Paecilomyces lilacinus* destaca junto a *Pseudomonas fluorescens* en tener mayor efecto promotor del crecimiento frente a *Pichia guilliermondii*, *Calothrix parietina* y Control (SDW), por ejemplo, para algunos índices como son:

- El control en la etapa juvenil del nematodo, reduciendo considerablemente su cantidad.
- El índice de formación de agalla, también reduciendola en menos tiempo.
- La población de los nematodos en el suelo, siendo significativa su reducción. (Hashem y Kamal, 2011).

Pero otros índices más importantes se comprobaron en el ensayo de Hashem y Kamal en relación con la promoción de crecimiento, son los siguientes, los cuáles son para tener en cuenta:

- El efecto del agente de biocontrol en la germinación de semillas *in vitro*, en el cuál se prueba que el tratamiento de *Paecilomyces* mejora el porcentaje de germinación en un 88%. Además consigue una longitud de tallo de 3,2 cm, y 5,1 cm de raíz, teniendo en total el mayor índice de vigor respecto a los demás tratamientos.
- El efecto en el peso fresco y seco de la planta de tomate bajo invernadero, es decir, la influencia de los tratamientos en el peso de las raíces, tallos y hojas de las plantas al final del experimento. Y los resultados mostraron que el incremento de peso para el tratamiento de *Paecilomyces lilacinus* no es significativa, así como cada uno de los demás por separado. Sin embargo la

Revisión bibliográfica

mezcla de todos los agentes de biocontrol utilizados (*Pseudomonas fluorescens* + *Paecilomyces lilacinus* + *Pichia guilliermondii* + *Calothrix parietina*), sí va a tener un amplio efecto: aumentar el peso fresco notablemente en tallos, hojas y raíces, como también en su peso seco.

- El efecto de la combinación de los bioagentes con peroxidasas y polifenoloxidasas, en los cuáles aumenta significativamente su rendimiento para *Paecilomyces*. (Hashem y Kamal, 2011).

De éste ensayo realizado en Egipto para tomate en invernadero, se llega a la conclusión que frente a los demás hongos que utilizan, *Paecilomyces* es de los más destacados, tanto para controlar los nematodos, como para mejorar las condiciones de la planta, ofreciendo una promoción en el crecimiento notable y contrastada. (Hashem y Kamal, 2011).

En este proyecto, se va a analizar la promoción de crecimiento de *Paecilomyces* y otros microorganismos extraídos de suelos supresivos, sobre plántulas de tomate. Además se analizará el efecto de las actividades enzimáticas de estos microorganismos para la producción de ácido indol acético (AIA), sideróforos, solubilización del fosforo, y actividad proteolítica.

4. Material y Métodos

4.1.- Introducción:

En ensayos realizados por Santos *et al.*, (2009) y otros posteriores, estudiando la supresividad a la fusariosis vascular de dos suelos dieron como resultado la obtención de diferentes cepas de hongo que mostraron niveles de inhibición del crecimiento *in vitro* mayores del al 80% frente a la fusariosis vascular del melón y fusariosis vascular de la sandía, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis y *F. o.* f. sp. *niveum*. En este ensayo se va a evaluar la capacidad promotora del crecimiento de algunos de estos microorganismos extraídos de suelos supresivos,

Se ha realizado una evaluación *in vitro* de las actividades enzimáticas de los microorganismos seleccionados. Estos aislados se caracterizaron *in vitro* para determinar a partir de análisis enzimáticos la producción de ácido indol acético (AIA), sideróforos, solubilización del fosforo, y actividad proteolítica. Los aislados son PAE 1, PAE 2, PAE 3, PAE 4, LEV 4, AIS 29, AIS 36, y además dos cepas de *Trichodermas*, T1 y T2, en las que está demostrado su efecto promotor de crecimiento, de manera que se puedan comparar sus efectos.

También se ha realizado un ensayo en semillero con cuatro cepas de *Paecilomyces*, codificadas como, PAE 1, PAE 2, PAE 3, PAE 4; una cepa de Levadura: LEV 4; y dos aislados sin identificar: AIS 29, y AIS 36, Se han utilizado 8 bandejas de semillero de poliestireno, una para una de las: PAE 1, PAE 2, PAE 3, PAE 4, LEV 4, AIS 29, AIS 36, y por último una para el testigo con 32 alveolos cada una. La inoculación se aplicó únicamente en el momento de la siembra. Se inoculó con una dosis de 1 mL de suspensión de esporas por alveolo a cantidades de conidias conocidas de $1 \cdot 10^8$ por mL; la inoculación se realizó mezclando las semillas con el sustrato, en este caso se utilizó turba. En el ensayo se

Material y Métodos

observó la capacidad de los microorganismos como bioestimulantes y por eso se plantearon los siguientes ensayos.

Se han realizado inoculaciones en semillero con las mismas cepas utilizadas, aplicadas únicamente en el momento de la siembra. Se ha inoculado con una dosis de 1 mL de suspensión de esporas por alveolo a cantidades de conidias conocida de $1 \cdot 10^8$ por mL; realizándose la inoculación de dos formas diferentes: directamente sobre las semillas y mezclando las distintas suspensiones de esporas con el sustrato (**Cuadro 1**). Como sustrato se ha usado turba ya que es el sustrato más usado en semilleros comerciales.

PAE 1	PAE 2	PAE 3	PAE 4
<i>Paecilomyces</i> sp. - cepa 1	<i>Paecilomyces</i> sp. - cepa 2	<i>Paecilomyces</i> sp. - cepa 3	<i>Paecilomyces</i> sp. - cepa 4
1 Bandeja	1 Bandeja	1 Bandeja	1 Bandeja
32 plantas	32 plantas	32 plantas	32 plantas
LEV 4	AIS 29	AIS 36	TESTIGO
Levadura	Aislado sin identificar	Aislado sin identificar	-
1 Bandeja	1 Bandeja	1 Bandeja	1 Bandeja
32 plantas	32 plantas	32 plantas	32 plantas

Cuadro 1: Inoculación en semillero de cuatro cepas de *Paecilomyces*, una levadura, y dos aislados sin identificar con la misma concentración: directamente sobre las semillas y mezclando las distintas suspensiones con la turba. Se comparan con un testigo.

Para la inoculación de los microorganismos, primero se replican en medio de cultivo agar-malta. Para ello se incuban en placas de Petri, se extrae un trocito de medio de cultivo de cada placa y se introduce en una nueva placa. Se dejan crecer 8 días en el laboratorio.

Material y Métodos

Para proceder a la cuantificación de las conidias primero se deben realizar los siguientes pasos: con una micropipeta se echan 4 mL de agua destilada en cada placa, con un asa de vidrio se mueven las esporas y se vierte esa mezcla en un recipiente estéril (uno para cada tratamiento). Se flamea un colador y se cuela la mezcla, después se pasa por un embudo con papel de filtro, para dejar pasar solamente las conidias, ya que queremos inocular a diferentes concentraciones de conidias sin que haya trozos de medio de cultivo ni de micelio.

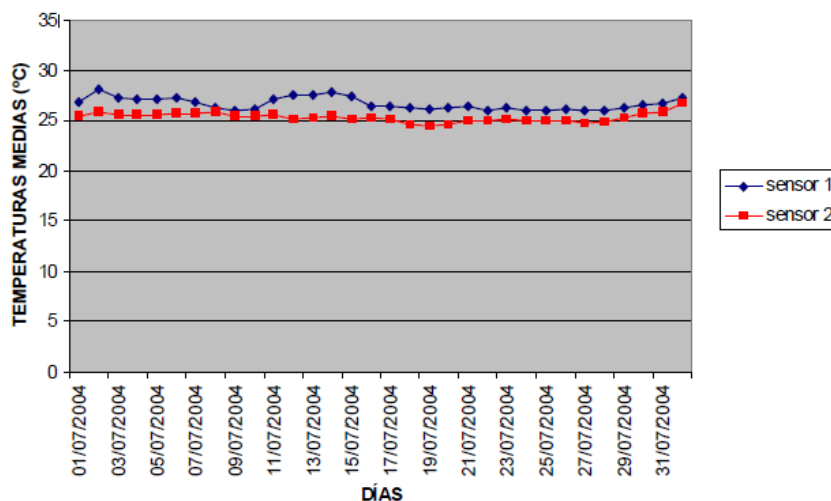
A continuación se procede a la cuantificación del número de conidias, ésta se realiza mediante un Hematocímetro o Cámara de Neubauer: mediante una micropipeta se toma una muestra de esporas, la cual ha sido diluida en agua y se deposita en el hematocímetro, realizándose la cuantificación de conidias mediante microscopio óptico.

Calculada la concentración inicial de las dos cepas de *T. saturnisporum*, éstas se diluyen hasta alcanzar cada una de las concentraciones anteriormente indicadas. Posteriormente se procede a la inoculación con las distintas soluciones.

Se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersici*) variedad San Pedro sin desinfección previa, para simular en la mejor medida las condiciones de campo. Posteriormente las bandejas de semillero se llevan a la cámara de cultivo donde permanecen a una temperatura de 25°C. Se riegan con agua y abono a una dosis de 1 g fertilizante/L agua. Como abono se ha utilizado Sumisolub®.

La cámara de cultivo está programada para que la duración del fotoperiodo sea 16 horas de luz por día. La luminosidad es de 18000 lux, y el intervalo medio de temperatura diaria es de 25-28°C, para cuya medición se utilizan dos sensores, situados en dos posiciones diferentes en la cámara. En la **gráfica 78** se muestra la evolución de la temperatura para un mes seleccionado aleatoriamente.

Material y Métodos



Gráfica 78: Evolución de las temperaturas diarias de la cámara a lo largo de un mes X.

A los 35 días de realizar la siembra se ha realizado la evaluación del estado de las plántulas y la estimación de la calidad de las mismas mediante la determinación de distintos índices de calidad calculados a partir de la determinación de diferentes parámetros:

- % de germinación
- Longitud
- Número de hojas
- Diámetro del tallo por debajo de los cotiledones
- Área foliar
- Peso fresco y peso seco total por sus distintas partes

■ **Con estos parámetros se calcula:**

- Área foliar específica: área foliar/materia seca en hojas (AFE) y área foliar/materia seca total (CAF). Estas evalúan la resistencia al estrés en trasplante.
- Índice tallo raíz (ITR) (Iverson, 1984):

Material y Métodos

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

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

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

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

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

➤ **Coeficientes de correlación:**

- **Longitud**-peso seco tallo-peso seco raíz-peso seco hojas-peso seco total.
- **Diámetro del tallo**-peso seco tallo-peso seco raíz-peso seco hojas-peso seco total.
- **Peso seco hojas**-peso seco total
- **Peso seco tallo**-peso seco total

Se observarán las raíces al microscopio óptico para examinar la presencia de *T. saturnisporum*.

4.2.- Cuantificación de esporas:

Para la cuantificación del número conidias se seguirán los siguientes pasos:

Material y Métodos

- I. Se tienen placas de Petri para cada cepa empleada. **(Foto 1)**
- II. Con una micropipeta se echan 4 mL de agua destilada en cada placa y con un asa de vidrio se mueven las esporas. **(Fotos 2 y 3)**
- III. Se vierte esa mezcla en un recipiente estéril (uno para cada tratamiento).
- IV. Se flamea un colador y se cuela la mezcla, después se pasa por un embudo con papel de filtro **(foto 4)**, para dejar pasar solamente las conidias.
- V. Para proceder a la cuantificación de las conidias primero se diluye la mezcla con agua destilada en un vial, ya que la concentración inicial de conidias es muy elevada y no se pueden cuantificar. A continuación se moja una micropipeta en Tween 20 para disminuir la tensión superficial y se sumerge en el vial, se cierra y agita. Se toma con la micropipeta un poco de mezcla del vial y por último se deposita en el Hematocímetro, en el cual se ha puesto un cubreobjetos encima. Con la ayuda de un microscopio óptico se procede a la cuantificación de conidias. **(Foto 5)**
- VI. Una vez contadas las esporas y conociendo las medidas anteriormente descritas, mediante la siguiente fórmula se obtiene la concentración de esporas por μL y por mil se consigue la concentración por mL.

• ***Fórmula de valoración (válida universalmente):***

$$\text{partículas por } \mu\text{l volumen} = \frac{\text{partículas contadas}}{\text{superf. cont. (mm}^2\text{). profundidad cámara (mm). dilución}}$$

- VII. Calculada la concentración inicial de cada cepa, éstas se diluyen hasta alcanzar cada una de las concentraciones necesarias ya indicadas, para posteriormente proceder a la inoculación en semillero.

Material y Métodos

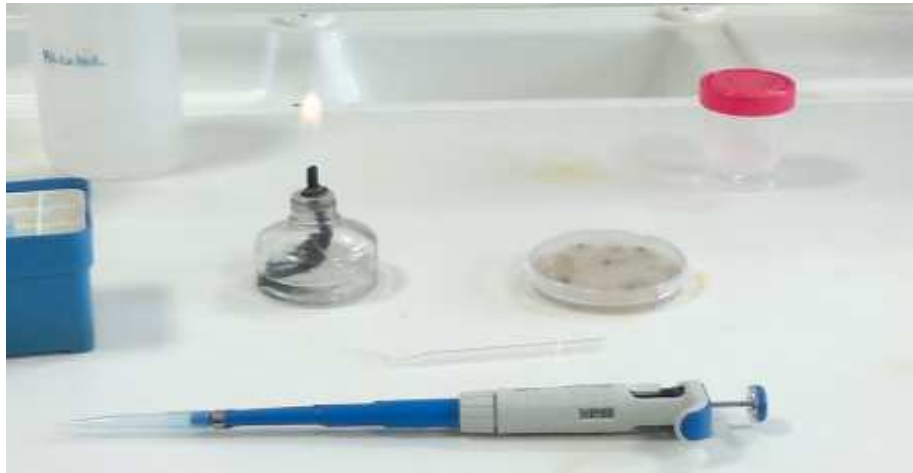


Foto 1: *Paecilomyces* en medio de cultivo agarizado.



Fotos 2 y 3: Extracción de conidias de *T. saturnisporum* mediante raspado con un asa de vidrio.



Foto 4: Flameado de un colador para su esterilización.

Material y Métodos

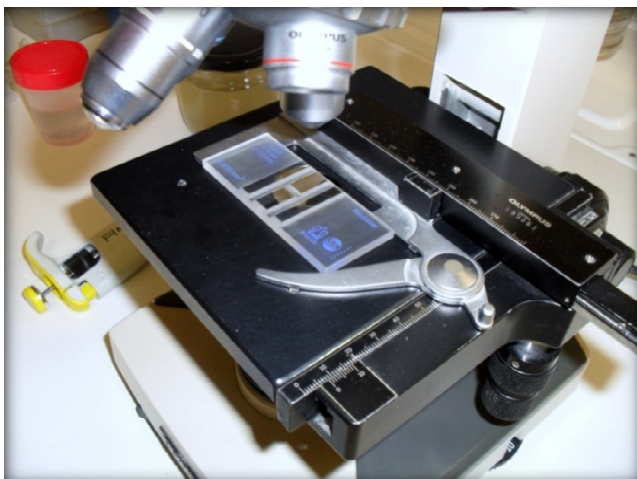


Foto 5: Cuantificación de esporas mediante microscopio óptico

4.3.- Evaluación de la capacidad bioestimulante de cuatro cepas de *Paecilomyces*, una levadura, y dos aislados sin identificar para inoculación directa sobre las semillas a $1 \cdot 10^8$ conidias/mL:

Se han realizado inoculaciones en semillero con cuatro cepas de *Paecilomyces*, una levadura, y dos aislados sin identificar, aplicados únicamente en el momento de la siembra. Se han inoculado con una dosis de 1 mL de suspensión de esporas por alveolo a cantidades de conidias conocidas de $1 \cdot 10^8$ por mL; la inoculación se ha realizado directamente sobre las semillas. Se han usado semillas de tomate (*Solanum lycopersici*) variedad San Pedro (**foto 6**) sin desinfección previa, para simular en la mejor medida las condiciones de campo. Las semillas llevan un tratamiento fungicida con TMTD-THIRAM. Se ha utilizado un sustrato a base de turba: Universal Pflanzeerde®.

Se deposita la turba en un recipiente, se humedece con agua y se mezcla. Se distribuye la turba en los alveolos, con las pinzas (previamente flameadas para su esterilización) se toman las semillas de tomate (**foto 7**) y se depositan 2 por cada alveolo.

Material y Métodos

La obtención del inóculo se realiza de la misma forma que en el caso anterior, ya explicado en el apartado 3.1. Para inocular se necesitan siete recipientes, cada uno con sus respectivos: PAE 1, PAE 2, PAE 3, PAE 4, LEV 4, AIS 29, AIS 36, a una concentración de conidias conocidas de $1 \cdot 10^8$ por mL, a los cuales se le ha añadido 100 μ L de Tween 20. Se agitan las botellas para homogeneizar y disgregar la solución antes de inocular. A continuación se inoculan con 1 mL de suspensión de esporas a la concentración indicada por alveolo con una micropipeta (**foto 8**), menos en el testigo y se tapan las semillas con la turba.

Se mantienen las bandejas en la cámara de cultivo (**foto 9**) donde permanecen 30 días a una temperatura de 25°C. Se riegan con agua y abono a una dosis de 1 g fertilizante/L agua. Como abono se ha utilizado [®]Sumisolub. Cuando empiezan a emerger las plántulas se arranca una de cada alveolo.



Foto 6: Semillas de tomate var. San Pedro.



Foto 7: Siembra de semillas de tomate con pinzas.

Material y Métodos

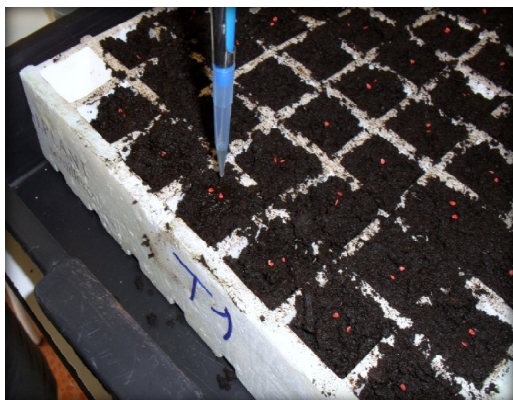


Foto 8: Inoculación de semillas con PAE 1.



Foto 9: Mantenimiento de las plantas en cámara de cultivo.

4.3.1- Evaluación del estado y calidad de las plántulas:

Para el ensayo, en el cuál las semillas son inoculadas a $1 \cdot 10^8$ conidias/mL, a los 30 días de realizar la siembra se procede a la evaluación del estado de las plántulas y a la estimación de la calidad de las mismas mediante la determinación de distintos índices de calidad calculados a partir de la determinación de diferentes parámetros: % de germinación, longitud, número de hojas, diámetro del tallo por debajo de los cotiledones, peso fresco y peso seco. Se escogen 15 plántulas al azar de cada tratamiento para evaluar el estado y la calidad de las mismas.

4.3.2.- Modo de realización:

- Longitud total y altura del primer entrenudo:

Se realizan las medidas con un metro. La longitud se mide desde la superficie del sustrato hasta el ápice de la plántula, usando el mismo criterio para todas las plántulas.

Material y Métodos

- Diámetro del tallo:

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

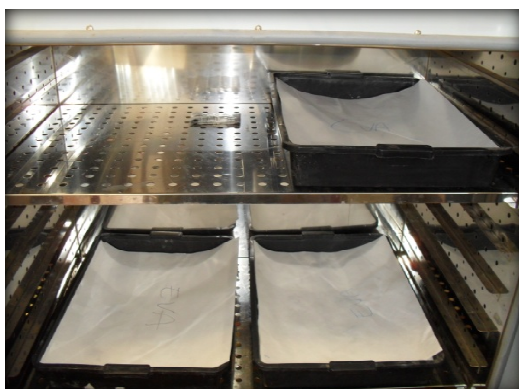
(Foto 14)

- Peso fresco:

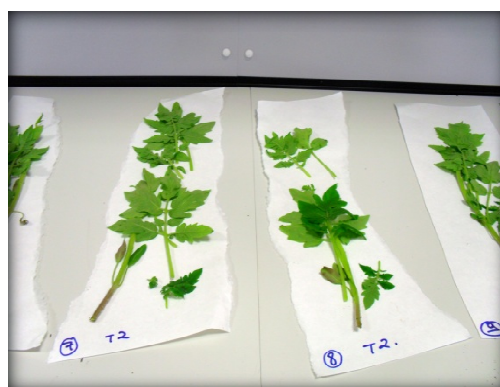
Se pesan las raíces y partes aéreas en la balanza para calcular la materia fresca total por plántula y por sus distintas partes. **(Fotos 13 y 15)**

- Peso seco:

Después de haber medido los distintos parámetros se introducen las raíces y partes aéreas en la estufa a 70 °C durante 48 horas **(foto 10)**, para posteriormente proceder al pesado de las raíces y partes aéreas secas en la balanza de precisión, para calcular la materia seca total por plántula y por sus distintas partes.



de secado.



seas preparadas
nálisis.

Material y Métodos



neado de foliolos.



esado de hojas.



diámetro con el calibre.



esado de raíces.

4.3.3.- Análisis estadístico de los datos obtenidos:

El análisis estadístico se ha realizado con Statgraphics Plus 5.1 con el método SLD al 95% y Excel.

4.3.4.- Replicar las cepas de los microorganismos para su posterior inoculación:

Para replicar se necesita:

- Placas de Petri para cada cepa
- Una lanceta
- Un mechero de alcohol

Material y Métodos

- Bote con alcohol
- Placas de Petri con medio de cultivo agar-malta
- Parafilm

- I. Se empieza replicando una cepa de *Paecilomyces*, cuando se termine la operación se desinfectan los utensilios para no contaminar las sucesivas placas. Se coge la lanceta, se moja en alcohol y se pasa por la llama del mechero de alcohol para esterilizarla.
- II. Con la lanceta se corta un cuadrado del medio de cultivo con PAE 1 y lo colocamos en una placa nueva, o se pasa la lanceta por las zonas donde hay más concentración de esporas y se desliza la punta de la lanceta por el medio de la nueva placa, así sucesivamente. Luego se repite la operación con el resto de cepas de los microorganismos (PAE 2, PAE 3, PAE 4, LEV 4, AIS 29, y AIS 36), previamente desinfectada la zona de trabajo y los materiales.
- III. Una vez replicadas las dos cepas, se sellan las placas con parafilm para que no se contaminen y se dejan 8 días en el laboratorio para que se desarrolle el hongo.

4.3.5.- Preparación de medio de cultivo Agar-malta:

Para la preparación de medio de cultivo agar-malta se necesita:

- 1 Litro de agua destilada
- 17 g de agar
- 17 g de extracto de malta

➤ Modo de preparación:

Se pesan 17 g de agar y 17 g de extracto de malta en una balanza y se introducen en una botella de vidrio, posteriormente se llena la botella con 1 litro de agua destilada y se

Material y Métodos

agita para que quede la mezcla homogénea. Se introduce la botella y dos dosificadores en el autoclave durante 30 minutos a 121°C de temperatura para esterilizar el medio de cultivo.

Se saca la botella con unos guantes y se enfría en agua hasta no quemar.

Se regula el dosificador a 15 mL por placa y se distribuye en placas de Petri en la cámara de flujo laminar, la cual se ha desinfectado con alcohol y colocado un mechero de alcohol para así evitar que se contamine el medio.

Se dejan enfriar las placas en la cámara hasta el momento en que se vayan a replicar los hongos.

4.4.- Evaluación *in vitro* de las actividades enzimáticas:

En la primavera del 2009, se tomaron 10 muestras de hojas de plantas sanas de pimiento y sandía en invernaderos de la Cooperativa Agricultores Ecológicos S.A.T. (Agri Eco), ubicadas en el Paraje Cortijo del Cura, municipio de Pechina, Almería.

De cada hoja se extrajeron discos de 1 cm de diámetro. Los discos fueron desinfectados en una disolución comercial de hipoclorito sódico al 2% (p.c) durante 2 minutos, se lavaron en agua destilada durante 2 minutos y en agua destilada estéril por 2 minutos.

Para aislar los hongos, se utilizó el **Medio PDA (Patata Dextrosa Agar)**:

- 20 g de Agar.
- 15 g de Glucosa.

Se cuecen 200 g de papa en 600 ml de agua destilada. El producto se filtra a través de muselina y el líquido resultante se rellena con agua destilada hasta alcanzar 1 L. Se esteriliza en autoclave durante 30 minutos a 120° C y 15 PSI (1 atmósfera) y se plasmifica en placas de Petri.

Material y Métodos

Se sembraron 2 discos en placas Petri conteniendo el Medio PDA, preparado tal como indican Tello *et al.*, (1991) y 2 discos en cámara húmeda preparadas en placas de Petri con doble discos de papel de filtro humedecido con agua destilada estéril. Las placas se incubaron a temperatura ambiente del laboratorio.

Las colonias obtenidas en el medio PDA y cámara húmeda se agruparon en función de su morfología, y para su mantenimiento, se transfirieron los aislados a placas de Petri con PDA.

Para determinar la presencia de metabolitos (ácido indol acético, sideróforos, fósforo y caseína), se realizaron análisis enzimáticos a los aislados potenciales seleccionados de la microbiota de la filosfera de cultivos de pimiento y sandía. Éstos se complementaron con 6 aislados seleccionados por Santos *et al* (2009) y Santos *et al* (2010) procedentes de suelos supresivos de clavel de la provincia de Cádiz. De estos trabajos, se seleccionaron los aislados que mostraron valores de inhibición “in vitro” superiores al 80%.

Estos aislados se conservaron en micro tubos a menos 20°C. En el momento de su uso, se descongelaron a temperatura ambiente, obteniéndose una suspensión de micelio y esporas para el caso de los hongos y colonias en el caso de las bacterias. Posteriormente, se homogenizaron los aislados con un agitador Vortex y se le obtuvo a cada uno de ellos, una muestra con un asa de metal estéril. Finalmente, se sembraron en placas de Petri agarizadas con los medios Patata Dextrosa Agar (PDA) para los aislados fúngicos y Triptona Soya Agar (TSA) para las bacterias, con el propósito de promover su crecimiento en los medios de cultivo durante 24 horas a 48 horas en función del aislado.

4.4.1.- Análisis de las actividades enzimáticas:

A partir de los aislados fúngicos y bacterianos crecido en medios específicos de PDA y TSA respectivamente, se tomaron muestras con un palillo estéril y se sembraron en placas de Petri con los medios específicos de carboximetil celulosa, leche desnatada, YPD-P. Se incubaron a 30°C durante 48 horas; transcurrido este periodo, se realizaron mediciones de tamaño de halos o zonas de aclaramiento alrededor de las colonias de

Material y Métodos

cada una de las actividades enzimáticas a evaluar. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Para los aislados bacterianos, cada placa de Petri se dividió en ocho partes iguales con el propósito de evaluar a la vez ocho diferentes aislados. Esta evaluación preliminar permitía seleccionar los aislados que mostraran actividad enzimática positiva. En el caso de los aislados fúngicos, las placas se dividieron en dos partes iguales y en cada una, se sembraron con ayuda de un sacabocados, discos de 0,5 cm de diámetro, procurando que la parte de crecimiento del hongo quedara en contacto con el medio de cultivo para favorecer un mejor crecimiento de éste (Foto 16).

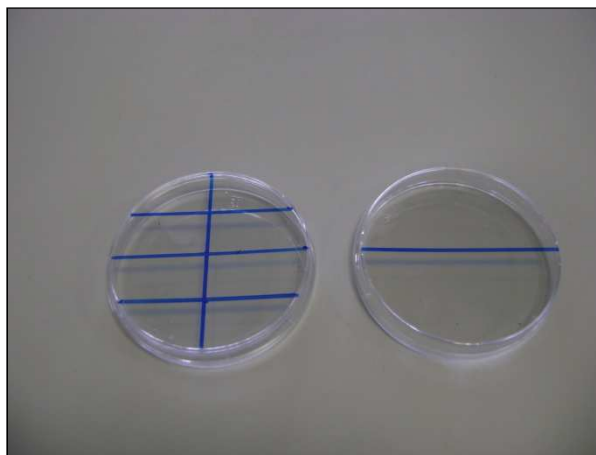


Foto 16: División de las placas Petri para bacterias y hongos.

Los aislados que presentaron halos de degradación positivos o zonas de aclaramiento alrededor de las colonias, fueron tratados individualmente para la medición de éstos en una segunda evaluación.

4.4.2.-Actividad proteolítica:

La actividad proteolítica se determinó directamente por la observación de halos de degradación o zonas de aclaramiento alrededor de las colonias debido a la hidrólisis de la caseína. Para ello, se utilizaron la mezcla de 150 ml de Medio Salino y 1.5 g de leche descremada. El procedimiento fue el siguiente:

Material y Métodos

- Se obtuvo 1 ml de dicha mezcla y se depositó en un micro tubo de 1.50 ml.
- Con la ayuda de un palillo estéril, se tomó una muestra de cada aislado procedente de la placa de Petri y colocó durante unos minutos en el micro tubo (Foto 17).

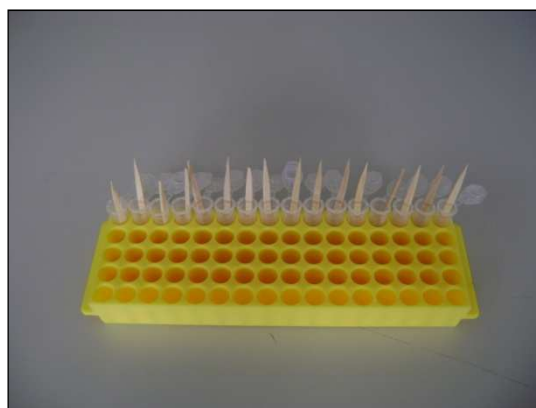


Foto 17: Muestra colocada con palillo estéril en el micro tubo.

- Los aislados en los micros tubos fueron incubados para su multiplicación, en un agitador orbital a 120 rpm, durante 24 horas a 30°C.
- Simultáneamente, se preparó medio de cultivo que favorece **la Actividad proteasa**:
 - 24,5 g Recuento leche desnatada Agar.
- Se mezclaron los componentes en un frasco con capacidad de 1 litro, se agregó 1 litro de agua destilada, se esterilizó en autoclave por 30 minutos a 120°C y 15 psi y se dejó enfriar. Seguidamente se plaquearon placas de Petri nuevas.
- Transcurrido las 24 horas, se colocó en el centro de las placas nuevas, un disco de filtro estéril de 0,5 cm de diámetro.
- Se tomaron una alícuota 10 µl de cada micro tubo previamente incubado durante 24 horas y se añadió sobre el disco.

Material y Métodos

- Se incubaron las placas durante 48 horas a 30°C para favorecer la aparición del halo de inhibición.
- Transcurrido este periodo, se procedió a medir los halos alrededor de las colonias.

4.4.3.- Solubilización del fósforo:

La actividad proteolítica se determinó directamente por la observación de halos de solubilización o zonas de aclaramiento alrededor de las colonias, que cuantifica la cantidad de enzima fosfatasa producida por microorganismos fosfato solubilizadores. Para ello, se utilizaron 150 ml de Medio Salino y el 1.5 gr de glucosa. El procedimiento fue el siguiente:

- Se obtuvo 1 ml de dicha mezcla y se depositó en un micro tubo de 1.50 ml.
- Con la ayuda de un palillo estéril, se tomó una muestra de cada aislado procedente de la placa de Petri y colocó durante unos minutos en el micro tubo.
- Los aislados en los micros tubos fueron incubados para su multiplicación, en un agitador orbital a 120 rpm, durante 24 horas a 30°C.
- Simultáneamente, se preparó medio de cultivo que favorece **la Solubilización del fósforo**:
 - 5 g de Extracto de levadura.
 - 10 g de Glucosa.
 - 2 g de Fosfato Trisódico.
 - 20 g de Agar.
- Se mezclaron los componentes en un frasco con capacidad de 1 litro, se agregó 1 litro de agua destilada, se esterilizó en autoclave por 30 minutos a 120°C y 15 psi y se dejó enfriar. Seguidamente se plaquearon placas de Petri nuevas.
- Transcurrido las 24 horas, se colocó en el centro de las placas nuevas, un disco de filtro estéril de 0,5 cm de diámetro.

Material y Métodos

- Se tomaron una alícuota 10 µl de cada micro tubo previamente incubado durante 24 horas y se añadió sobre el disco.
- Se incubaron las placas durante 48 horas a 30°C para favorecer la aparición del halo de inhibición.
- Transcurrido este periodo, se procedió a medir los halos alrededor de las colonias.

4.4.4.- Producción de Sideróforos:

La producción de sideróforos por algunos organismos microbianos tiene como modo de acción el secuestro de hierro, convirtiendo éste elemento en el factor limitante de la rizosfera, además de su papel en la inducción de resistencia. Para la determinación cuantitativa de estos metabolitos, se utilizó el **Medio Caldo Casimino Ácido (CAS)**:

- 5 g Caldo Casamino Acido (CAS).
- 1 g K_2HPO_4 .
- 0.25 g $Mg SO_4$.

Se preparó en un frasco, la mezcla del K_2HPO_4 y $Mg SO_4$, llevándolo a 1 L con agua destilada y se esterilizó en autoclave por 30 minutos a 120°C y 15 psi. Se Dejó enfriar y se mezcló con el CAS, que ha sido previamente filtrado por una membrana Nalgene® de 0.2 µl de 150 ml.

El procedimiento fue el siguiente:

- Con una micro pipeta, se extrajo una alícuota de 1 ml de Medio CAS y se puso en un micro tubo de 1.5 ml.
- Con un palillo estéril, se tomaron una pequeña muestra de cada uno de los antagonista previamente repicados en placas de Petri agarizados con PDA (para hongos) o TSA (para bacterias) y se colocaron en el micro tubo.
- Se incubaron en un agitador orbital a 120 rpm durante 24 horas a 30°C.

Material y Métodos

- Cumplido el periodo de incubación, de cada muestra, se prepararon 4 submuestras en las que se agregaron 1 ml de Medio Caldo Casimino Ácido (CAS) y 50 μ L de la suspensión que contenían los micro tubos donde habían crecido tanto las bacterias como los hongos.
- Estos se incubaron en un agitador orbital a 120 rpm por 48 horas a 30°C, con el propósito de multiplicar los microorganismos.
- Cumplido las 48 horas, se centrifugan a 6.000 rpm durante 4 minutos para decantar las células de los microorganismos.
- Del sobrenadante, se determina la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro. La concentración es expresada en μ M de sideróforos por 10^8 UFC/ml de bacterias, correspondiente a una turbidez del 0.5 de la escala de Mac Farland. Se escogió 300 como factor de medición.

Para la determinación de la producción de sideróforos, además del Medio CAS, se utilizó usando el mismo procedimiento **el Medio KING B:**

- 10 g Peptona bacteriológica.
- 10 ml Glicerol 87%.
- 1.5 g Mg SO₄.
- 10 g Triptona.

Se mezclaron los componentes en un frasco con capacidad de 1 litro, se agregó 1 litro de agua destilada, se esterilizó en autoclave por 30 minutos a 120°C y 15 psi y se dejó enfriar.

4.4.5.- Producción de Ácido Idol Acético:

Para determinar la Producción de Ácido Idol Acético por las bacterias y hongos seleccionados, éstos se hicieron crecer en **Medio TBS:**

- 2,5 g/l de PO₄H₂K.
- 17 g/l de Peptona Caseína.

Material y Métodos

- 3 g/l de Peptona Soja.
- 5 g/l de Cl Na.
- 2,5 g/l de Glucosa.

El Medio TBS fue evaluado mediante la adición de triptófano (2.5 gr/L) como inductor del Ácido Idol Acético y sin triptófano (Foto 18).

El procedimiento fue el siguiente:

- Se añadió 1 ml del Medio con triptófano en un micro tubo de 1.5 ml.
- Con un palillo estéril, se tomaron una pequeña muestra de cada uno de los antagonistas previamente repicados en placas de Petri agarizados con PDA o TSA y se colocaron en el micro tubo.
- Los micros tubos se incubaron en un agitador orbital a 120 rpm durante 48 horas a 30°C. Las muestras se realizaron por duplicado.
- Cumplido las 48 horas, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 4 minutos para decantar las células de los microorganismos.
- Al sobrenadante de los dos micros tubo de cada aislado, se le añadieron 1 ml en un tubo de cristal con capacidad de 150 ml y se le agregaron 4 ml de **Reactivo Salkowsky** (150 ml H₂SO₄, 7,5 ml FeCl₃ 0,5M, 250 ml de H₂O y se llevó a 4°C).
- Para establecer la intensidad y sensibilidad de la reacción del reactivo de Salkowsky, se realizó una curva de calibración con el reactivo de Salkowsky (Foto 19).

Material y Métodos



Foto 18: Medio TBS para la producción de AIA con y sin triptófano.



Foto 19: Adición del reactivo de Salkowsky.

- Seguidamente, se preparó un patrón de diferentes concentraciones (1, 2, 5, 25 y 50 ppm) de ácido indol acético (AIA) al 98%.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia con un espectrofotómetro (Spectrafuge-24D, Labnet International, Inc) a 535nm obteniéndose así la curva de calibración. Factor de medición 300.

Material y Métodos

- Se midieron las muestras que presentaban el sobrenadante con el reactivo de Salkowsky en las mismas condiciones que para la curva de calibrado para determinar la recta de regresión.
- Se repitió el mismo proceso haciendo crecer los aislados en Medio TBS pero sin triptófano.

5. Resultados

5.1.- Introducción:

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los ensayos, donde se inocularon las semillas, mezcladas en turba, con *Paecilomyces*, PAE 1, PAE 2, PAE 3, PAE 4, una levadura, LEV 4, y dos aislados más, AIS 29, y AIS 36 a una concentración de conidias conocidas de $1 \cdot 10^8$ por mL procedientes de suelos supresivos en los que se va a evaluar la capacidad promotora del crecimiento. Todos los resultados han sido analizados siguiendo un ANOVA simple según el método LSD (Least Significant Difference) al 95%.

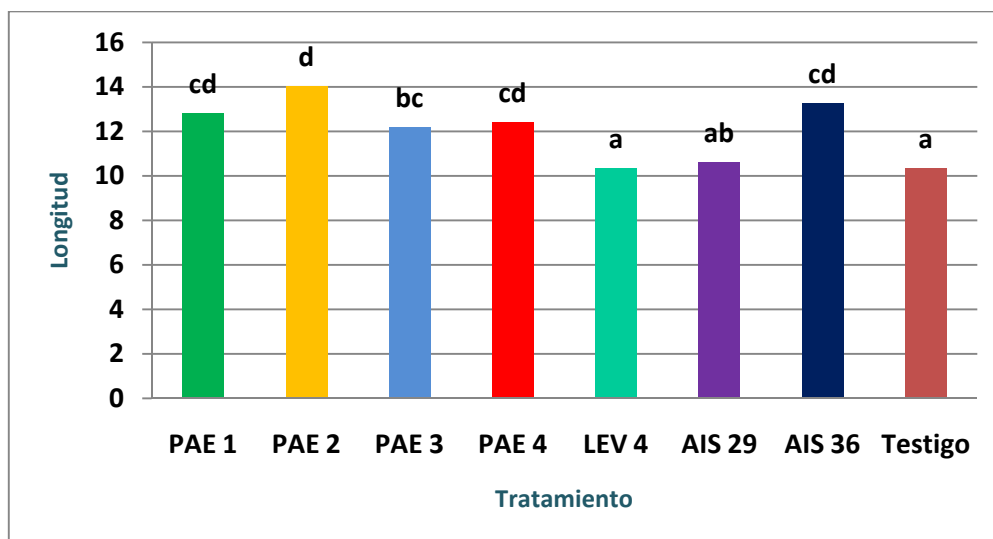
Además, se ha evaluado la actividad enzimática de los aislados: PAE 1, PAE 2, PAE 3, PAE 4, LEV 4, AIS 29, AIS 36, y además dos cepas de *Trichodermas*, T1 y T2, en las que está demostrado su efecto promotor de crecimiento, de manera que se puedan comparar sus efectos. Los aislados seleccionados se caracterizaron *in vitro* para determinar a partir de análisis enzimáticos la producción de ácido indol acético (AIA), sideróforos, solubilización del fosforo, y la actividad proteolítica.

5.2- Evaluación de la capacidad bioestimulante de cuatro cepas de *Paecilomyces*, PAE 1, PAE 2, PAE 3, PAE 4, una levadura, LEV 4, y dos aislados, AIS 29, y AIS 36, en inoculación directa sobre las semillas a $1 \cdot 10^8$ conidias/mL.

5.2.1.- Resultados obtenidos en las distintas mediciones del ensayo en función de su tratamiento:

Resultados

- Longitud:

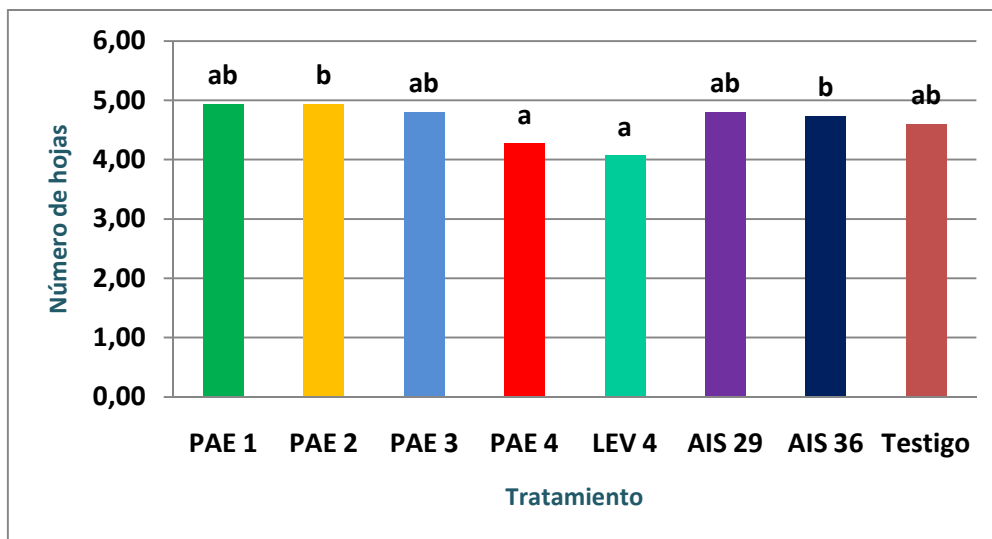


Gráfica 1: Longitud (cm) de plántulas del ensayo, correspondientes a la inoculación en semilla a una dosis de inóculo de $1 \cdot 10^8$ conidias/mL. Comparación con un testigo. (ANOVA, LSD 95%)

Como se puede comprobar en la **gráfica 1** se observa que la longitud media alcanzada en las plantas inoculadas con PAE 2 es mayor que en el resto de tratamiento, aunque también destacan PAE 1, PAE 3, PAE 4, AIS 29 y AIS 36, presentándose una diferencia significativa (LSD al 95%) respecto a LEV 4 y al testigo.

Resultados

- Número de hojas:

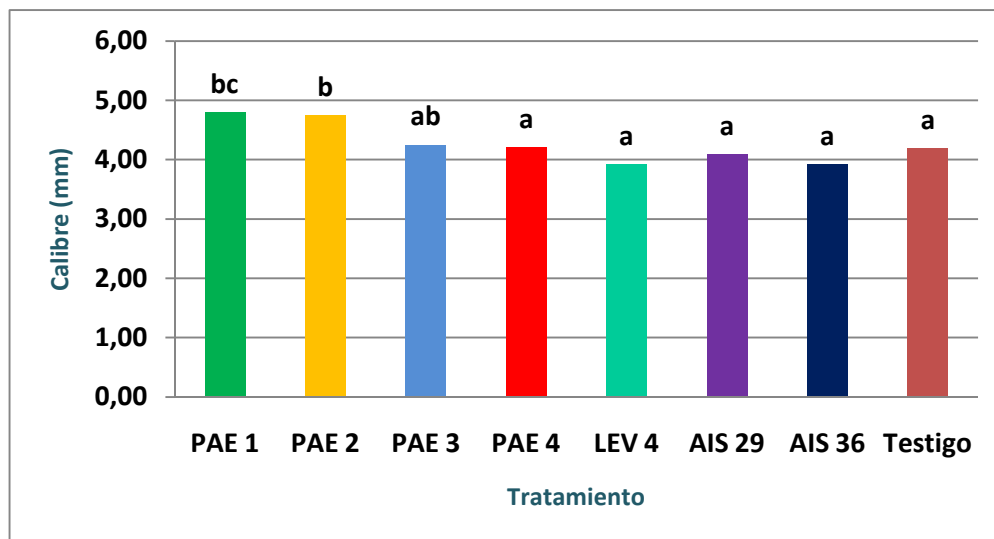


Gráfica 2: Número de hojas verdaderas para el ensayo de inoculación en semilla a una dosis de inóculo de $1 \cdot 10^8$ conidias/mL. Comparación con un testigo. (ANOVA LSD 95%)

En la **gráfica 2** se puede observar que el número de hojas verdaderas alcanzado en las plantas inoculadas con PAE 2 es mayor que en los demás casos, presentándose una diferencia significativa LSD al 95% con el resto de tratamientos. Las plantas correspondientes a las inoculaciones con PAE 4 y LEV 4 son los que menos hojas han desarrollado, respecto al resto.

Resultados

- Calibre:

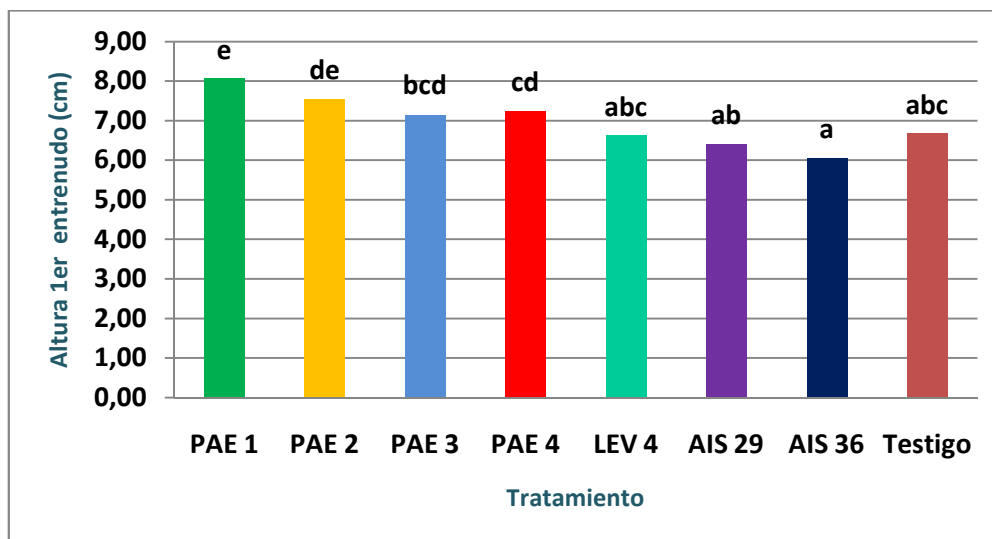


Gráfica 3: Calibre de plántulas (mm) para el ensayo correspondiente a la inoculación en semilla a una dosis de inóculo de $1 \cdot 10^8$ conidias/mL. Comparación con un testigo. (ANOVA LSD 95%)

Como se puede comprobar en la **gráfica 3**, el calibre del tallo alcanzado en las plantas inoculadas con PAE 2 es mayor que los demás casos, también destacando PAE 1 algo menos, presentándose una diferencia significativa LSD al 95%.

Resultados

- Altura hasta el primer entrenudo:

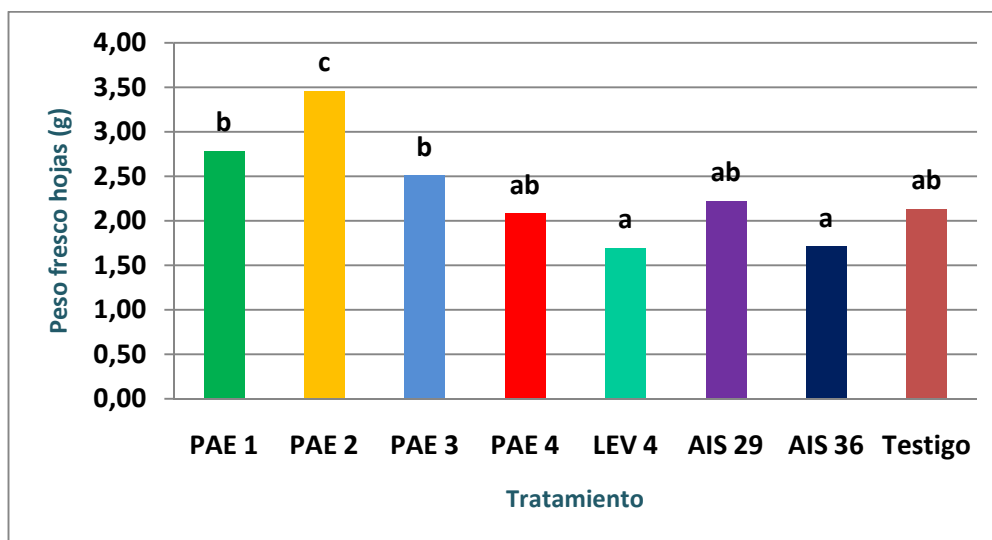


Gráfica 4: Altura del primer entrenudo de plántulas (cm) para el ensayo correspondiente a la inoculación en semilla a una dosis de inóculo de $1 \cdot 10^8$ conidias/mL. Comparación con un testigo. Comparación con un testigo. (ANOVA LSD 95%)

En la **gráfica 4** se aprecia que la altura del primer entrenudo alcanzada en las plantas inoculadas con PAE 1, es mayor que en el caso de las otras inoculaciones, presentándose una diferencia significativa LSD al 95%. Destaca PAE 2 por tener la segunda mejor media de altura hasta el primer entrenudo ; y la inoculación de AIS 36 siendo la media que menos altura ha tenido.

Resultados

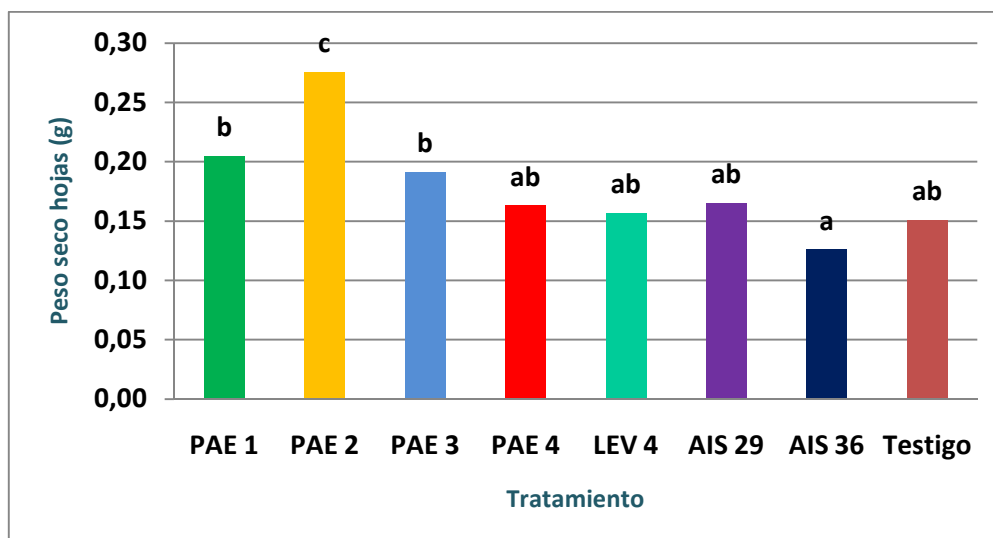
- Peso fresco y peso seco de las hojas:



Gráfica 5: Peso fresco de las hojas (g) para el ensayo correspondiente a la inoculación en semilla a una dosis de inóculo de $1 \cdot 10^8$ conidias/mL. Comparación con un testigo. (ANOVA LSD 95%)

Como se puede comprobar en la **gráfica 5**, el peso fresco de las hojas alcanzado en las plantas inoculadas con PAE 2 es mucho mayor que en el caso de las demás inoculaciones, presentándose una diferencia significativa LSD al 95% entre todos ellos. No obstante el peso fresco no es un buen indicador de la promoción de crecimiento en una planta.

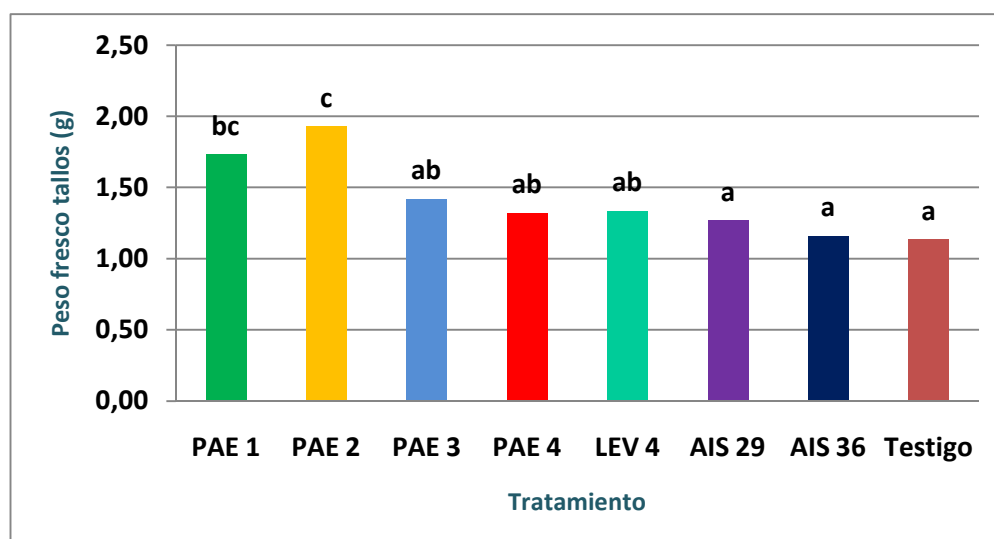
Resultados



Gráfica 6: Peso seco de las hojas (g) para el ensayo correspondiente a la inoculación en semilla a una dosis de inóculo de $1 \cdot 10^8$ conidias/mL. Comparación con un testigo. (ANOVA LSD 95%)

Como se observa en la **gráfica 6**, el peso seco de las hojas alcanzado en las plantas inoculadas con PAE 2 es mucho mayor que en el resto de casos, aunque también destacan PAE 1 y PAE 3 presentándose una diferencia significativa LSD al 95%.

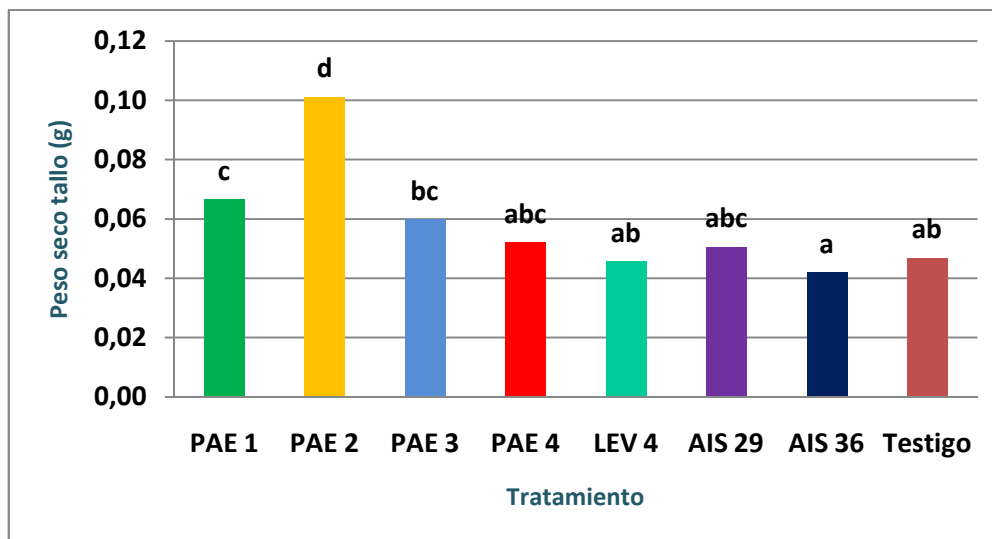
- Peso fresco y peso seco de los tallos:



Gráfica 7: Peso fresco de los tallos (g) para el ensayo correspondiente a la inoculación en semilla a una dosis de inóculo de $1 \cdot 10^8$ conidias/mL. Comparación con un testigo. (ANOVA LSD 95%)

Resultados

Como se puede comprobar en la **gráfica 7**, el peso fresco de los tallos alcanzado en las plantas inoculadas con PAE 2 es mayor que en el caso de las demás inoculaciones, y algo menos pero también mayores las demás PAE y LEV 4, presentándose una diferencia significativa LSD al 95% entre todos ellos.

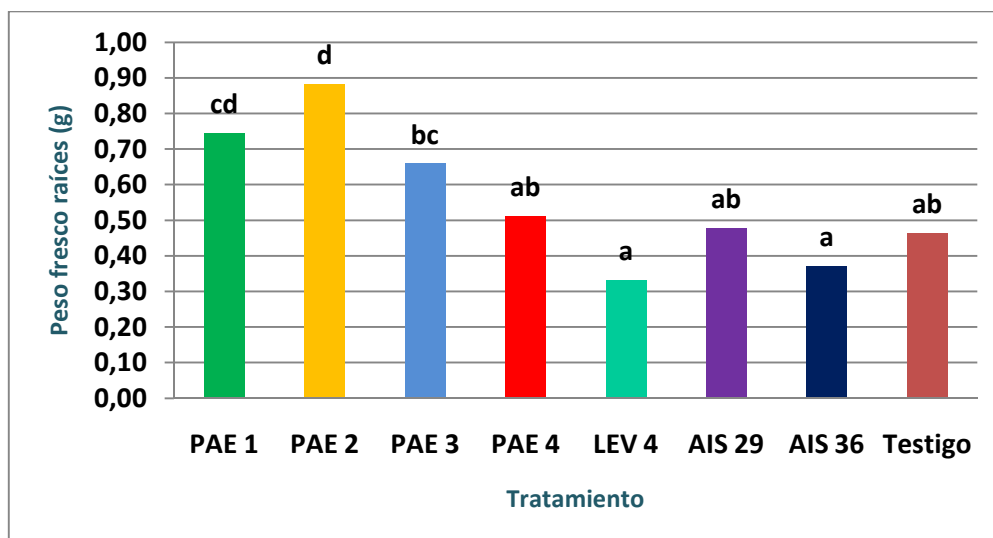


Gráfica 8: Peso seco de los tallos (g) para el ensayo correspondiente a la inoculación en semilla a una dosis de inóculo de $1 \cdot 10^8$ conidias/mL. Comparación con un testigo. (ANOVA LSD 95%)

En la **gráfica 8** se observa que el peso seco de los tallos alcanzado en las plantas inoculadas PAE 2 es mucho mayor que en el caso del testigo, aunque también destaca PAE 1, presentándose una diferencia significativa LSD al 95%.

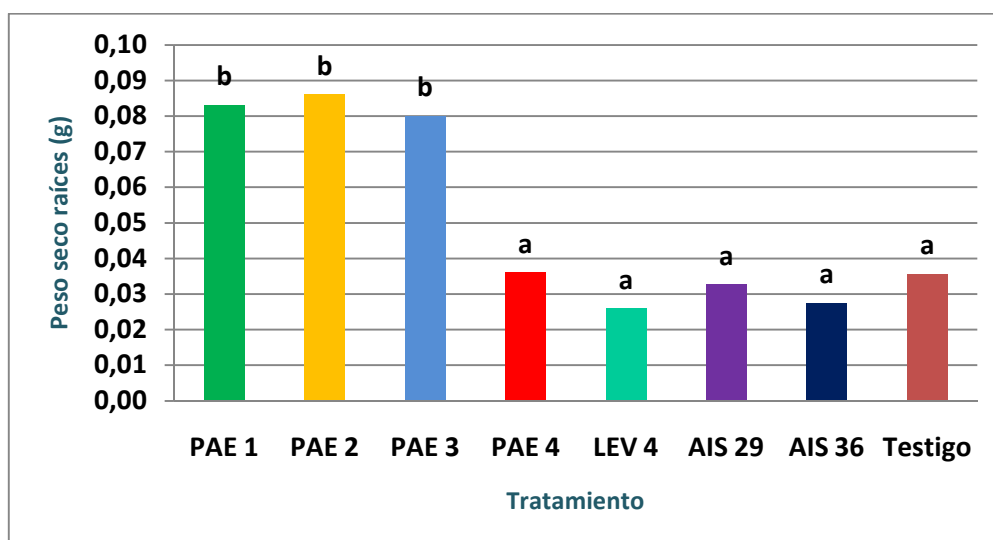
Resultados

- Peso fresco y peso seco de las raíces:



Gráfica 9: Peso fresco de las raíces (g) para el ensayo correspondiente a la inoculación en semilla a una dosis de inóculo de $1 \cdot 10^8$ conidias/mL. Comparación con un testigo. (ANOVA LSD 95%)

En la **gráfica 9** se observa que el peso fresco de las raíces alcanzado en las plantas inoculadas con PAE 2 es mucho mayor que en el caso del testigo, aunque destaca también PAE 1, presentándose una diferencia significativa LSD al 95%.



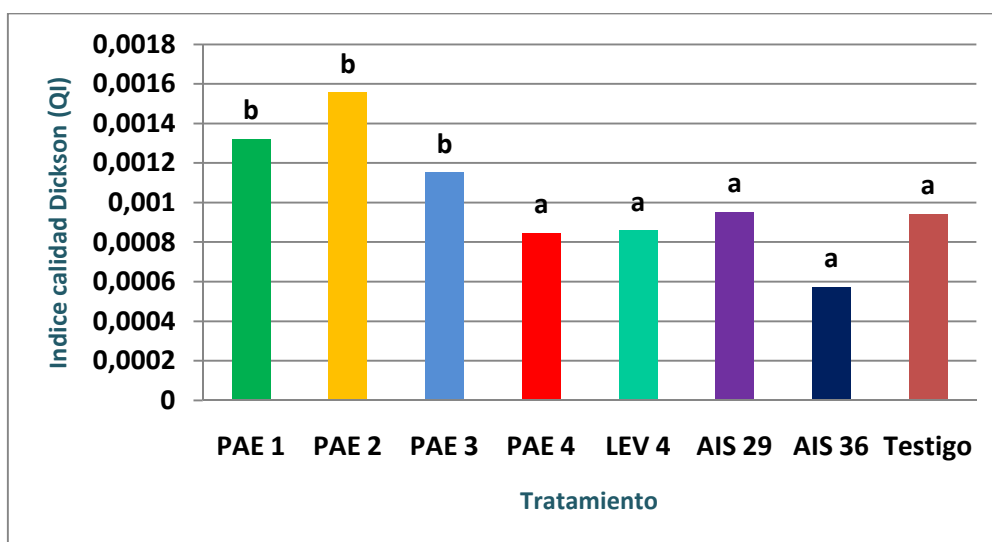
Gráfica 10: Peso seco de las raíces (g) para el ensayo correspondiente a la inoculación en semilla a una dosis de inóculo de $1 \cdot 10^8$ conidias/mL. Comparación con un testigo. (ANOVA LSD 95%)

Resultados

Como podemos comprobar en la **gráfica 10**, el peso seco de las raíces alcanzado en las plantas inoculadas con PAE 1, PAE 2, Y PAE 3 son mayores que en el resto de casos, presentándose una diferencia significativa LSD al 95%.

5.2.2.- Análisis de: Índice de calidad de Dickson (QI), Índice tallo raíz (ITR), e Índice de esbeltez:

- Índice de calidad de Dickson (QI, Dickson Quality Index) (Dickson *et al.*, 1960) para el ensayo:



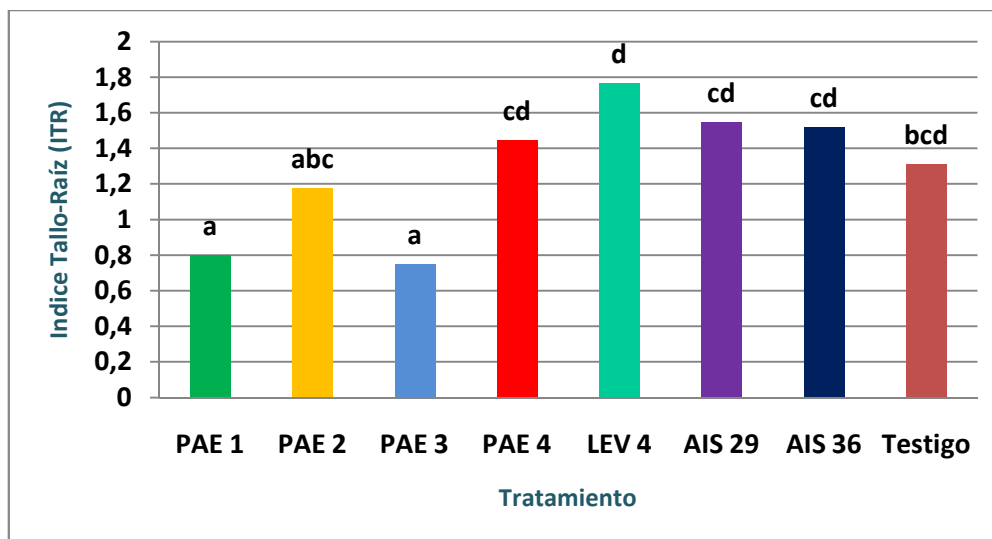
Gráfica 11: Índice de calidad de Dickson (QI), para el ensayo correspondiente a la inoculación en semilla a una dosis de inóculo de 1×10^8 conidias/mL. Comparación con un testigo. (ANOVA LSD 95%)

Como podemos comprobar en la **gráfica 11** se observa que el Índice de calidad de Dickson es mayor en las plantas inoculadas con PAE 1, PAE 2, y PAE 3 que en el resto de los tratamientos, presentándose una diferencia significativa LSD al 95%.

El índice de calidad de Dickson ajusta el efecto del tamaño de la planta, por lo que un aumento en el índice representa a plantas de mejor calidad, por lo que los mejores resultados son los de PAE 1, PAE 2 y PAE 3.

Resultados

- Índice tallo raíz (ITR) (Iverson, 1984) para el ensayo:



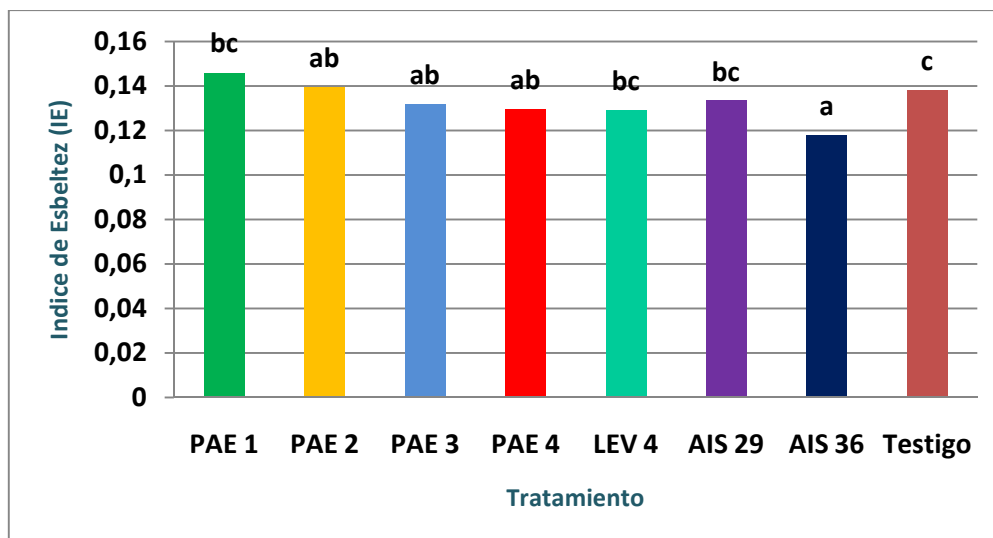
Gráfica 12: Índice tallo raíz (ITR) para el ensayo 2 correspondiente a la inoculación en semilla a una dosis de inóculo de $1 \cdot 10^8$ conidias/mL. Comparación con un testigo. (ANOVA LSD 95%)

Como podemos comprobar en la **gráfica 12** se observa que el Índice tallo-raíz es mayor en las plantas inoculadas con LEV 4 que en el caso de los demás tratamientos, presentándose una diferencia significativa LSD al 95%. Los tratamientos de menos índice son PAE 1, y PAE 3.

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. Por lo tanto, los mejores índices son los de PAE 1 y PAE 3.

Resultados

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



Gráfica 13: Índice de esbeltez de Schmidt-Vogt (IE) para el ensayo correspondiente a la inoculación en semilla a una dosis de inóculo de 1×10^8 conidias/mL. Comparación con un testigo. (ANOVA LSD 95%)

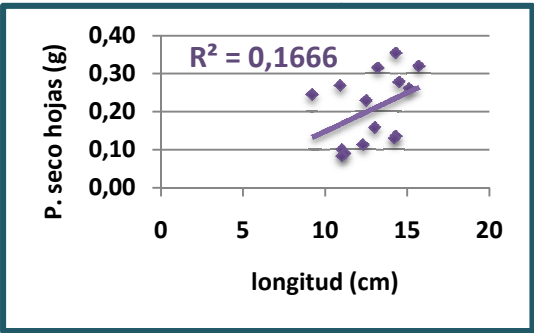
Como podemos comprobar en la **gráfica 13** se observa que el Índice de esbeltez es mayor en las plantas testigo que en el caso de los demás tratamientos, presentándose una diferencia significativa LSD al 95%.

Según el índice de esbeltez propuesto por Schmidt-Vogt (1980), 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.

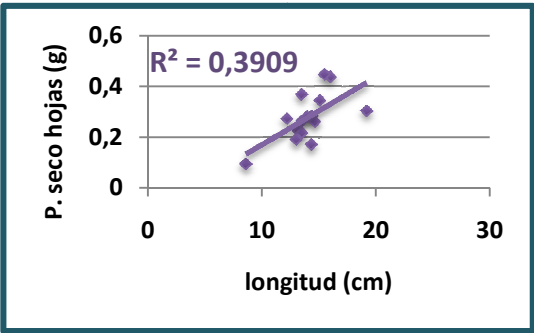
Resultados

5.2.3.- Correlaciones entre los distintos parámetros:

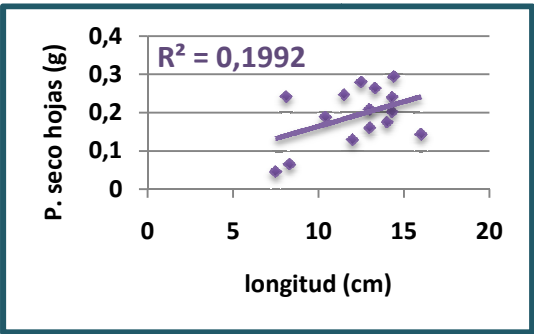
- Correlaciones con longitud:



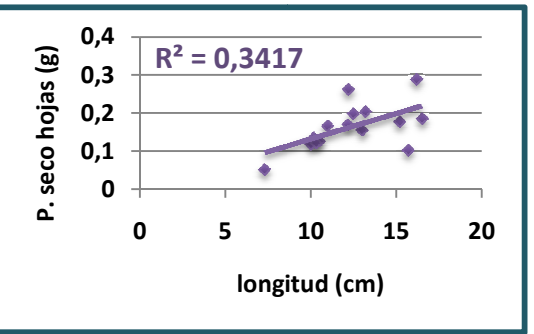
a longitud de la
roja en g para el
inoculación en
s de inóculo de
LSD 95%)



ntre la longitud de la
seco hoja en g para el
a la inoculación en
i dosis de inóculo de
OVA LSD 95%)

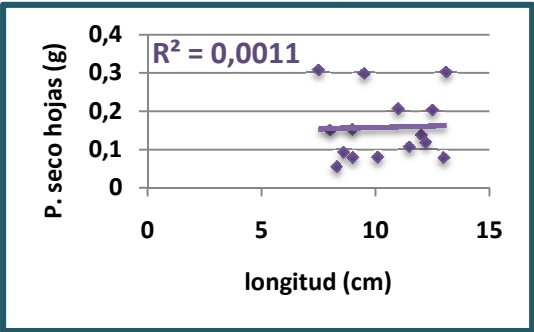


a longitud de la
roja en g para el
inoculación en
s de inóculo de
LSD 95%)

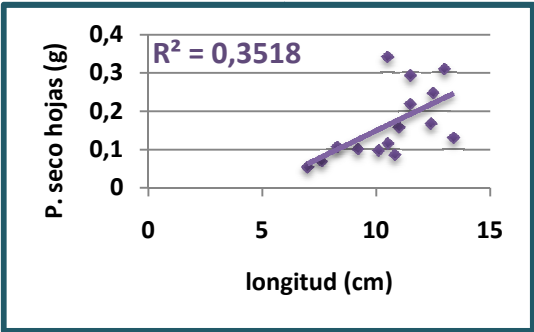


re la longitud de la
eco hoja en g para el
la inoculación en
dosis de inóculo de
VA LSD 95%)

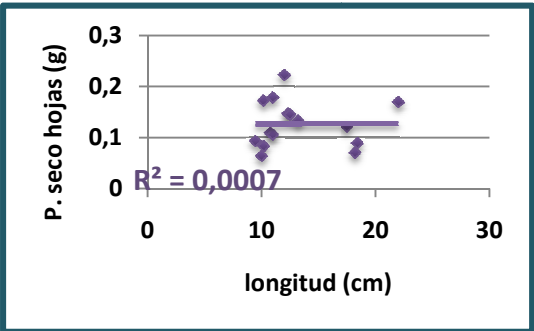
Resultados



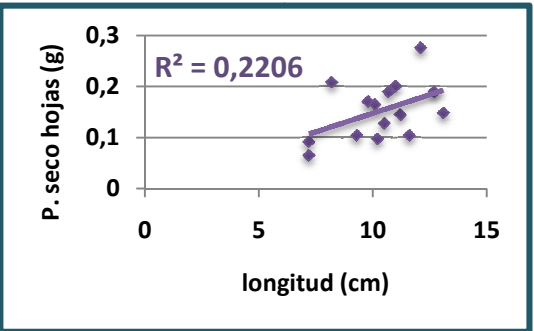
longitud de la
e las hojas en g
diente a la
V 4 a una dosis
s/mL. (ANOVA



ntre la longitud de la
seco de las hojas en g
respondiente a la
con AIS 29 a una
 $1 \cdot 10^8$ conidias/mL.

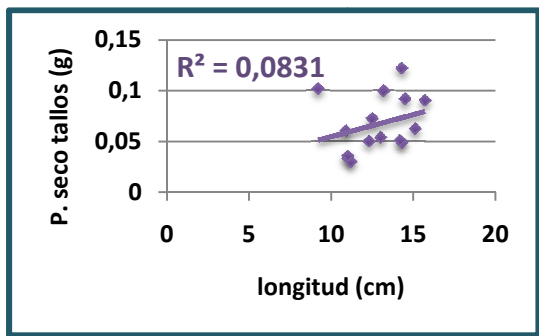


a longitud de la
roja en g para el
inoculación en
is de inóculo de
LSD 95%)

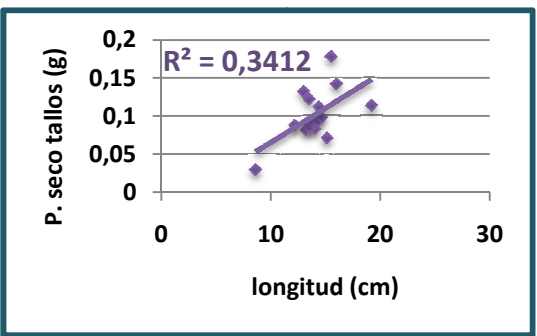


ntre la longitud de la
seco hoja en g para el
el testigo. (ANOVA

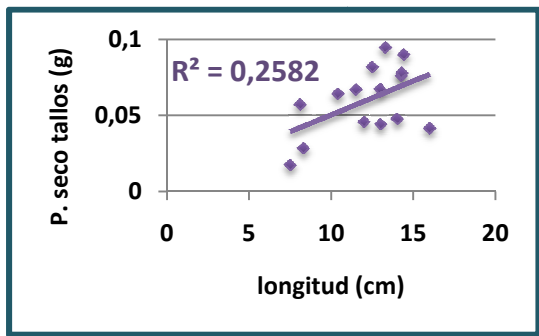
Resultados



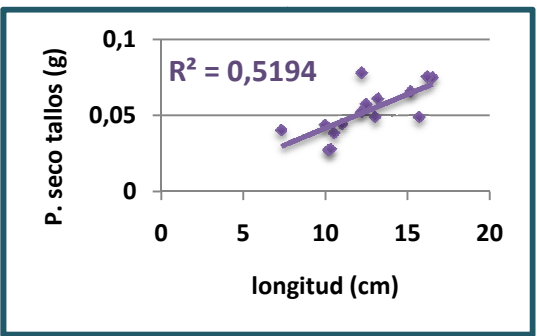
entre la longitud de la
planta en g para el
inoculador en
dosis de inóculo de
LSD 95%)



entre la longitud de la
planta en g para el
inoculador en
dosis de inóculo de
OVA LSD 95%)

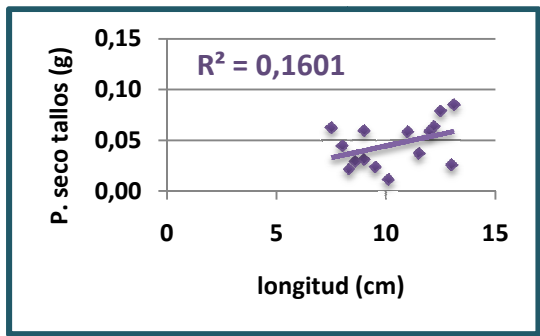


entre la longitud de la
planta en g para el
inoculador en
dosis de inóculo de
LSD 95%)

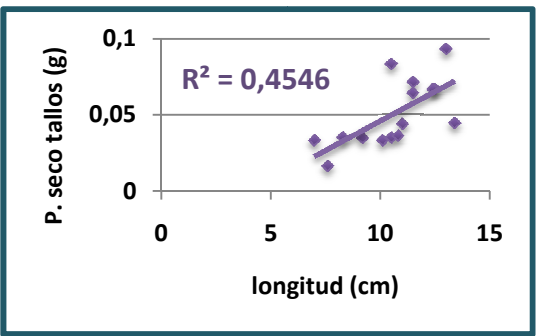


entre la longitud de la
planta en g para el
inoculador en
dosis de inóculo de
OVA LSD 95%)

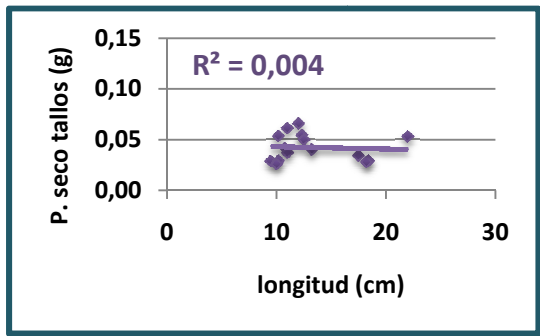
Resultados



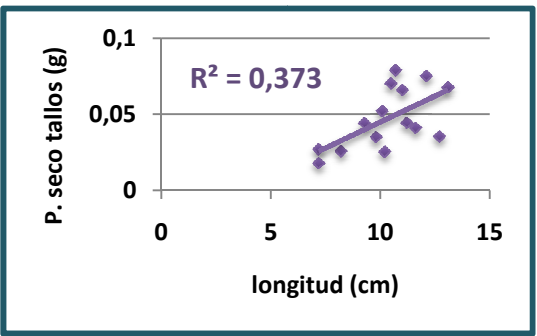
a longitud de la
:allo en g para el
inoculación en
s de inóculo de
LSD 95%)



ntre la longitud de la
eco del tallo en g para
a la inoculación en
a dosis de inóculo de
OVA LSD 95%)

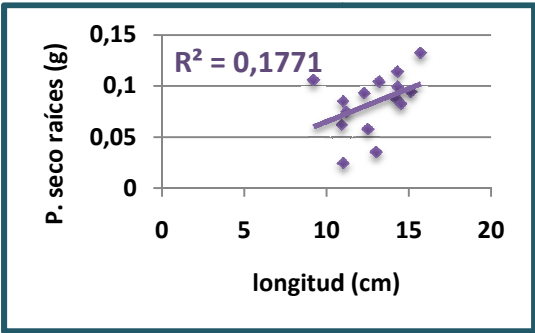


a longitud de la
:allo en g para el
inoculación en
is de inóculo de
LSD 95%)

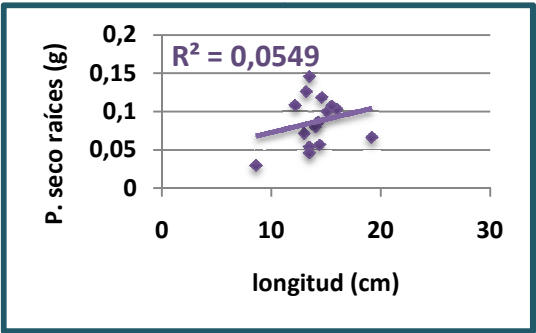


ntre la longitud de la
seco tallo en g para el
el testigo. (ANOVA

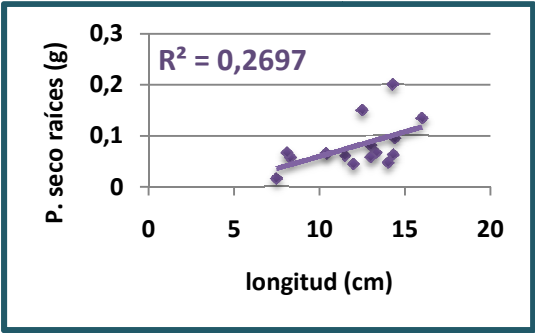
Resultados



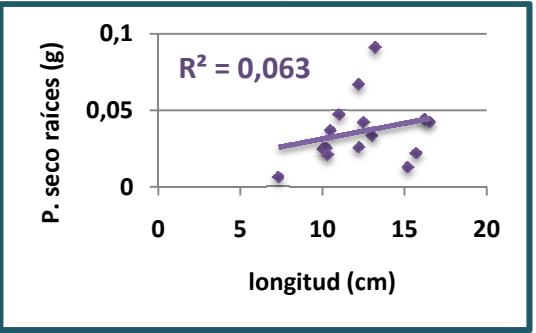
entre la longitud de la raíz y el peso seco de las raíces en g respondiente a la concentración de PAE 1 a una dosis de 10⁶ conidias/mL. (ANOVA)



entre la longitud de la raíz y el peso seco de las raíces en g respondiente a la concentración de PAE 2 a una dosis de 10⁶ conidias/mL. (ANOVA)

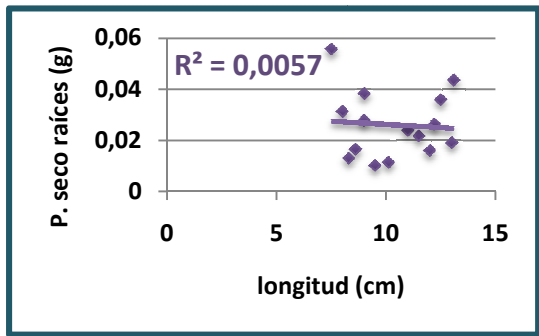


entre la longitud de la raíz y el peso seco de las raíces en g respondiente a la concentración de PAE 3 a una dosis de 10⁶ conidias/mL. (ANOVA)

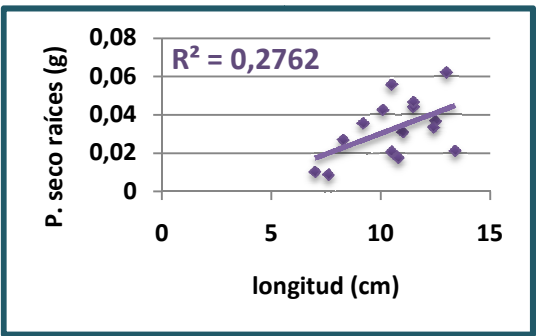


entre la longitud de la raíz y el peso seco de las raíces en g respondiente a la concentración de PAE 4 a una dosis de 10⁶ conidias/mL. (ANOVA)

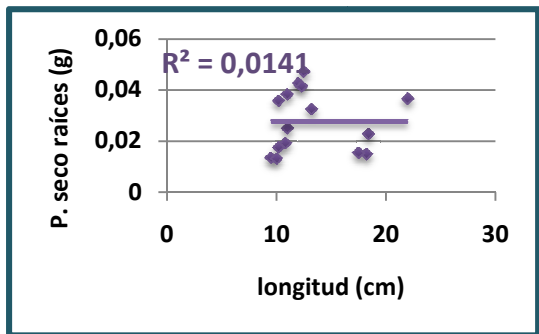
Resultados



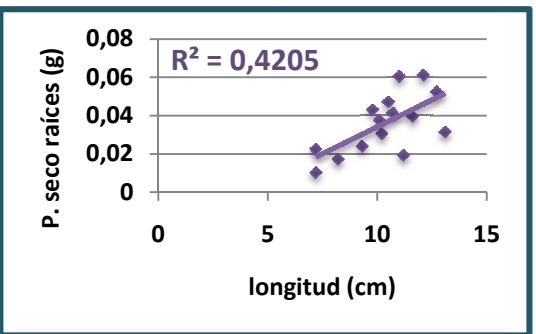
longitud de la
e las raíces en g
diente a la
V 4 a una dosis
s/mL. (ANOVA



ntre la longitud de la
seco de las raíces en g
respondiente a la
con AIS 29 a una
 $1 \cdot 10^8$ conidias/mL.



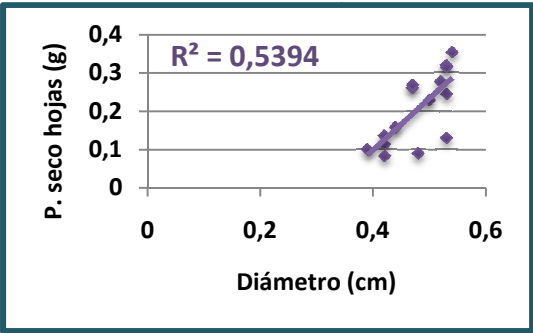
a longitud de la
aíces en g para el
inoculación en
is de inóculo de
LSD 95%)



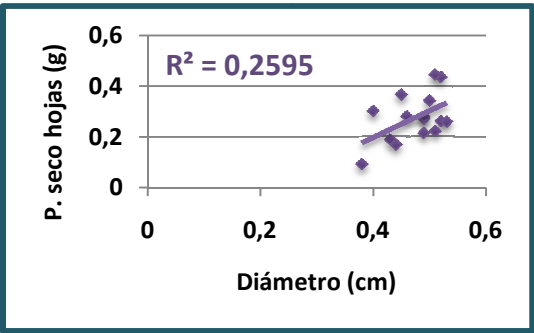
ntre la longitud de la
eco raíces en g para el
a el testigo. (ANOVA

Resultados

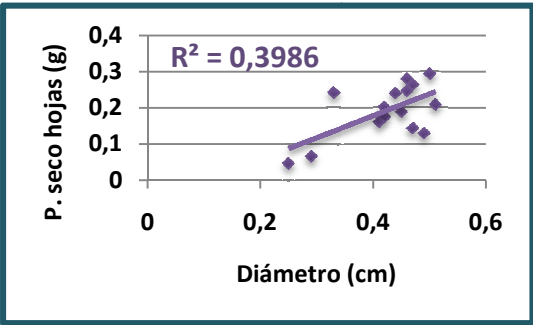
- Correlación con diámetro:



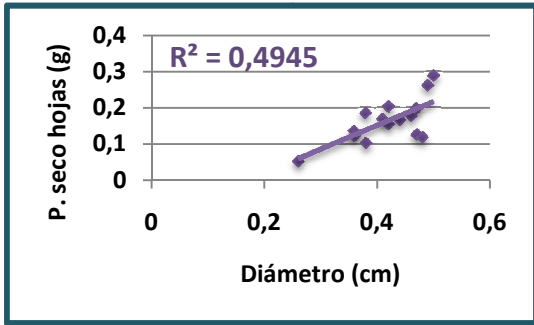
entre el diámetro de la
de las hojas en g
ndiente a la
AE 1 a una dosis
is/mL. (ANOVA



entre el diámetro de la
seco de las hojas en g
respondiente a la
i con PAE 2 a una
1*10⁸ conidias/mL.

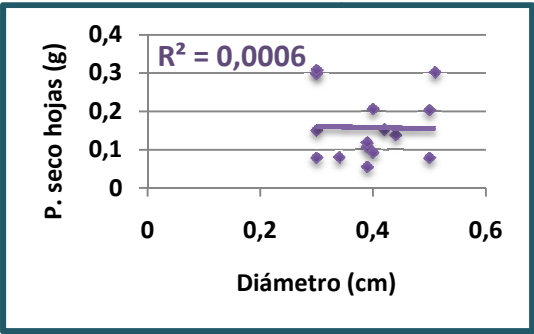


entre el diámetro de la
de las hojas en g
ndiente a la
AE 3 a una dosis
is/mL. (ANOVA

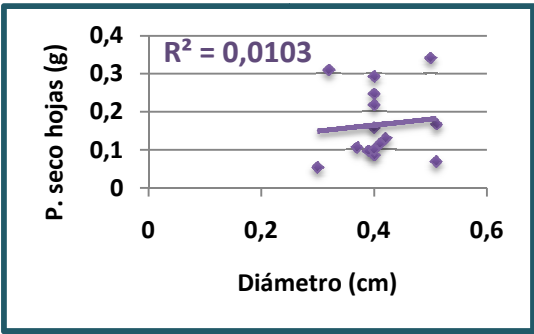


entre el diámetro de la
seco de las hojas en g
respondiente a la
on PAE 4 a una dosis
onidias/mL. (ANOVA

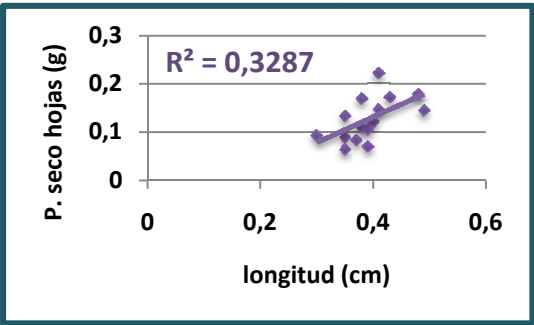
Resultados



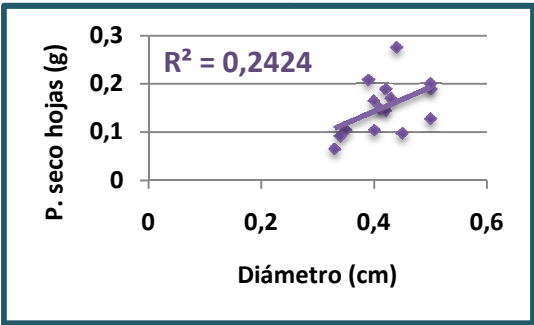
entre el diámetro de la
de las hojas en g
ndiente a la
ndiente a la
con AIS 4 a una dosis
de 10^8 conidias/mL. (ANOVA)



entre el diámetro de la
seco de las hojas en g
respondiente a la
con AIS 29 a una
dosis de 10^8 conidias/mL.

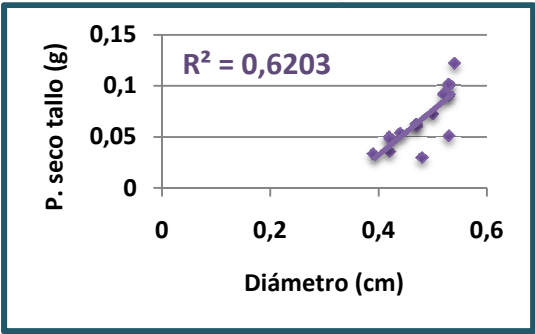


entre el diámetro de la
de las hojas en g
ndiente a la
ndiente a la
con AIS 36 a una
dosis de 10^8 conidias/mL.

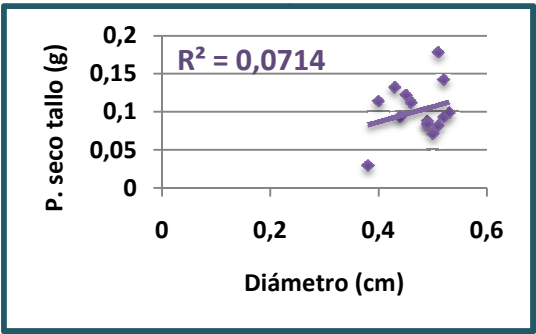


entre el diámetro de la
seco del tallo en g para
ndiente al testigo.

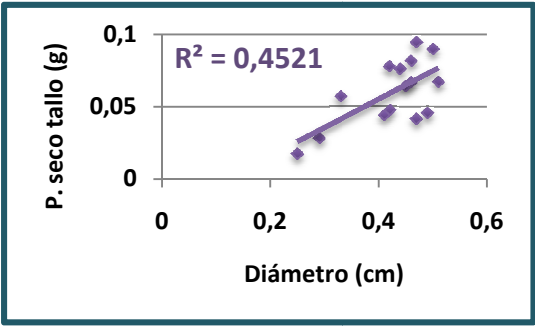
Resultados



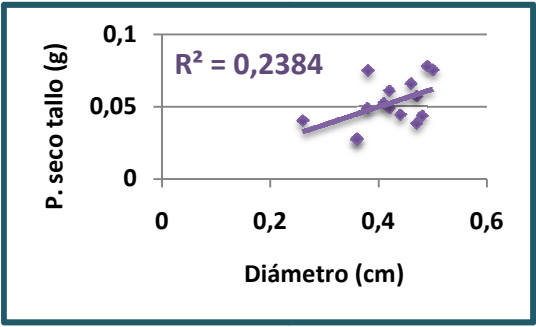
entre el diámetro de la
el tallo en g para
inoculación en
s de inóculo de
LSD 95%)



entre el diámetro de la
seco del tallo en g para
e a la inoculación en
1 dosis de inóculo de
IOVA LSD 95%)

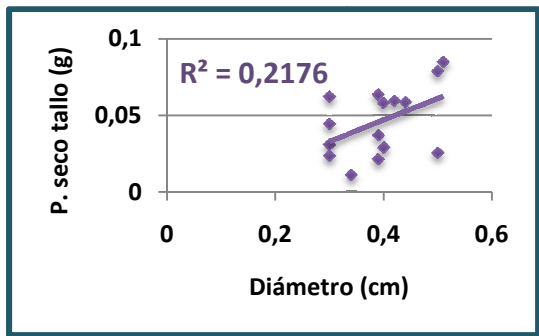


entre el diámetro de la
el tallo en g para
inoculación en
s de inóculo de
LSD 95%)

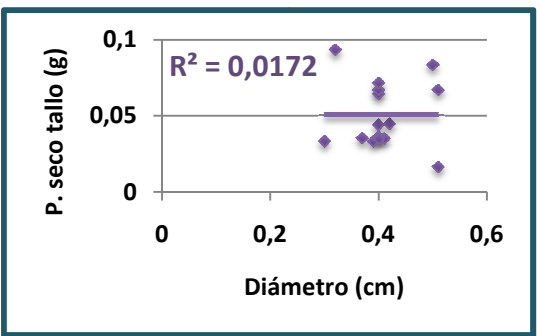


entre el diámetro de la
eco del tallo en g para
a la inoculación en
1 dosis de inóculo de
OVA LSD 95%)

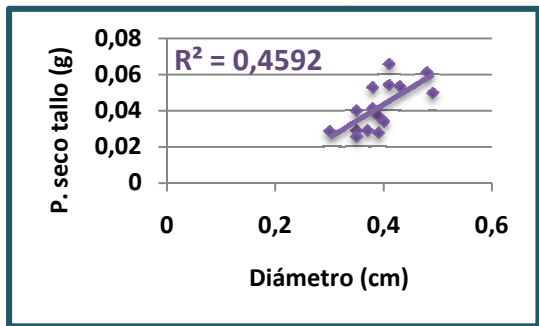
Resultados



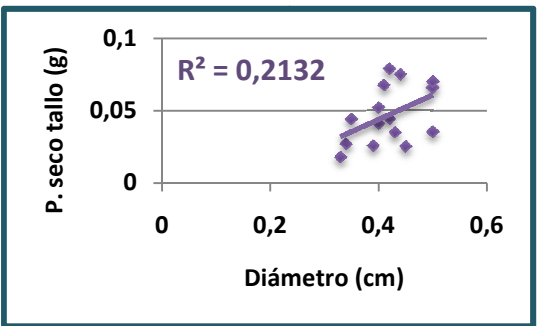
entre el diámetro de la
el tallo en g para
inoculación en
s de inóculo de
LSD 95%)



entre el diámetro de la
seco del tallo en g para
e a la inoculación en
na dosis de inóculo
(ANOVA LSD 95%)

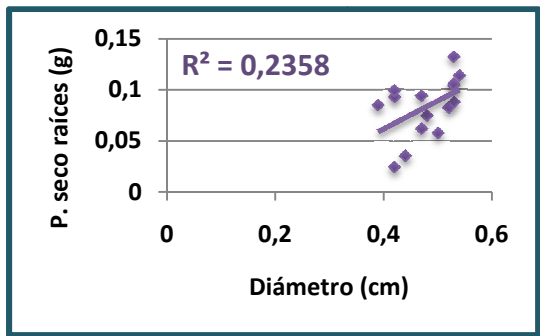


diámetro de la
l tallo en g para
noculación en
sis de inóculo
A LSD 95%)

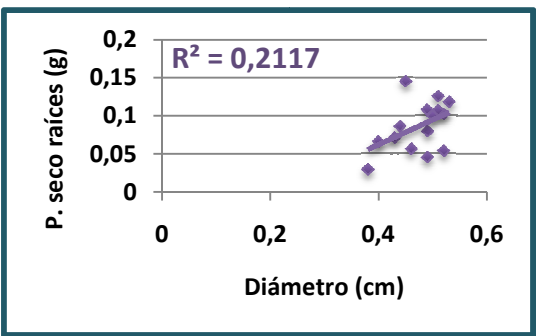


diámetro de la
o en g para
). (ANOVA

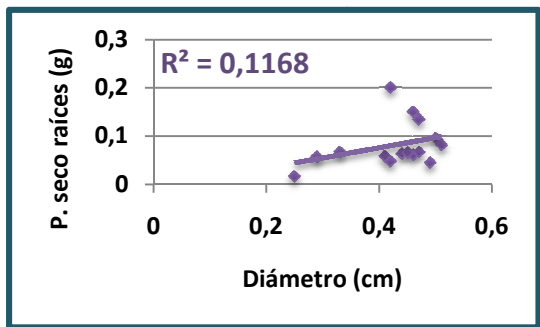
Resultados



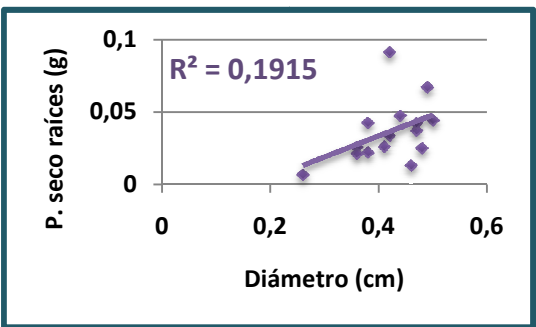
Entre el diámetro de la raíz y el peso seco de las raíces en g respondiente a la PAE 1 a una dosis de 10^8 conidias/mL. (ANOVA)



Entre el diámetro de la raíz y el peso seco de las raíces en g respondiente a la PAE 2 a una dosis de 10^8 conidias/mL.

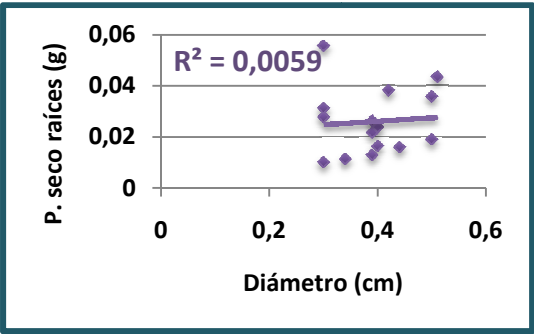


Entre el diámetro de la raíz y el peso seco de las raíces en g respondiente a la PAE 3 a una dosis de 10^8 conidias/mL. (ANOVA)

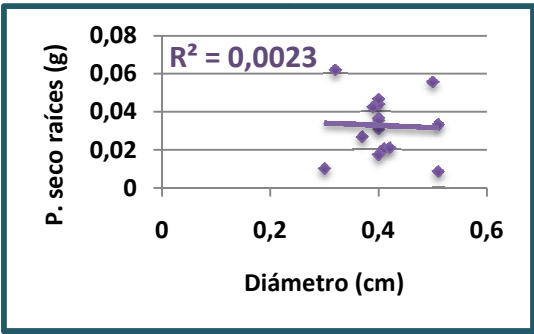


Entre el diámetro de la raíz y el peso seco de las raíces en g respondiente a la PAE 4 a una dosis de 10^8 conidias/mL. (ANOVA)

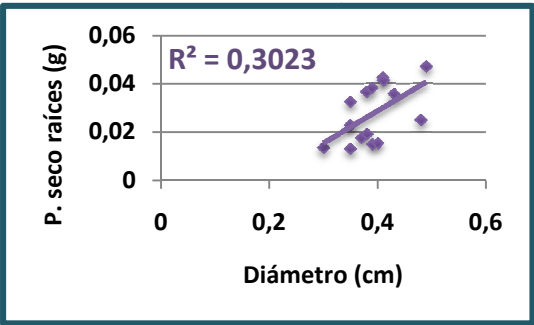
Resultados



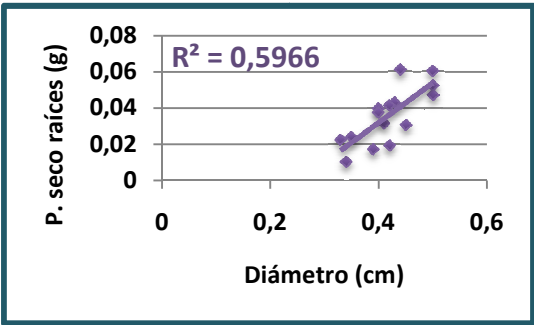
entre el diámetro de la raíz y el peso seco de las raíces en g correspondiente a la dosis AIS 4 a una dosis de 1×10^8 conidias/mL. (ANOVA)



entre el diámetro de la raíz y el peso seco de las raíces en g correspondiente a la dosis AIS 29 a una dosis de 1×10^8 conidias/mL. (ANOVA)



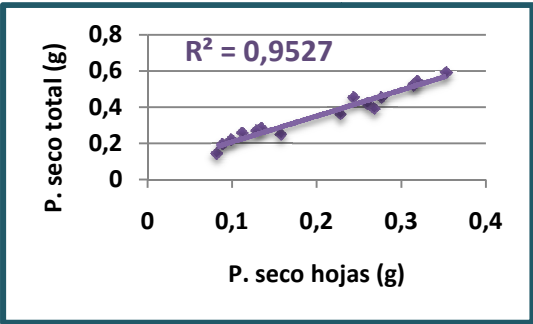
entre el diámetro de la raíz y el peso seco de las raíces en g correspondiente a la dosis AIS 36 a una dosis de 1×10^8 conidias/mL. (ANOVA)



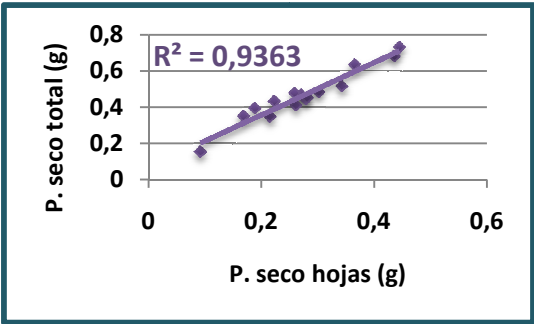
entre el diámetro de la raíz y el peso seco del tallo en g para el testigo. (ANOVA)

Resultados

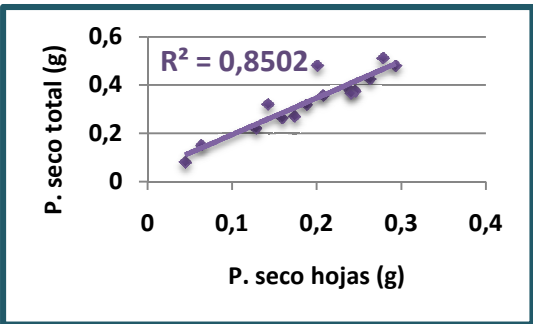
- Correlación entre el peso seco de las hojas y peso seco total:



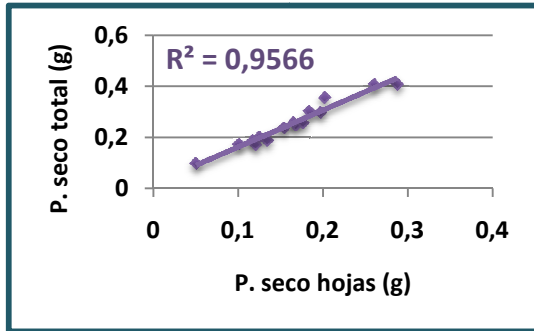
El peso seco de
total en g para el
inoculación en
sis de inóculo
A LSD 95%)



entre el peso seco de las
co total en g para el
a la inoculación en
a dosis de inóculo de
OVA LSD 95%)

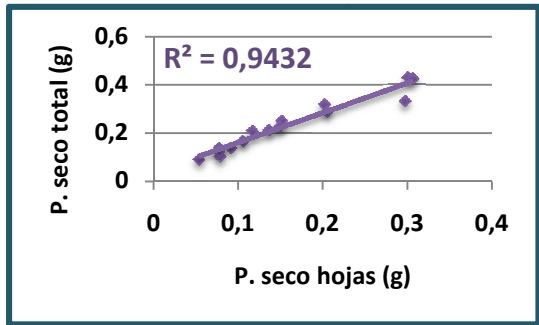


peso seco de las
l en g para el
inoculación en
is de inóculo
A LSD 95%)

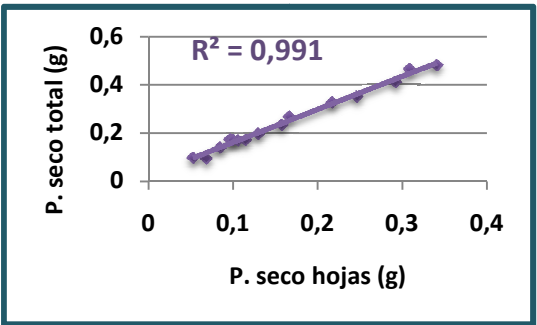


re el peso seco de las
o total en g para el
la inoculación en
a dosis de inóculo
ANOVA LSD 95%)

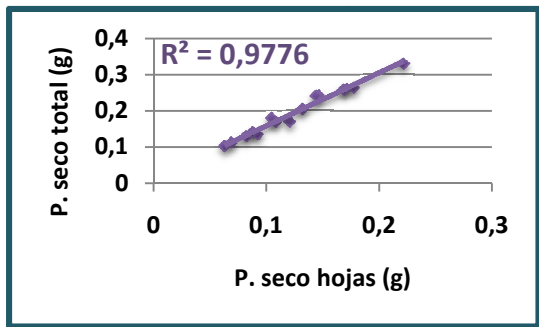
Resultados



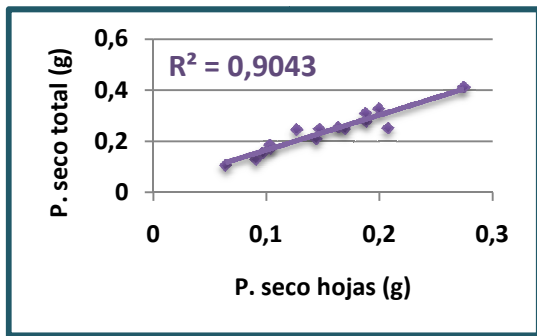
El peso seco de las hojas en g para el control y la inoculación en dosis de inóculo de LSD 95%)



Entre el peso seco de las hojas y el peso seco total en g para el control y la inoculación en dosis de inóculo de OVA LSD 95%)



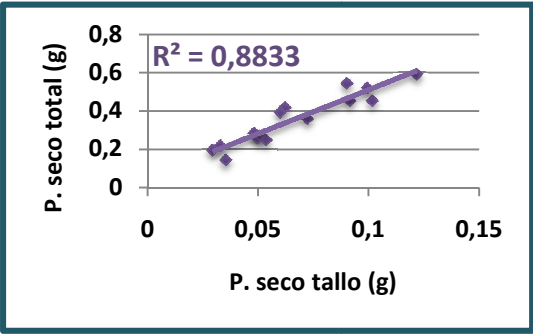
Entre el peso seco de las hojas y el peso seco total en g para el control y la inoculación en dosis de inóculo de ANOVA LSD 95%)



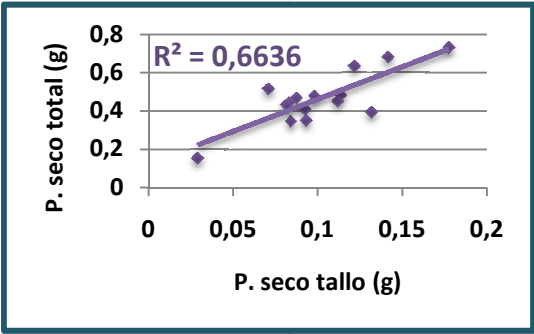
Entre el peso seco de las hojas y el peso seco total en g para el control y el testigo. (ANOVA LSD 95%)

Resultados

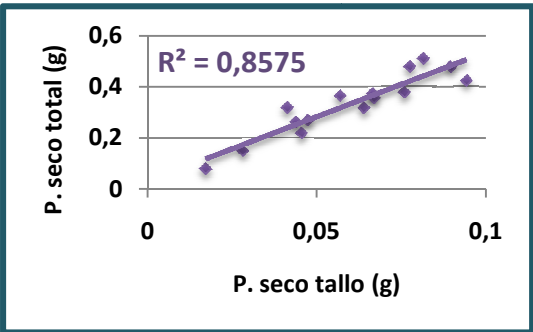
- Correlación entre el peso seco del tallo y peso seco total:



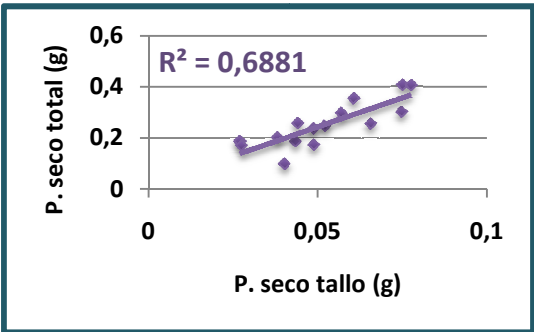
El peso seco del
tallo en g para el
tratamiento de
inoculación en
sistema de inóculo
/A LSD 95%)



entre el peso seco del
tallo y el peso seco
total en g para el
tratamiento de
inoculación en
sistema de inóculo
(ANOVA LSD 95%)

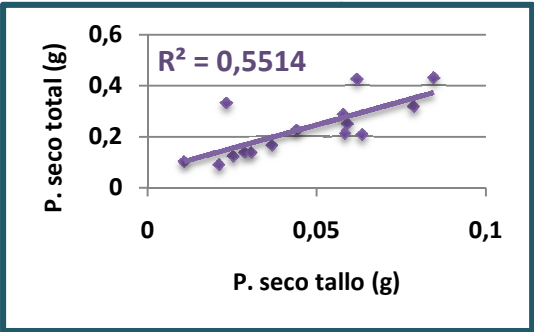


El peso seco del
tallo en g para el
tratamiento de
inoculación en
sistema de inóculo
/A LSD 95%)

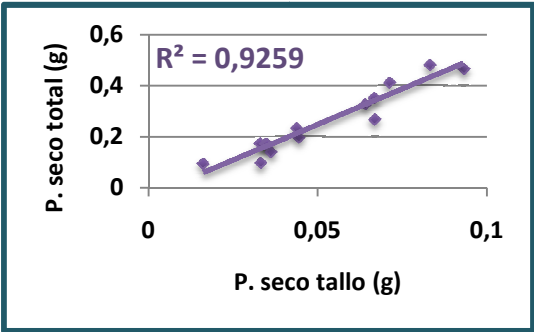


entre el peso seco del
tallo y el peso seco
total en g para el
tratamiento de
inoculación en
sistema de inóculo
(ANOVA LSD 95%)

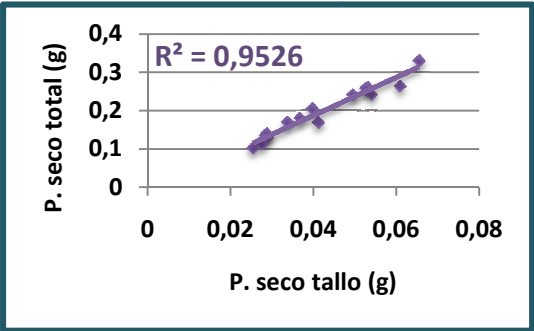
Resultados



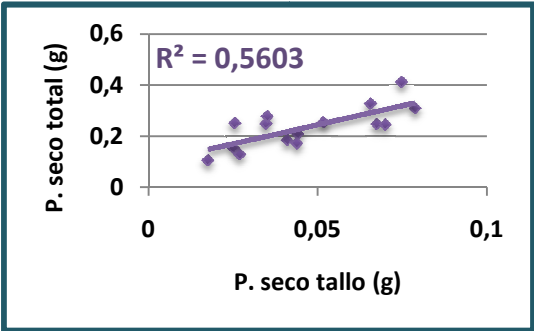
El peso seco del tallo en g para el primer nivel de inoculación en el ANOVA (ANOVA LSD 95%)



Entre el peso seco del tallo y el peso seco total en g para el segundo nivel de inoculación en el ANOVA (ANOVA LSD 95%)



El peso seco del tallo en g para el tercer nivel de inoculación en el ANOVA (ANOVA LSD 95%)



Entre el peso seco del tallo y el peso seco total en g para el grupo control. (ANOVA LSD 95%)

Resultados

5.2.4.- Cuadros de correlación:

5.2.4.1- Cuadros resumen de los valores para la correlación en función de longitud:

Longitud (cm) – peso seco hojas (g)	R ²
PAE 1	0,1666
PAE 2	0,3909
PAE 3	0,1992
PAE 4	0,3417
LEV 4	0,0011
AIS 29	0,3518
AIS 36	0,0007
TEST	0,2206

Cuadro 2: Correlación entre la longitud total de la plántula en cm y el peso seco de las hojas en g para el ensayo.

Longitud (cm) – peso seco tallo (g)	R ²
PAE 1	0,0831
PAE 2	0,3412
PAE 3	0,2582
PAE 4	0,5194
LEV 4	0,1601
AIS 29	0,4546
AIS 36	0,004
TEST	0,373

Cuadro 3: Correlación entre la longitud total de la plántula en cm y el peso seco del tallo en g para el ensayo.

Longitud (cm) – peso seco raíces (g)	R ²
PAE 1	0,1771
PAE 2	0,0549
PAE 3	0,2697
PAE 4	0,063
LEV 4	0,0057
AIS 29	0,2762
AIS 36	0,0141
TEST	0,4205

Cuadro 4: Correlación entre la longitud total de la plántula en cm y el peso seco de las raíces en g para el ensayo.

Resultados

5.2.4.2.- Cuadros resumen de los valores para la correlación en función del diámetro:

Diámetro (cm) – peso seco hojas (g)	R ²
PAE 1	0,5394
PAE 2	0,2595
PAE 3	0,3986
PAE 4	0,4945
LEV 4	0,0006
AIS 29	0,0103
AIS 36	0,3287
TEST	0,2424

Cuadro 5: Correlación entre la longitud total de la plántula en cm y el peso seco de las hojas en g para el ensayo.

Diámetro (cm) – peso seco tallo (g)	R ²
PAE 1	0,6203
PAE 2	0,0714
PAE 3	0,4521
PAE 4	0,2384
LEV 4	0,2176
AIS 29	0,0172
AIS 36	0,4592
TEST	0,2132

Cuadro 6: Correlación entre el diámetro de la plántula en cm y el peso seco del tallo en g para el ensayo .

Diámetro (cm) – peso seco raíces (g)	R ²
PAE 1	0,2358
PAE 2	0,2117
PAE 3	0,1168
PAE 4	0,1915
LEV 4	0,0059
AIS 29	0,0023
AIS 36	0,3023
TEST	0,5966

Cuadro 7: Correlación entre el diámetro de la plántula en cm y el peso seco de las raíces en g para el ensayo .

Resultados

5.2.4.3.- Cuadros resumen de los valores para la correlación en función del peso seco total:

Peso seco hojas (g) – peso seco total (g)	R ²
PAE 1	0,9527
PAE 2	0,9363
PAE 3	0,8502
PAE 4	0,9566
LEV 4	0,9432
AIS 29	0,991
AIS 36	0,9776
TEST	0,9043

Cuadro 8: Correlación entre el peso seco de las hojas en g y el peso seco total en g para el ensayo 2.

Peso seco tallo (g) – peso seco total (g)	R ²
PAE 1	0,8833
PAE 2	0,6636
PAE 3	0,8575
PAE 4	0,6881
LEV 4	0,5514
AIS 29	0,9259
AIS 36	0,9526
TEST	0,5603

Cuadro 9: Correlación entre el peso seco del tallo en g y el peso seco total en g para el ensayo 2.

Como se observa en los **cuadros** anteriores las correlaciones obtenidas no han sido del todo buenas respecto a la longitud y diámetro, ya que el valor de R² ha sido bajo en la mayoría de ellas. (Se valora como bueno un valor cercano a 1).

Resultados

5.2.5.- Presencia de *Paecilomyces* en las raíces:

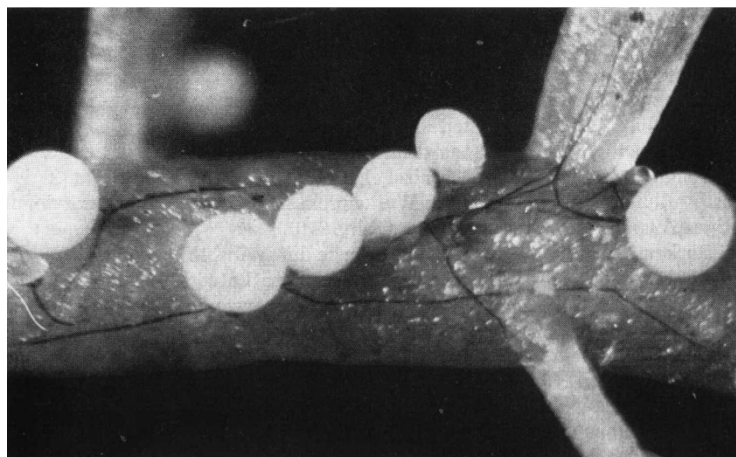
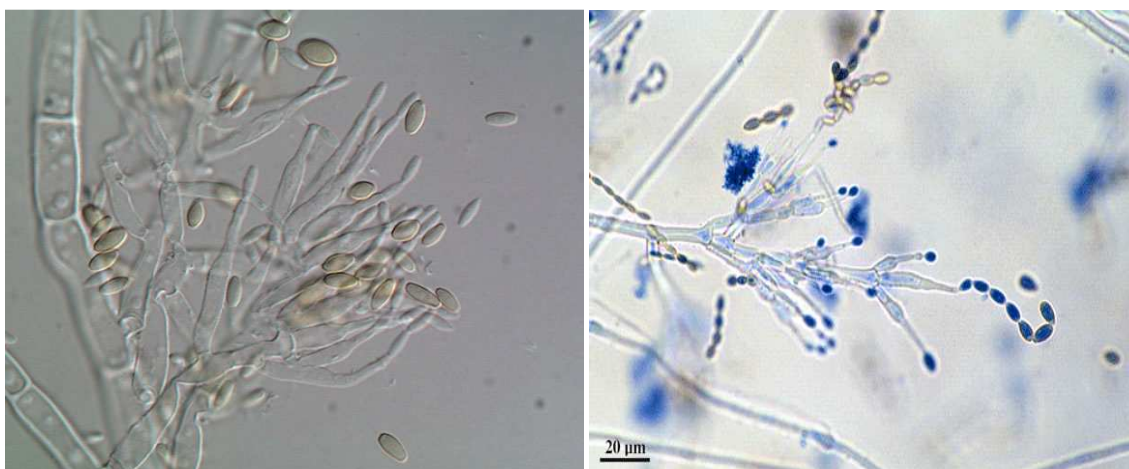


Foto 20: Colonización de la raíz por *Paecilomyces*. Paecilomyces. (2000). Consultado el 7 de Junio de 2011, página web de buscador de diagnósticos:

http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Paecilomyces&lang=2



Fotos 21 y 22: Micelio de *Paecilomyces* al microscopio óptico (100x) Paecilomyces. (2000). Consultado el 7 de Junio de 2011, página web de buscador de diagnósticos:

http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Paecilomyces&lang=2

Como podemos comprobar en las **fotos 20, 21 y 22** se observa la presencia de *Paecilomyces* en las raíces del ensayo. En las **fotos 23, 24, 25, 26, 27, 28 y 29** se compara la diferencia de tamaños de parte aérea y raíces.

Resultados

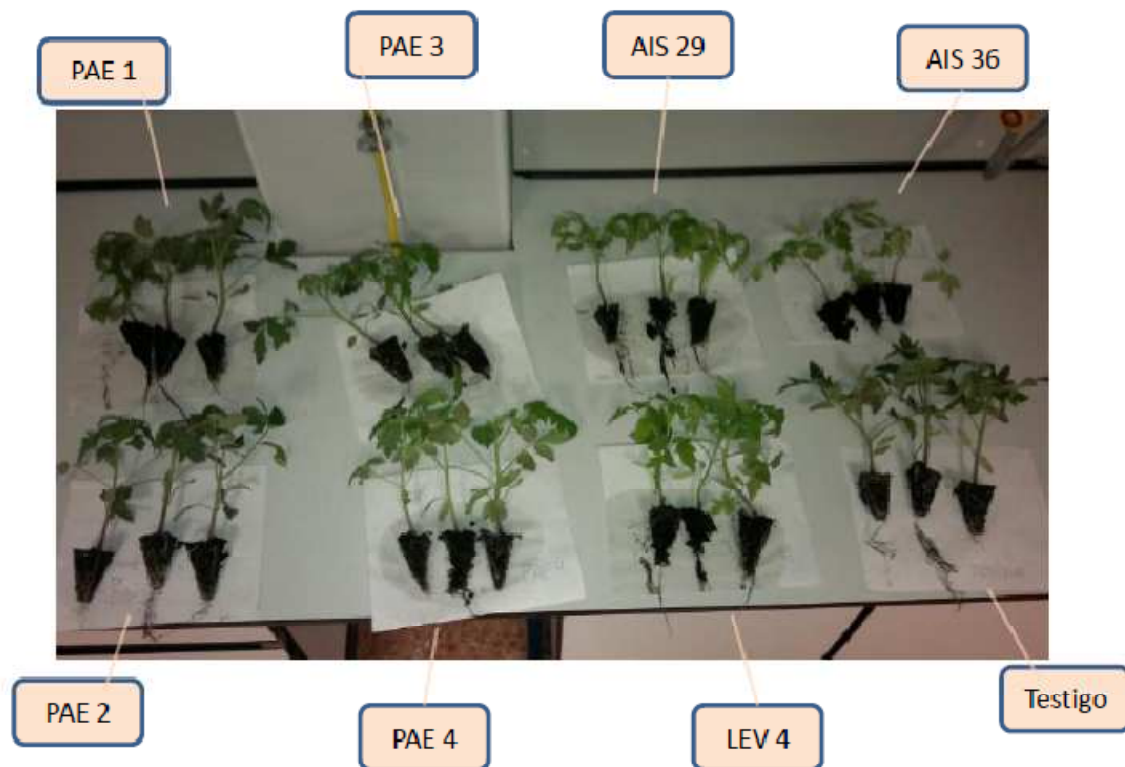


Foto 23: Comparación de plantas inoculadas y testigo

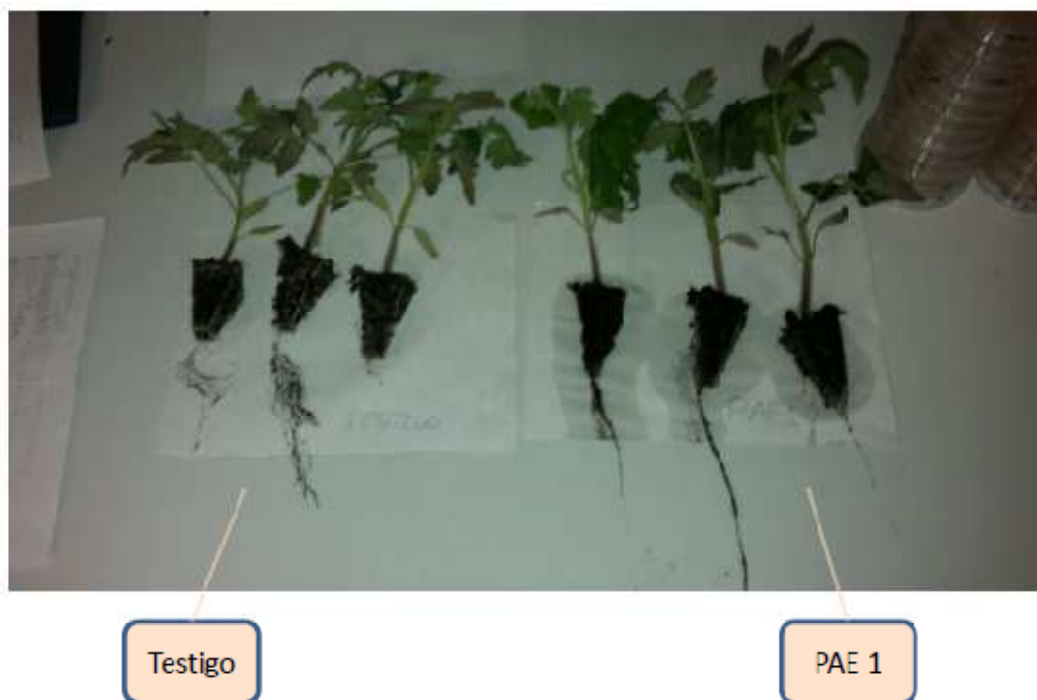


Foto 24: Comparación de plantas inoculadas con PAE 1 con plantas testigo

Resultados



Foto 25: Comparación de plantas inoculadas con PAE 2 con plantas testigo



Foto 26: Comparación de plantas inoculadas con PAE 3 con plantas testigo

Resultados



Testigo

PAE 4

Foto 27: Comparación de plantas inoculadas con PAE 4 con plantas testigo



Testigo

LEV 4

Foto 28: Comparación de plantas inoculadas con LEV 4 con plantas testigo

Resultados



Foto 29: Comparación de plantas inoculadas con AIS 36 con plantas testigo

En las imágenes no se ve con claridad la diferencia de tamaño de la parte superior de las plantas entre sí, salvo en algunos casos como en PAE 2, que se aprecia algo más grande que el testigo. Sin embargo en el caso de la raíz, se aprecia que tanto PAE 1 como PAE 2, son más grandes que el resto de raíces de las demás plantas, incluidas las del testigo. No obstante en los resultados de los análisis, como la medición de la diferencia de peso, se ha demostrado las diferentes diferencias de tamaño entre las plantas, demostrando el efecto promotor de crecimiento de las plantas inoculadas con *Paecilomyces*.

Resultados

5.3.- Evaluación *in vitro* de las actividades enzimáticas:

Los aislados seleccionados se caracterizaron *in vitro* para determinar a partir de análisis enzimáticos la producción de ácido indol acético (AIA), sideróforos, solubilización del fosforo, y actividad proteolítica. Los aislados son PAE 1, PAE 2, PAE 3, PAE 4, LEV 4, AIS 29, AIS 36, y además dos cepas de *Trichodermas*, T1 y T2, en las que está demostrado su efecto promotor de crecimiento, de manera que se puedan comparar sus efectos.

5.3.1.- Determinación de la presencia o ausencia de halo de degradación o solubilización:

Para ello, se determinaron que aislados mostraban halo de degradación o solubilización positivo o negativo, mediante la siembra de dichos aislados en Placas de Petri con el medio correspondiente del que se quería estudiar la actividad enzimática.

Halo de degradación	Positivo	T1 y T2
	Negativo	PAE 1, PAE 2, PAE 3, y PAE 4

Cuadro 10: Halo de degradación positivo y negativo para la actividad celulolítica.

En el estudio de la actividad celulolítica de los aislados fungicos se obtuvieron 2 aislados con halo de degradación positivo y 4 aislados con halo de degradación negativo . Resultados similares fueron obtenidos por Gaitan *et al.*, (2007), con un porcentaje de aislados positivos del 38%, ya que de 8 cepas estudiada procedentes del residuo fresco del crisantemo, sólo 3 cepas mostraron halo de degradación positivo. No se ha podido realizar ninguna foto de los halos ya que su visualización en la imagen era inapreciable.

5.3.2- Actividad proteolítica:

En el Cuadro 11, se muestran los aislados que mostraron halo de degradación positivo y negativo para la actividad proteolítica.

Halo de inhibición	Positivo	PAE 1, PAE 2, PAE 3, y PAE 4
	Negativo	T1 y T2

Cuadro 11: Halo de degradación positivo y negativo para la actividad proteolítica.

Resultados

En el estudio de la actividad proteolítica se obtuvieron 4 aislados con halo de degradación positivo y 2 aislados con halo de degradación negativo. Resultados más altos fueron obtenidos por Valencia (2009), con un porcentaje de aislados positivos del 69%, ya que de 32 cepas estudiadas procedentes de lesiones de animales, humanos y plantas, 22 cepas mostraron halo de degradación positivo.

5.3.3.- Solubilización del fósforo:

En el Cuadro 12, se muestran los aislados que mostraron halo de solubilización positivo y negativo para el fósforo.

Halo de inhibición	Positivo	Ninguno
	Negativo	PAE 1, PAE 2, PAE 3, PAE 4, T1 y T2

Cuadro 12: Halo solubilización positivo y negativo para el fósforo.

En el estudio del fósforo se obtuvieron todos los aislados con halo de solubilización negativo. Valores inferiores a los obtenidos por Rico (2009), ya que observó que la décima parte de 45 cepas (22%) evaluadas de actinomicetos mostraron halos de solubilización positivos y Del Castillo (2010), que estudió la solubilización del fósforo en los microorganismos promotores del crecimiento vegetal asociados al cultivo del arroz, obteniendo 10 cepas (38%) con halo de solubilización positivo de 28 cepas estudiadas.

5.3.4.- Actividad proteolítica:

Para determinar qué aislado presenta un halo de degradación alto, bajo o medio dentro de una misma secuencia de aislados, se ha tomado el valor medio de la media de las tres repeticiones de un mismo aislado.

Resultados

Nº Antagonista	Repetición 1		Repetición 2	
	Media (cm)	Desviación típica(cm)	Media (cm)	Desviación típica(cm)
P1	1,80	0,00	1,75	0,05
P2	1,75	0,15	1,80	0,00
P3	1,65	0,05	1,25	0,05
P4	1,30	0,00	1,20	0,00
Nº Antagonista	Repetición 3		Total	
	Media (cm)	Desviación típica(cm)	Media (cm)	Desviación típica(cm)
P1	1,65	0,05	1,73	0,03
P2	1,65	0,05	1,73	0,07
P3	1,30	0,00	1,40	0,03
P4	1,35	0,05	1,28	0,02

Cuadro 13: Valores de los halos de degradación positivos obtenidos de la segunda secuencia de antagonistas seleccionados para la actividad proteolítica.

Los aislados P1 y P2 presentan valores de 1,73 cm para los dos aislados, teniendo el resto de los aislados valores inferiores a la media. Resultados inferiores fueron obtenidos por Valencia (2009), en el estudio de cepas de *Fusarium* aisladas de lesiones de animales, humanos y plantas, ya que al medir la actividad enzimática para el día 2, las cepas con valores más altos se situaron entre los 0,2 y 1,2 cm.

5.3.5- Determinación de la producción de sideróforos:

Para determinar qué aislado presenta una producción de sideróforos alta, media o baja dentro de una misma secuencia de aislados, se ha tomado el valor medio de lectura de toda la secuencia de aislados sin tener en cuenta en dicha media, los aislados con valores de cero o negativos. Se analizaron para determinar la producción de sideróforos los 6 aislados fúngicos.

Resultados

5.3.6- Determinación de la producción de Sideróforos mediante el medio Caldo Casimino Ácido (CAS):

En el Cuadro 14, se muestra los valores obtenidos mediante espectrofotometría en la segunda secuencia de antagonistas seleccionados para la determinación de Sideróforos mediante el medio CAS.

Nº Antagonista	Lectura (µM)
PAE 1	21,40
PAE 2	13,70
PAE 3	59,30
PAE 4	15,60

Cuadro 14: Valores obtenidos mediante espectrofotometría en la segunda secuencia de antagonistas seleccionados para la determinación de Sideróforos mediante el medio CAS. Absorbancia a 405 nm. Concentración en µM de sideróforos por 10⁸ UFC/ml de bacterias, turbidez del 0.5 de la escala de Mac Farland. Factor de medición 300.

En la producción de Sideróforos mediante el medio CAS de la segunda secuencia de aislados, la media de los aislados es de 22,71 µM. De esta forma, se muestra tanto en la tabla como en la figura, como el aislado PAE 3 muestra el mayor valor de producción de sideróforos con un valor de 59,30 µM.

Hasta el momento, existen numerosas referencias bibliográficas en referencia a la aplicación de sideróforos para combatir enfermedades que afectan a cultivos de interés económico ha estado relacionada con productos obtenidos a partir de *Pseudomonas fluorescentes*. Sin embargo, varios autores han demostrado la efectividad de cepas de *Burkholderia cepacia* en el biocontrol, cuestión que podría estar relacionada con los diferentes tipos de sideróforos que esta especie produce.

Resultados obtenidos por Miranda *et al.*, (2000) con diferentes cepas de *Burkholderia cepacia* para el biocontrol de *Phytophthora infestans* en el cultivo de la papa demuestran mayores porcentaje de inhibición en medios con condiciones limitantes de hierro que en medios donde se añade FeCl₃ al medio de cultivo, lo que demuestra el papel rector de los sideróforos en este sistema.

Resultados

5.3.7.- Determinación de la producción de Sideróforos mediante el medio KING B.

En el Cuadro 15, se muestran los valores obtenidos mediante espectrofotometría en la segunda secuencia de antagonistas seleccionados para la determinación de Sideróforos mediante el medio KING B.

Nº Antagonista	Lectura (µM)
PAE 1	0,10
PAE 2	14,90
PAE 3	22,10
PAE 4	11,90

Cuadro 15: Valores obtenidos mediante espectrofotometría en la segunda secuencia de antagonistas seleccionados para la determinación de Sideróforos mediante el medio KING B. Absorbancia a 405 nm. Concentración en µM de sideróforos por 10^8 UFC/ml de bacterias, turbidez del 0.5 de la escala de Mac Farland. Factor de medición 300.

En la producción de Sideróforos mediante el medio KING B de la segunda secuencia de aislados, la media de los aislados es de 7,78 µM. De esta forma, se muestra en la tabla, como los aislados PAE 3 y PAE 2 que presentan valores de 22,10 y 14,90 µM respectivamente, son los mayores.

Al comparar ambas secuencias en el estudio de la producción de Sideróforos mediante el medio KING B, se observa que el máximo valor de producción alcanzado es para el aislado 2 con un valor de 130,10 µM, seguido del aislado 40 con un valor de 127,10 µM. Resultados inferiores se obtuvieron en el estudio de la obtención de sideróforos a partir de *Burkholderia cepacia* y optimización del medio de cultivo para su producción, donde la mayor producción de sideróforos alcanzó un valor de 30,95 µM a las 20 y 22 horas de incubación a 120 rpm y un valor de 30,75 µM a las 24 horas a 200rpm (Sánchez *et al.*, 2003).

Resultados

5.3.8.- Determinación de la producción de ácido Indol Acético (AIA).

Para la determinación del AIA, las bacterias y hongos seleccionados se hicieron crecer en Medio TBS con la adición de triptófano y sin triptófano. Para discutir qué aislado presenta una producción de AIA alta, media o baja dentro de una misma secuencia de aislados, se ha tomado el valor medio de lectura de toda la secuencia de aislados. Se analizaron para determinar la producción de sideróforos en los 6 aislados fúngicos.

- Medio TBS con Triptófano.

A pesar que inicialmente se hizo la curva patrón con concentraciones entre [0-50], a la hora de comparar dichos valores con los obtenidos de nuestros aislados, se observó que se obtenían valores de absorbancia o concentración bajos, por lo que se optó por seleccionar aquellos valores de concentración de la curva patrón más próximos a los obtenidos en las medidas de los aislados estudiados.

- Primera secuencia de antagonistas seleccionados.

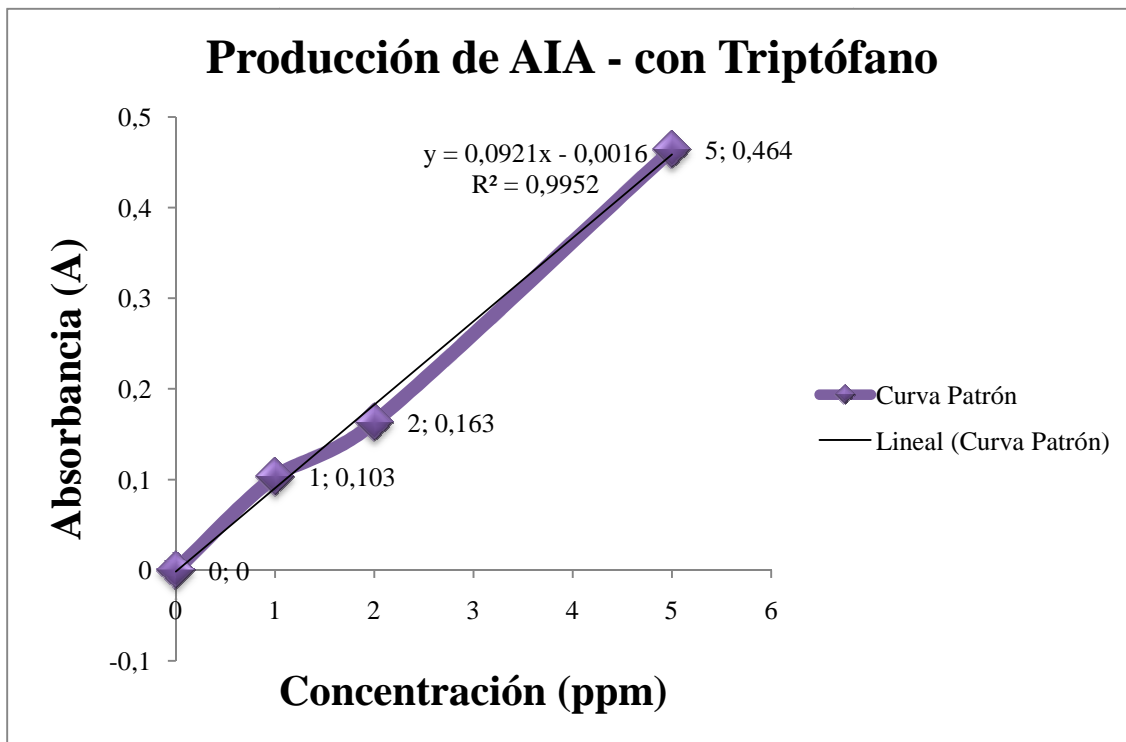
En el Cuadro 16 y en la Gráfica 78, se muestran los valores de absorbancia para distintas concentraciones de AIA para el medio TBS con Triptófano.

Concentración (ppm)	Absorbancia (A)
[0]	0
[1]	0,103
[2]	0,163
[5]	0,464
[25]	1,413
[50]	2,122

Cuadro 16: Valores de absorbancia para distintas concentraciones de AIA para el medio TBS con Triptófano.

Se han tomado para hacer la recta patrón las concentraciones [0], [1], [2] y [5] con sus correspondientes valores de absorbancia.

Resultados



Gráfica 78: Curva Patrón obtenida en la producción de AIA con Triptófano para la segunda secuencia antagonistas estudiados.

En el Cuadro 17, se muestra los valores de concentración de la segunda secuencia de antagonistas obtenida en la producción de AIA con Triptófano.

NºAntagonista	Absorbancia (A)	Concentración (ppm)
PAE 1	0,117	1,29
PAE 2	0,062	0,69
PAE 3	0,102	1,12
PAE 4	0,091	1,01

Cuadro 17: Valores de absorbancia de la segunda secuencia de antagonistas obtenida en la producción de AIA con Triptófano.

En la producción de AIA con Triptófano de la segunda secuencia de aislados, la media de los aislados es de 0,94 ppm. De esta forma, se muestra tanto en la tabla como en la figura, como el aislado PAE 1, que presenta el valor de 1,29 ppm.

En la investigación realizada por Franco (2008), la producción de ácido indol acético, varía entre 0,99 µg/ml y 13,1 µg/ml en el octavo día de incubación. Manulis *et al.*,

Resultados

(1994), obtuvieron tras 15 días de incubación valores de producción de AIA entre (8 µg/ml–10 µg/ml). Hernández *et al.*, (2004), estudiaron la caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz, obteniendo a las 24 horas, que distintas cepas de *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* obtienen los mayores niveles producción de AIA, estando éstos valores entre 5,30 y 21,53 µg/ml.

Yahalom (1991), demostró que el efecto de esta hormona sobre las raíces depende de su concentración, encontrando que concentraciones de 10^{-8} M estimularon el alargamiento radical, mientras que concentraciones mayores a 10^{-6} M lo inhibieron y redujeron la longitud de la zona de alargamiento.

- Segunda secuencia de antagonistas seleccionados.

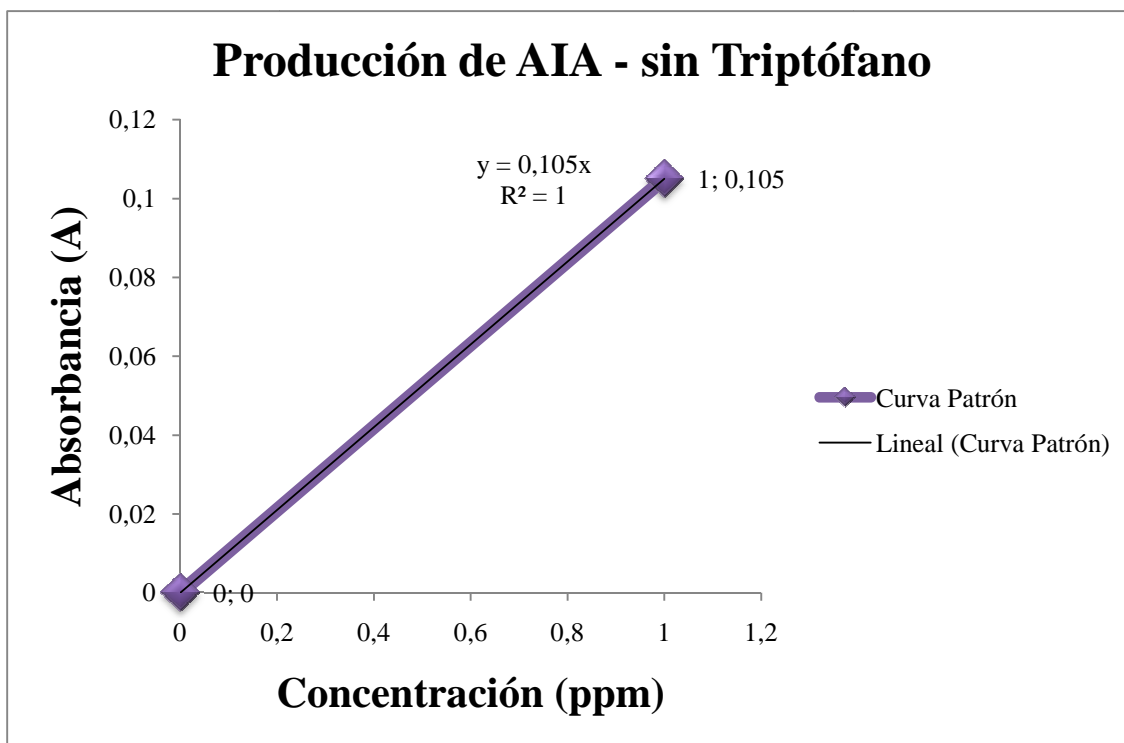
En el Cuadro 18 y en la Gráfica 79, se muestra los valores de absorbancia para distintas concentraciones de AIA para el medio TBS sin Triptófano.

Concentración (ppm)	Absorbancia (A)
[0]	0
[1]	0,105
[2]	0,200
[5]	0,495
[25]	1,376
[50]	2,042

Cuadro 18: Valores de absorbancia para distintas concentraciones de AIA para el medio TBS sin Triptófano.

Se han tomado para hacer la recta patrón las concentraciones [0], [1] con sus correspondientes valores de absorbancia.

Resultados



Gráfica 79: Curva Patrón obtenida en la producción de AIA sin Triptófano para la segunda secuencia de antagonistas estudiados.

En el Cuadro 19, se muestra los valores de absorbancia de la segunda secuencia de antagonistas obtenida en la producción de AIA sin Triptófano.

NºAntagonista	Absorbancia (A)	Concentración (ppm)
PAE 1	0,030	0,28
PAE 2	0,020	0,19
PAE 3	0,012	0,11
PAE 4	0,010	0,09

Cuadro 19: Valores de absorbancia de la segunda secuencia de antagonistas obtenida en la producción de AIA sin Triptófano.

En la producción de AIA sin Triptófano de la segunda secuencia de aislados, la media de los aislados es de 0,18 ppm. De esta forma, se muestra tanto en la Cuadro 19 como en la Gráfica 79 como el aislado PAE 1, que presenta el valor de 0,28 ppm.

Al comparar ambas secuencias en el estudio de la producción de AIA sin Triptófano, se observa que el máximo valor alcanzado de concentración es para el aislado 81 con un valor de 1,84 ppm= 2,15 µg/ml, seguido de otro aislado con un valor de 1,74

Resultados

ppm. Los resultados obtenidos son bajos en comparación con los reportados por Del Castillo (2010), ya que a partir del estudio de microorganismos aislados de las Marismas del Guadalquivir, obtuvieron un valor máximo de producción de AIA sin triptófano de 50,29 ppm y un valor mínimo de 2,09 ppm.

5.3.9.- Comparación entre el Medio TBS con Triptófano y sin triptófano.

En el Cuadro 20, se muestran los valores de concentración de la segunda secuencia de antagonistas obtenida en la producción de AIA sin Triptófano y con Triptófano.

NºAntagonista	Concentración sin Triptófano (ppm)	Concentración con Triptófano (ppm)
PAE 1	0,28	1,29
PAE 2	0,19	0,69
PAE 3	0,11	1,12
PAE 4	0,09	1,01

Cuadro 20: Valores de concentración de la segunda secuencia de antagonistas obtenida en la producción de AIA sin Triptófano y con Triptófano.

Al comparar la concentración de AIA sin Triptófano con la de AIA con Triptófano de la segunda secuencia de aislados, se observa que aumenta mucho la concentración con Triptófano en el 100% de los casos.

6. Discusión:

Los ensayos realizados han puesto de manifiesto la capacidad de *Paecilomyces* para actuar como promotores del crecimiento sobre plántulas de tomate.

En general, para todos los parámetros medidos en el ensayo: % de germinación, longitud, número de hojas, diámetro del tallo por debajo de los cotiledones, peso fresco y peso seco total y por sus distintas partes, se observa diferencia significativa en cuanto a los valores alcanzados, siendo en general mayores para el caso de las plantas inoculadas con tres de las cepas de *Paecilomyces* (PAE 1, PAE 2 y PAE 3), respecto al testigo y el resto de cepas y aislados para este ensayo realizado.

Además, en la evaluación *in vitro* de las actividades enzimáticas, se ha analizado que existe una mejora en la producción de ácido indol acético (AIA), sideróforos, y, actividad proteolítica en todas las pruebas con *Paecilomyces*, aunque resultando negativo su efecto en la solubilización del fósforo, sin embargo, demostrando en general su efecto positivo en la promoción del crecimiento.

En ensayos realizados por González *et al.* (1999) se comprobó la promoción de crecimiento de microorganismos, en este caso de *Trichoderma*. La aplicación de *Trichoderma harzianum* influyó significativamente sobre el incremento de la masa fresca, la altura y el diámetro del tallo en plantas de tomate. La estimulación del crecimiento observada en las plantas tratadas con suspensiones de conidias de *T. harzianum*, está en correspondencia con lo obtenido por diversos autores (Lindsey y Baker, 1967; Kloepper y Schroth, 1981; Chang *et al.*, 1986). La promoción del crecimiento vegetal por parte de *Trichoderma* es un fenómeno que se ha observado en varios tipos de cultivos (Harman *et al.*, 1989; Lindsey y Baker, 1967). Este fenómeno se manifiesta como una potenciación de la germinación de las semillas, una floración más abundante y temprana y aumentos de altura y peso de las plantas (Chang y Baker, 1986).

Discusión

Cruz y Cisterna (1997) estudiando los efectos de *Trichoderma harzianum* y *Gliocladium virens* sobre plantas de pimiento, observaron un efecto estimulador del crecimiento expresado por un mayor porcentaje de germinación, altura, peso seco, área foliar y velocidad de fotosíntesis de las plantas tratadas con *Trichoderma harzianum* y *Gliocladium virens*, coincide con observaciones realizadas por otros autores (Chang *et al.*, 1986; Paulitz *et al.*, 1986; Kleifel y Chet, 1992; Inbar *et al.*, 1994; Stefanova y Sandoval, 1995). Varios mecanismos posibles han sido sugeridos para explicar este fenómeno. Entre ellos se considera la producción de fitohormonas, vitaminas, conversión de formas no utilizables de productos a otras utilizables por la planta y aumento en la absorción y traslocación de minerales (Baker, 1989; Kleifeld y Chet, 1992).

Recientes investigaciones por Hashem y Kamal (2011) en Egipto para tomate en invernadero, se llega a la conclusión que frente a los demás hongos como *Pseudomonas fluorescens*, *Paecilomyces lilacinus*, *Pichia guilliermondii* y *Calothrix parietina*; *Paecilomyces* es de los más destacados, tanto para controlar los nematodos, como para mejorar las condiciones de la planta, ofreciendo una promoción en el crecimiento notable y contrastada. (Hashem y Kamal, 2011). Además mejora el porcentaje de germinación a casi el doble, además del efecto sinergia con peroxidasas y polifenoloxidasas (Hashem y Kamal, 2011).

El **Índice tallo raíz** obtenido es notablemente menor para el caso de las plantas inoculadas con PAE 1, PAE 2 y PAE 3 en relación al testigo y a los demás casos. 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 los resultados obtenidos para este índice, la calidad de la planta inoculada con PAE 1, PAE 2 y PAE 3 superaría con diferencia significativa a las demás. El resto de inoculaciones (PAE 4, LEV 4, AIS 29 y AIS 36) tienen peor calidad que el testigo según este índice.

Discusión

El **Índice de esbeltez** relaciona la resistencia de la planta con la capacidad fotosintética de la misma (Toral, 1997). 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. Estos valores han sido mayores para el testigo, habiendo diferencia mínima, pero significativa entre las inoculaciones con *Paecilomyces*, LEV 4, AIS 29 y AIS 36. Sin embargo ya se ha comentado la dificultad de comparar todos estos parámetros e índices, que pueden dificultar la valoración objetiva de la calidad de una plántula, unido al hecho de que normalmente en los semilleros comerciales, esta se basa en criterios altamente subjetivos derivados del aspecto visual que presenta la misma, ya sea en cuanto a tamaño, síntomas de carencias, daños físicos o biológicos.

El **Índice de Calidad de Dickson**, permite integrar todos estos parámetros. Según (Oliet, 2000), 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). Se han obtenido valores notablemente superiores para las plántulas inoculadas con PAE 1, PAE 2, y PAE 3 en relación al testigo y a los demás casos, que no tienen diferencia significativa entre sí, lo que indica que las plántulas en el presente ensayo muestran una mayor calidad en el trasplante cuando van inoculadas estas cepas de *Paecilomyces*.

Conclusiones

7. Conclusiones:

- I. En los ensayos realizados se ha demostrado el efecto bioestimulante de las cepas de *Paecilomyces* en plántulas de tomate.
- II. La calidad de las plántulas de tomate se incrementa con respecto al testigo en un 139%, 166% y 121%, tras la inoculación con **PAE 1**, **PAE 2** y **PAE 3**, respectivamente calculada mediante el índice de calidad.
- III. En la determinación de las actividades enzimáticas de *Paecilomyces*, se ha analizado que produce ácido indol acético (AIA), sideróforos, actividad proteolítica. Sin embargo, mediante la metodología desarrollada no solubiliza el fósforo.

Bibliografía

7. Bibliografía:

- **Abbot L. y Robson A.**, 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 35:121-150.
- **Ajith P. y Lakshmidevi N.**, 2010. *Nature and Science*, 8 (9): 265-269. (ISSN: 1545-0740).
- **Allen M.**, 1992. Mycorrhizal functioning an Integrative Plant-Fungal Process. Chapman y Hall, New York. Pp. 534.
- **Allen M.**, 1991. The Ecology of Mycorrhizae. M.F. Allen Ed. Cambridge University Press.
- **Altomare C., Norvell W., Björkman T. y Harman G.**, 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22. *Appl Environ Microbiol* 65: 1926-2933.
- **Arora D., Elander R. y Mukerji K.**, 1992. Handbook of applied Mycology: Fungal Biotechnology. Marcel Dekker, New York, pp. 4: 697.
- **Augé R.**, 2001. Water relation, drought and VA mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42.
- **Azcón-Aguilar C. y Barea J.**, 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials. *Scientia Horticulturae* 68: 1–24.
- **Baker R.**, 1989. Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. *Trends in bio-technology* 7: 34-38.

Bibliografía

- **Barea J., Azcón R. y Azcón C.,** 1991. Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen fixing systems. *Methods in microbiology*. Academic Press. Vol. 24: 391-346.
- **Barea J.,** 1998. Biología de la rífosfera. *Investigación y Ciencia (Scientific American)* 256: 74-81.
- **Barnett H. y Hunter B.,** 1982. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Third edition. Burgess publishing. Mineapolis, Minesota. USA 241 pp.
- **Bashan Y. y de-Bashan L.,** 2005. Bacteria/Plant growth-pro-motion. En Hillel D (Ed.) *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Vol. I. Elsevier. Oxford, RU. pp. 103-115.
- **Bauer T.,** 2001. Microorganismos Fijadores de Nitrógeno: familia Rhizobiaceae.
- **Bhattacharya P. y Chaudhuri S.,** 1993. Biofertilizer: Opening a new horizon. *Yohana* 37(9): 12-31.
- **Birchler T., Rose R., Royo A., Pardos M.,** 1998. La planta ideal: Revisión del concepto, parámetros definitorios e implemetación práctica.
- **Björkman T., Blanchard L. y Harman G.,** 1998. Growth Enhancement of *shrunkn-2 (sh2)* Sweet Corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: Effect of Environmental Stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123(1): 35-40.
- **Bowen G. y Rovira A.,** 1999. The rizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66: 1-102.
- **Borowicz V.A.,** 2001. Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations. *Ecology* 82 (11): 3057-3068.

Bibliografía

- **Burdman S., Vedder D., German M., Itzigsohn R., Kigel J., Jurkevitch E. y Okon Y.,** 1998. Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. In C. Elmerick, A. Kondorski, y W. E. Newton. Eds. *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*: 609-612.
- **Chang Y., Baker R., Kleifeld O. y Chet I.,** 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant disease* 70: 145-148; 76: 60-65.
- **Chen X., Romaine C., Ospina-Giraldo M. y Royse D.,** 1999. A polymerase chain reaction-based test for the identification of *Trichoderma harzianum* biotypes 2 and 4, responsible for the worldwide green mould epidemic in cultivated *Agaricus bisporus*. *Applied Microbiol Biotechnol.* 51: 572-578.
- **Cibrián T. y Bello L.,** 2000. Calidad de planta. En: *Memorias del Primer Congreso Nacional de Reforestación*. SEMAR-NAP-Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- **Compagnoni A.,** 1997. Cambiando le regole Europee per l'agricoltura biologica. *L'Informatore Agrario* 53 (31): 60-61.
- **Covasevic F., Echeverría H. y Andreoli Y.,** 1995. Micorización vesículo-arbuscular espontánea en trigo en función de la disponibilidad de fósforo. *Ciencia del Suelo* 13:47-51.
- **Coyne M.,** 1999. *Soil Microbiology: An exploratory approach*. Delmar Publishers. 462 pag.
- **Cook J. y Baker K.,** 1989. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 539 p.

Bibliografía

- **Cruz M. y Cisterna V.**, 1997. Control integrado de *Phytophthora capsici* en pimiento. I. Efecto de hongos antagonistas sobre el crecimiento de las plantas.
- **Dell'Amico J., Torrecillas A., Rodríguez P., Morte A. y Sánchez-Blanco M.**, 2002. Water and growth parameter responses to tomato plants associated with arbuscular mycorrhizae during drought and recovery. *Journal of Agricultural Sciences* 138: 387-393.
- **Dickson A., Leaf A., Hosner I.**, 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedlings stock in nurseries. *Forest Chronicle* 36: 10-13.
- **Elo S., Maunuksela L., Salkinoja-Salonen M., Smolander A. y Åtela K.**, 2000. Humus bacteria of Norway spruce stands: plant growth promoting properties and birch, red fescue and alder colonizing capacity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 143-152.
- **Faggioli V., Freytes G. y Galarza C.**, 2008. Las micorrizas en trigo y su relación con la absorción de fósforo del suelo. Publicación Técnica INTA EEA Marcos Juárez.
- **Federation of American Scientists (FAS) y United States Department of Agriculture (USDA)**, 2003. Horticultural & Tropical Products Division. Processed Tomato Products Outlook and Situation in Selected Countries, 7p.
- **Fernández F.**, 1999. Manejo de las asociaciones micorrízico-arbusculares (MA) sobre la producción de posturas de cafetos (*C. arabica* L.) en algunos tipos de suelos. Tesis de Doctorado, INCA, La Habana, 118 pp.
- **Fernández L.**, 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas 62: 96-100.

Bibliografía

- **Ferraris G., Couretot L. y Díaz Zorita M.,** 2008. Respuesta de trigo a tratamientos con *Azospirillum sp.* según niveles tecnológicos. VII Congreso Nacional de Trigo. V Simposio Invernal de Cereales de siembra Otoño –Invernal. I Encuentro del Mercosur.
- **Fletcher J.,** 1987. Weed moulds. *The Mushroom Journal* 174: 198-200.
- **Font Quer P.,** 1982. Diccionario de Botánica.
- **Fuentes-Ramírez L. y Caballero- Mellado J.,** 2005. Bacterial biofertilizers. En SiddiquizA (Ed.). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Holanda. pp. 143-172.
- **García F., Picone L. y Berardo A.,** 2006. Fósforo. Pág. 99-121. En: H.E.Echeverría y F.O. García (eds.) *Fertilidad de Suelos y Fertilización de cultivos*. Editorial INTA, Buenos Aires, Argentina. 521p.
- **Gasoni L., Cozzi J., Kobayashi K., Yossen V., Zumelzu G., Babbitt S. y Kahn N.,** 2001. Yield Response of Lettuce and Potato to Bacterial and Fungal Inoculants Under Field Conditions in Córdoba (Argentina). *Journal in Plant Disease and Protection*. 108: 530-535.
- **Glick B.,** 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
- **Glick B.,** 2004. Bacterial ACC-deaminase and the alleviation of plant stress. *Adv. Appl. Microbiol.* 56: 291-312.
- **Gobat J., Aragno M. y Matthey W.,** 2004. *The Living Soil . Fundamentals of Soil Science and Soil Biology*. Science Publishers. Enfield, NH, EEUU. 602 pp.

Bibliografía

- **González C., Rodríguez L., Arjona C., Puertas A. y Fonseca M.,** 1999. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* R. sobre la composición cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizosfera de solanáceas y su influencia en el crecimiento vegetativo.
- **González G.,** 2009. Uso de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, Inoculantes en el cultivo de Maíz (Rizofos Liq).
- **González-Vizcaíno A., Carmona M., Bago A., Cano C., García J., Pozo M., Segundo E.,** 2007. Potencial biofertilizante de micorrizas arbusculares en cultivo ecológico en invernaderos. En: http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/eventos-seae/cds/congresos/actas-bullas/seae_bullas/verd/posters/9%20P.%20FER/fer17.pdf
- **Guet G.,** 1997. Agricultura biologica mediterránea. L'Informatore Agrario 53(45): 85
- **Harley J. y Smith S.,** 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, New York.
- **Harman G., Taylor A. y Stasz T.,** 1989. Combinig effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. *Plant Dis* 73: 631-637.
- **Harman G. y Björkman T.,** 1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: Harman G., Kubicek C. eds. *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial applications. London: Taylor and Francis; 229-265.
- **Harrier L. y Watson C.,** 2003. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable cropping systems. *Advances in Agronomy*. 20: 185–225.

Bibliografía

- **Hashem M. y Kamal A.**, 2011. Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. Consultada el 10 de Mayo de 2011, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219410003601>
- **Honrubia M., Torres P., Díaz G. y Cano A.**, 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Proyecto LUCDEME VIII. Monografía nº 54 NEXUS ICONA.
- **Hornby D.**, 1990. Biological control of soil-borne plant pathogens. Wallingford, UK: CAB International.
- **Iverson R.**, 1984. Planting stock selection: Meeting biological needs and operational realities. In Duryea ML, TD Landis eds. Forest nursery manual. Oregon State University. Corvallis, USA. p. 261-266.
- **Jeffries P., Gianinazzi S., Perotto S., Turnau K. y Barea J.**, 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of soils* 37: 1-16.
- **Kennedy A. y Smith K.**, 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil* 170: 75-86.
- **Kloepper J., Schroth M.**, 1981. Plant growth promoting. *Phytopathology* 71: 642-644.
- **Kloepper J., Lifshitz R., y Zablotowicz R.**, 1989. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Tibtech* 7: 39-44.
- **Kumar S., Shender R. y Grover M.**, 2006. Interaction Among Beneficial Microorganisms. En Mukerji KG, Manoharachary C, Sigh J (Eds.) *Microbial Activity in the Rhizosphere*. Springer. Berlín, Alemania. pp. 121-132.

Bibliografía

- **Linderman R.**, 2000. Effects of mycorrhizas on plant tolerance to diseases, pp. 345-366. En: Arbuscular Mycorrhizas: physiology and function. Eds.: Y. Kapulnick and D.D. Douds Jr. Kluwer Academic Press.
- **Lindsey D. y Baker R.**, 1967. Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 57: 1262-1263.
- **Lorito M.**, 2006. La biología molecular de las interacciones entre *Trichoderma*, hongos fitopatógenos y plantas: oportunidades para desarrollar nuevos métodos de control de enfermedades.
- **Martínez C. y Ramírez F.**, 2000. Lombricultura y Agricultura Sustentable. 1ra. Edición, México D.F. 236 pp.
- **Martínez V.**, 2002. Biofertilización y producción agrícola sostenible. Retos y perspectivas. XIII Congreso Científico del INCA. Programa y resúmenes. La Habana.
- **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.
- **Mayea S., Carone Margarita, Novo R., Boado I., Silveira E., Soria M., Morales Y. y Valiño A.**, 1998. Microbiología Agropecuaria. Tomo II. Ed. Félix Varela. La Habana. pp 156-178.
- **Mayea S.**, 1995. Los biofertilizantes y su acción fitopatógena. Memorias del III Encuentro Nacional Científico Técnico de Bioplaguicidas y EXPOCREE. INISAV, Ciudad de La Habana, p. 41.

Bibliografía

- **Mejía G.**, 1995. Agricultura para la vida: movimientos alternativos frente a la agricultura química. Cali, Colombia: Feriva, 252.
- **Morte A., Lovisolo C. y Schubert A.**, 2000. Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal associatios *Helianthemum almeriense*-*Tefezia claveryi*. Mycorrhiza 10 (3): 115-119.
- **Morte A., Díaz G., Rodríguez P., Alarcón J. y Sánchez-Blanco M.**, 2001. Growth and water relations in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus halepensis* plants in response to drought. Biologia Plantarum 44 (2): 263-267.
- **Morte A. y Honrubia M.**, 2002. Growth response of *Phoenix canariensis* Hort. et Chabaud to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. Palms 46: 76-80.
- **Oliet J.**, 2000. La calidad de la postura forestal en vivero. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes de Córdoba. España.
- **Parets S.**, 2002. Evaluación agronómica de la coinoculación de micorrizas arbusculares, *Rhizobium phaseoli* y *Trichoderma harzianum* en el cultivo de fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis en opción al grado de Máster en Ciencias Agrícolas, Universidad Agraria de La Habana.
- **Peterson R., Massicotte H. y Melville L.**, 2004. Arbuscular mycorrhizas. En: Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. NRC-CNRC. Research Press.Otawa. Canada. Chap.3: 57-79.
- **Pozo M. y Azcón-Aguilar C.**, 2007. Unravelling mycorrhiza-induced resistance. Curr Op Plant Biol 10: 393-398.

Bibliografía

- **Reche J.**, 2010. Cultivo de tomate en invernadero. Publicado por: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- **Rodelas M.**, 2001. Interacción Rhizobium-Azospirillum y Rhizobium-Azotobacter. Efecto sobre la nodulación y fijación simbiótica del dinitrógeno en Vicia faba.
- **Rodríguez H. y Fraga R.**, 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319-339.
- **Santos M., Carretero F., Diánez F., de Cara M. y Tello. J.C.**, 2009. Characterization of soil suppression to *Fusarium* wilt. Book of Abstract. III International Conference on Environmental Industrial And Applied Microbiology (BioMicroWorld 2009, Lisboa, Portugal).155-155
- **Schalamuk S., Velásquez S., Chidichimo H. y Cabello M.**, 2006. Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effects of tillage. *Mycologia* 1: 22–28.
- **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.
- **Smith S. y Read D.**, 1997. Mycological Symbiosis. 2nd edn. Academic Press London.
- **Sobal M., Morales P., Bonilla M., Huerta G. y Martínez-Carrera D.**, 2007. El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. Capítulo 2.1, 14 pp. En: El Cultivo de Setas Pleurotus spp. En México. Sánchez J., Martínez-Carrera D., Mata G. y Leal H. (eds.). ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7.

Bibliografía

- **Trappe J.**, 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 15: 203-222.
- **Tejeda T., Soto F. y Guerrero G.**, 1998. Utilización de algunas variantes de infección micorrizica como alternativa nutricionales en obtención de posturas de cafeto mediante vías orgánicas. *Cultivos Tropicales (La Habana)* 19 (1): 28-32.
- **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.
- **Thompson J.**, 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. In: B.A. Stewart, *Advances in Soil Sciences*. New York, Springer-Verlag, I: 1-40.
- **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.
- **Trouvelot A., Kough J. y Gianinazzi-Pearson V.**, 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In : *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi (eds.). INRA Press, Paris, pp. 217-221.
- **Vessey J.**, 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.
- **Whipps J. y Lumsden R.**, 2001. Commercial Use of Fungi as Plant Disease Biological Control Agents: Status and Prospects. En *Fungi as Biocontrol Agents. Progress*,

Bibliografía

problems and potential. Butt T., Jackson C. y Magan N. (eds). Wallingford, UK.: CABI Publishing.

- **Weller D. y Thomashow L.**, 1993. Use of rhizobacteria for biocontrol. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 306-311.

- **Wu S., Cao Z., Li Z., Cheung M. y Wong W.**, 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125: 155-166.