



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS VERACRUZ**

POSTGRADO EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES

**RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL**

**EN PORTAINJERTOS DE CÍTRICOS**

**NAYELLI AYATZOL VIDAL MARTÍNEZ**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

TEPETATES, MANLIO FABIO ALTAMIRANO, VERACRUZ

2014

La presente tesis, titulada: **Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en portainjertos de cítricos**, realizada por la alumna: **Nayelli Ayatzol Vidal Martínez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

AGROECOSISTEMAS TROPICALES

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. FRANCISCO OSORIO ACOSTA

ASESOR:



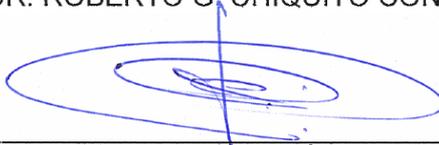
DR. ELISEO GARCÍA PÉREZ

ASESOR:



DR. ROBERTO G. CHIQUITO CONTRERAS

ASESOR:



DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ ROSAS

Tepetates, Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, Julio de 2014

# RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN PORTAINJERTOS DE CÍTRICOS

Nayelli Ayatzol Vidal Martínez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014.

Los biofertilizantes se definen como sustancias que contienen microorganismos vivos, que al aplicarse en semillas, suelo o a las raíces de las plantas pueden favorecer la disponibilidad de los nutrientes, así como incrementar el crecimiento, desarrollo y sanidad de la planta. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *Pseudomonas putida* sobre el crecimiento, contenido nutrimental y protección contra *Phytophthora parasitica* en los portainjertos de cítricos C-35, carrizo y *C. volkameriana*. Además de probar formulaciones para la conservación bacteriana. Los portainjertos fueron inoculados de manera individual y combinada con dos cepas de *P. putida*, con un testigo de manejo de vivero (MV) y un absoluto. Se estableció un diseño en parcelas divididas con tres portainjertos y cinco tratamientos, con seis repeticiones. Con base a las variables analizadas la prueba de contraste de medias mostró que la altura de plantas fue mejor en MV para carrizo y *C. volkameriana*, pero los tratamientos con bacterias superaron a los testigos en el diámetro de tallo. Para longitud y volumen de raíz, peso seco de raíz y aéreo, no se presentó una tendencia definida para ningún tratamiento en los tres portainjertos. El contenido nutrimental en el tejido vegetal el MV presentó los valores más altos de nitrógeno para los tres portainjertos probados, los demás tratamientos no mostraron diferencias en los macro y micronutrientes evaluados. Los formulados a base de glicerol y sorbitol, al 10 % solos o combinados, proporcionan un medio adecuado para la conservación de la bacteria hasta por 15 días a 4 y 28 °C. Al evaluar el antagonismo de las rizobacterias ante *P. parasitica* no se observó ningún daño en ningún tratamiento. Estos resultados indican que la presencia de las rizobacterias favoreció el contenido nutrimental de la planta y su crecimiento general, similarmente al tratamiento donde se aplicó fertilización (MV).

Palabras clave: *Pseudomonas spp.*, sorbitol, glicerol, biofertilización.

# RHIZOBACTERIA AS PROMOTORS OF PLANT GROWTH IN CITRUS ROOTSTOCKS

Nayelli Ayatzol Martínez Vidal, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

Biofertilizers are defined as substances containing living microorganisms, which when applied to seeds, soil or plant roots can promote nutrient availability and increase plant growth, development and health. The study objective was to evaluate the effect of *Pseudomonas putida* on the growth, nutrient content and antagonistic effect to *Phytophthora parasitica* of citrus rootstocks C-35, carrizo and *Citrus volkameriana*. In addition, formulations with glycerol or sorbitol for bacterial conservation were tested. Rootstocks were inoculated individually and combined with two strains of *P. putida*, a nursery management (NM) and untreated controls were used. We established a split-plot design with three rootstocks, five treatments and six replicates. Based on the variables analyzed, the means contrast showed that plant height was greater in NM for carrizo and *C. volkameriana*, but treatments with bacteria exceeded controls for stem diameter. For root length and volume, dry root and aerial plant weight showed no definite trend for any treatment for any of the rootstocks examined. The nutrient content in NM plant tissue had the highest nitrogen values for the three rootstocks tested; the other treatments showed no differences in macro- and micronutrients. The formulas with 10 % glycerol or sorbitol, alone or in combination, provide an adequate means of conserving the bacteria for 15 days at 4 and 28 °C. Assessments of rhizobacteria antagonism to *P. parasitica* showed no damage in any treatment. These results indicate that the presence of rhizobacteria favored plant nutrient content and overall growth, similarly to treatment with fertilizers (MV).

Keywords: *Pseudomonas* spp., sorbitol, glycerol, biofertilization.

## **DEDICATORIA**

**“Mis padres son mi columna vertebral. Todavía lo son. Son el único grupo que te apoyará si tu puntuación es cero o si marcas cuarenta”**

**Kobe Bryant**

**Dedico mi grado, con todo mi amor, a mi familia:**

**A mi padre, Librado Vidal Hernández**

**A mi madre, Martha Martínez Santos**

**A mi Hermana, Enna Citlalli**

**Sin ellos, este logro en mi vida no hubiera sido posible.**

## AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados y a sus directivos por brindarme la oportunidad de formarme en tan prestigiada institución, así como también por las facilidades y el apoyo brindado durante mi estancia.

A CONACyT por brindarme la beca para llevar a cabo esta investigación.

A los propietarios del Vivero “San Manuel” por confiar en mí y permitirme la entrada a su empresa para la realización de esta investigación.

Al Ing. Julio Contreras González por todo el apoyo y las facilidades brindadas durante mi estancia en el vivero “San Manuel”.

Al Dr. Francisco Osorio Acosta por ser mi padre académico durante todo este tiempo, por sus enseñanzas así como por su tiempo y paciencia para conmigo.

Al Dr. Roberto G. Chiquito Contreras por ser una vez más parte importante de un logro más en mi vida, por todas las enseñanzas, apoyo, tiempo y sobre todo por la amistad brindada durante tantos años.

A los Drs. Eliseo García Pérez y Francisco Hernández Rosas por sus asesorías, aportaciones y consejos para este trabajo experimental.

A la M.C. Doris Guadalupe Castillo Rocha y M.C. César J. Chiquito Contreras, por todo el apoyo brindado y asesorías durante mi estancia en el Laboratorio de Química Agrícola de la Universidad Veracruzana.

Dra. Gabriela Sánchez Viveros por sus asesorías, orientación y apoyo moral durante toda esta faena, muchas gracias por la amistad.

A todos mis amigos y compañeros que compartieron conmigo esta aventura y que fueron parte importante, siempre me alentaron a seguir adelante.

A mis padres y hermana por ayudarme y apoyarme siempre, los amo.

## CONTENIDO

	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. Concepto de agroecosistema .....	3
2.2. Subsistema vivero.....	3
2.3. Generalidades de los cítricos.....	4
2.4. Portainjertos de cítricos.....	7
2.4.1. <i>Citrus volkameriana</i> .....	8
2.4.2. Carrizo.....	8
2.4.3. Citrange C-35.....	8
2.5. Generalidades de la gomosis ( <i>Phytophthora parasitica</i> Breda de Hann) .....	9
2.5.1. Ubicación taxonómica <i>Phytophthora parasitica</i> .....	11
2.5.2. Métodos de control para <i>Phytophthora parasitica</i> .....	12
2.5.2.1. Control cultura I.....	12
2.5.2.2. Control químico.....	13
2.5.2.3. Control biológico.....	14
2.5.2.4. Control legal .....	14
2.6. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal .....	15
2.7. Uso de bacterias como control biológico .....	17
2.8. Interacción planta- microorganismo.....	18
2.9. Biofertilizantes .....	19
2.10. Formulados químicos para la conservación de <i>Pseudomonas putida</i> .....	20
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	22
3.1. Objetivos específicos .....	22
<b>4. HIPÓTESIS GENERAL</b> .....	22
4.1. Hipótesis específicas.....	22

<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
5.1. Microorganismos utilizados.....	23
5.1.1. Activación y propagación de cepas bacterias.....	23
5.1.2. Obtención y crecimiento de <i>Phytophthora parasitica</i> .....	23
5.1.3. Material vegetal utilizado.....	23
5.2. Fase de vivero.....	24
5.2.1. Localización geográfica.....	24
5.2.2. Diseño experimental.....	24
5.2.3. Preparación de suspensión bacteriana .....	25
5.2.4. Inoculación de rizobacterias en portainjertos de cítricos .....	25
5.3. Variables de estudio.....	25
5.4. Identificación molecular de colonias bacterianas obtenidas del análisis de UFC.....	26
5.4.1. Purificación del ADN de cepas bacterianas.....	26
5.4.2. Amplificación del gen ADN ribosomal de las cepas <i>P. putida</i> .....	27
5.5. Prueba de patogenicidad.....	28
5.6. Evaluación del crecimiento de <i>P. putida</i> en dos medios de cultivo y de formulados para su conservación.....	28
5.7. Aplicación de encuesta a viveristas cítricos certificados .....	30
5.8. Calculo de costos.....	30
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	31
6.1. Contenido de nutrientes del suelo utilizado en el proceso productivo del vivero.....	31
6.2. Contenido nutrimental de hojas de los portainjertos de cítricos Carrizo, C-35 y <i>C. volkameriana</i> .....	34
6.3. Crecimiento vegetativo de los portainjertos C-35, Carrizo y <i>C.</i> <i>volkameriana</i> promovido por la inoculación de <i>P. putida</i> .....	37
6.4. Cuantificación de unidades formadoras de colonias bacterianas.....	40
6.5. Amplificación del gen ADN ribosomal de las cepas <i>P. putida</i> .....	43
6.6. Evaluación antagónica de las cepas rizobacterianas de <i>P. putida</i> frente a <i>P. parasitica</i> .....	45

6.7. Valoración del crecimiento de <i>P. putida</i> en un medio de cultivo alternativo.....	46
6.8. Evaluación de formulados químicos para la conservación de cepas rizobacterianas de <i>P. putida</i> .....	47
6.9. Análisis de costos entre la fertilización biológica y química.....	49
6.10. Interpretación de la encuesta realizada a viveristas certificados de la zona de Martínez de la Torre, Ver.....	50
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>53</b>
<b>8. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>55</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>64</b>

## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Tratamientos experimentales definidos para su evaluación en condiciones del vivero “San Manuel”..	24
Cuadro 2. Tratamientos con sorbitol y glicerol para la conservación de las cepas FCA-8 y FCA-56 de <i>P. putida</i> .....	29
Cuadro 3. Contenido de macro y microelementos en el suelo utilizado en el proceso productivo del vivero antes y después de concluir la investigación.....	33
Cuadro 4. Contenido nutrimental de las hojas de los portainjertos C-35, Carrizo y <i>C. volkameriana</i> .....	36
Cuadro 5. Promedio de las variables de crecimiento de C-35, Carrizo y <i>C. volkameriana</i> con la inoculación de <i>P. putida</i> .....	39
Cuadro 6. Relación de costos aproximados para elaborar 1 L de cultivo para <i>P. putida</i> .....	49
Cuadro 7. Comparación del gasto entre un fertilizante químico y uno biológico por un ciclo de 12 meses.....	50

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Esquema de las interacciones del subsistema vivero productor de planta certificada de cítricos....	5
Figura 2.	Estadística nacional sobre la superficie de cítricos en México entre los años 2002 y 2009.....	6
Figura 3.	Ciclo biológico de los Oomicetos del género <i>Phytophthora</i> spp. ....	10
Figura 4.	Poblaciones de <i>Pseudomonas putida</i> en la rizósfera de portainjertos de cítricos con base a los tratamientos utilizados .....	41
Figura 5.	Cuantificación de unidades formadoras de colonias rizosféricas encontradas por portainjerto de cítricos.....	42
Figura 6.	Identificación molecular de <i>P. putida</i> en los tratamientos (T1-T5) del portainjerto C-35 por PCR	43
Figura 7.	Identificación molecular de <i>P. putida</i> en los tratamientos (T1-T5) del portainjerto Carrizo por PCR.....	44
Figura 8.	Identificación molecular de <i>P. putida</i> en los tratamientos (T1-T5) de <i>C. volkameriana</i> por PCR...	44
Figura 9.	Cicatrización del tallo de portainjertos a los 15 días después de la inoculación con <i>P. parasítica</i> .....	45
Figura 10.	Concentración de bacterias inoculadas en medio AN y B-King sólido incubados a 24, 48 y 72 horas..	46
Figura 11.	Concentración de bacterias inoculadas en medio CN y B-King líquido incubados a 24, 48 y 72 horas.	47
Figura 12.	Concentración a los 7 y 15 días para formulados incubados a 4° C .....	48
Figura 13.	Concentración a los 7 y 15 días para formulados incubados a 28° C .....	48

## I. INTRODUCCIÓN

México está en el grupo de países productores líderes en la producción de cítricos, se ubica como el quinto productor de cítricos en el mundo (FAO, 2012). Hecho por el cual se destina aproximadamente medio millón de hectáreas para los cultivos cítricos, se distribuyen en 23 estados con clima tropical y subtropical (Díaz, 2010), con tal superficie se obtienen 6.9 millones de toneladas anuales, con un valor de 12 mil 507 millones de pesos, en beneficio de 67 mil productores; esta actividad genera 70 mil empleos directos y unos 250 mil indirectos (SIAP, 2012).

México es el exportador más importante de limón Persa (*Citrus latifolia* Tanaka), destina al exterior aproximadamente el 70 % de su producción (Díaz, 2010). Los cítricos de mayor importancia económica en nuestro país son la naranja (*Citrus sinensis* L.), el limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle), el limón Persa (*C. latifolia*), las mandarinas (*Citrus reticulata*), las tangerinas (*Citrus reticulata* A. x *Citrus paradisi*) y las toronjas (*Citrus medica* L.) (Díaz, 2010).

El estado de la república mexicana de mayor importancia en la producción de cítricos es Veracruz con una producción para el año 2011 de 2.1 millones de t de limón Persa, 4.1 millones t de naranja y 394 mil t de toronja, seguido de Michoacán, Colima y Tamaulipas (SIAP, 2012).

Esta producción extensiva e intensiva de cítricos favorece la presencia de plagas y enfermedades, uno de los problemas fitosanitarios reconocidos y endémicos en los cítricos lo constituye la enfermedad causada por los Oomicetos del género *Phytophthora parasítica* y *P. citrophthora*, que es conocida como: gomosis, podredumbre del cuello de la raíz y parte basal del tronco. Se presenta en regiones tropicales, subtropicales y templadas, la incidencia depende principalmente de las condiciones climáticas (Duran y Moreno 2000; Timmer *et al.*, 2002).

Esta enfermedad afecta a las especies de naranjo dulce, mandarino, clementino, toronja y limonero (Durán y Moreno, 2000). Se caracteriza por la exudación de goma a través de la corteza del árbol que se agrieta y toma aspecto húmedo (Agueda, s/a). *Phytophthora* spp. es un Oomiceto muy activo en suelos muy húmedos, especialmente en los suelos arcillosos con pobre drenaje. Estas condiciones

producen abundantes zoosporas que penetran en los tejidos e inician la colonización que generalmente dan lugar a la enfermedad (Durán y Moreno, 2000).

Convencionalmente la prevención y control de este patógeno se ha realizado a través de medidas terapéuticas y aplicaciones de fungicidas de acción sistémica o de contacto, estrategia que ha permitido solucionar el problema provisionalmente; sin embargo, el uso continuo y desmedido de insumos inorgánicos ha generado que el patógeno presente resistencia hacia los componentes químicos utilizados. Por ello, el aprovechamiento de rizobacterias para controlar a este patógeno, representa una solución a largo plazo, sin inducir ningún tipo de resistencia, además coadyuvarían en la disminución del uso de agroquímicos promoviendo la obtención de cosechas inocuas (Jiménez *et al.*, 2001; Serrano y Galindo, 2007). Diversos géneros de rizobacterias benéficas como *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Acetobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* juegan un papel fundamental en la nutrición y sanidad de las plantas debido a sus múltiples actividades metabólicas, como son: la fijación de bióxido de carbono, fijación de nitrógeno atmosférico y nitrificación, translocación del fósforo liberado por la solubilización de las rocas, entre otras (Elbeltagy *et al.*, 2001; Kennedy e Islam 2001; Hernández *et al.*, 2004; Radwan *et al.*, 2004; Thankuria *et al.*, 2004). Estos beneficios tienen como resultado un buen estado nutricional, adecuado nivel hídrico, mejor estructura de los agregados del suelo y menor incidencia y severidad de enfermedades en las plantas, al actuar como agentes de control biológico de bacterias y hongos fitopatógenos; ya que liberan metabolitos como salicilatos, ácido cianhídrico, antibióticos, enzimas líticas (glucanasas y quitinasas), fitoalexinas y sideróforos (Jiménez *et al.*, 2001).

Por la liberación de estos metabolitos, las rizobacterias podrían ejercer actividad antagónica hacia *P. parasitica*, agente causal de la gomosis, disminuyendo la incidencia y severidad de éste patógeno sobre las plantas de cítricos (Hernández *et al.*, 2007). Las rizobacterias pueden actuar en dos vías: como promotores eficientes del crecimiento y como agentes de control biológico.

Este trabajo propone una alternativa biológica para tratar de proteger los cítricos de daños causados por *P. parasitica*, con el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), así como reducir el impacto ecológico que causa el uso de agroquímicos y al mismo tiempo obtener productos inocuos.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Concepto de agroecosistema**

En la actualidad un agroecosistema logra tener un gran impacto en nuestra vida, más que cualquier otro ecosistema, gracias a él podemos obtener comida, fibras y pueden llegar a modificar la calidad de nuestro ambiente (Sarandón, 2002).

Dentro de las características que tiene un agroecosistema, como lo menciona Bates (1972), es un paisaje alterado por el hombre. De acuerdo a lo descrito por Gliessman (1998) un agroecosistema es un sitio de producción agrícola el cual nos permite analizar sistemas de producción agropecuarios en su totalidad. Ruiz (1995) nos da un definición más concreta sobre agroecosistema: “unidad de estudio de la actividad agrícola, bajo un enfoque agroecológico y sistemático, donde inciden los factores tecnológicos, socioeconómicos y ecológicos para la obtención de alimentos y otros satisfactores del ser humano a través del tiempo”.

Con base a las definiciones antes mencionadas podemos concluir que un agroecosistema es un medio físico natural o unidad experimental donde se realizan actividades agrícolas en el cual interactúan factores ambientales, sociales, políticos y económicos. Dentro del sistema agrícola pueden identificarse diversos subsistemas, los cuales pueden interrelacionarse entre sí para satisfacer las diversas necesidades de la población.

### **2.2. Subsistema vivero**

El conocimiento y funcionamiento de la estructura de los agroecosistemas es fundamental, para así poder orientar la productividad primaria a la obtención de especies que satisfagan las necesidades y los propósitos humanos. Existen ciertos elementos en la producción agrícola que han podido ayudar a la relación entre la sociedad y la naturaleza. Como cada sistema estos elementos requieren de su interacción dinámica para permitir el progreso de la sociedad productora (Leff, 1981).

Los sistemas agrícolas son determinados por factores bióticos y abióticos por las condiciones sociales humanas. En el análisis del subsistema vivero es importante reconocer aquellos factores de entrada que contribuyen a la obtención de una planta de calidad, dentro de esos factores se encuentran los ambientales, cuyos elementos

como la temperatura, el agua y humedad son detonadores del crecimiento y desarrollo de variedades de portainjertos. Sin embargo, la interacción de estos elementos pueden contribuir a la presencia de especies animales y/o vegetales dañinas, que generan efectos negativos sobre el rendimiento y calidad de la producción (Hart, 1979). Esto conlleva a la necesidad de optar por incluir al sistema la interacción de factores que ayuden a controlar estos desbalances, como son los factores legales, los cuales proporcionan información sobre leyes y normas para poder minimizar el impacto que pueden provocar los problemas fitosanitarios a nivel mundial. Otros factores exógenos importantes en la estructura son los sociales y económicos, debido a que generan una estructura y funcionamiento particular dentro del subsistema vivero; como es la implementación de técnicas (mano de obra especializada) y tecnología innovadora (Insumos: plaguicidas y material vegetal genéticamente modificado) (Vázquez, 2010).

En los sistemas modernos, existe la importancia de ayudar a preservar los recursos naturales por lo cual, generalmente se adoptan alternativas ecológicas para el control fitosanitario a través de productos elaborados a base de organismos benéficos, así como adopción de técnicas de manejo integrado, que además de poder ayudar a disminuir la presencia de patógenos de manera preventiva y de promover el crecimiento y desarrollo de las plantas, favorecen la disminución de productos químicos que dañan al medio ambiente, generando productos de excelente calidad que favorecen al consumidor. Con base a información obtenida de la literatura, se realizó el esquema sobre la interacción de factores en un subsistema vivero (Figura 1).

### **2.3. Generalidades de los cítricos**

El origen de los agrios se localiza en Asia Oriental, en una zona que abarca desde la vertiente meridional del Himalaya hasta China meridional, Indochina, Tailandia, Malasia e Indonesia. Actualmente, su cultivo se extiende por la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales comprendidas entre los paralelos 44° N y 41° S (Agustí, 2000). El primer fruto cítrico conocido por los occidentales fue la toronja (*Citrus medica* L.), que se encontró cultivada en Asia Media (hoy Irán) por los científicos que acompañaban a Alejandro Magno en sus conquistas asiáticas, alrededor del año 330 A.C. (Amorós, 2003).

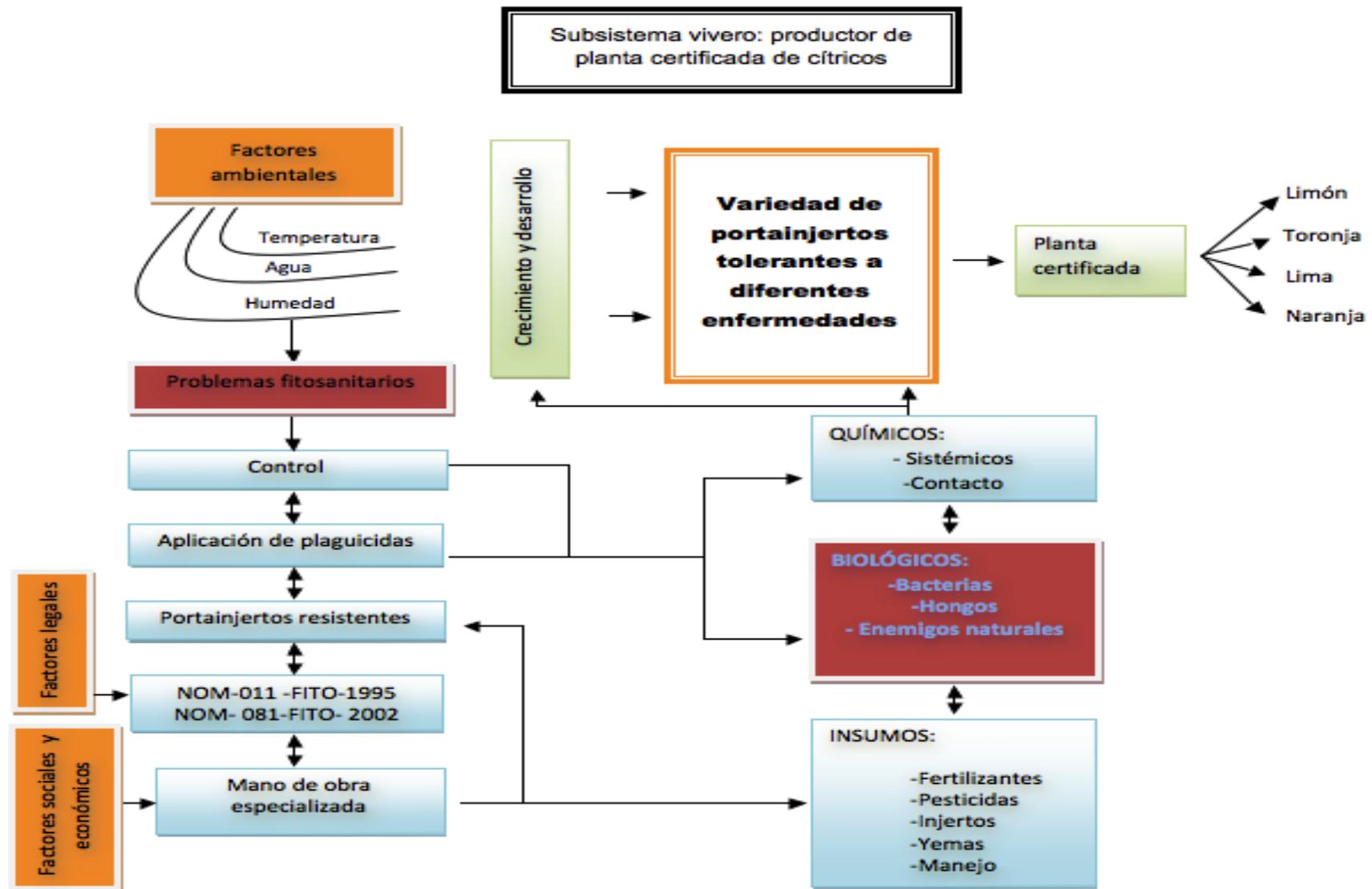


Figura 1. Esquema de las interacciones del subsistema vivero productor de planta certificada de cítricos.

De acuerdo a datos de SIAP (2012) los principales países productores de cítricos son ocho en donde destaca China en primer lugar con una producción total de 24 millones de t, seguido de Brasil con 10 millones de t, India se encuentra en tercer lugar con una producción neta de 6.9 millones de t. México se encuentra en quinto lugar con una producción total de 6.9 millones de t, de los cuales 1.9 pertenecen a limón, 4.1 a naranja, 0.5 para mandarina y tangerina y 0.4 millones para toronja.

En cuanto a la superficie cultivada con cítricos en México, entre los años 2000 y 2009, ascendió a 532,850 hectáreas en promedio, para el 2010 se registraron, al mes de septiembre más de 5 000 hectáreas de naranja, limón y toronja de las cuales se cosecharon 63.1 % de naranja, 26.6 % de limón y 3.4 % de toronja (Figura 2) (SIAP, 2011).

Dentro de los principales estados donde se realiza la citricultura, destacan las regiones con clima tropical y subtropical, entre ellas se encuentra Veracruz con un 55 % de la producción total de los cítricos; San Luis Potosí y Tamaulipas que en conjunto representan un 22 % de superficie sembrada, así como Puebla y Nuevo León con un 22 % (SAGARPA, 2012).

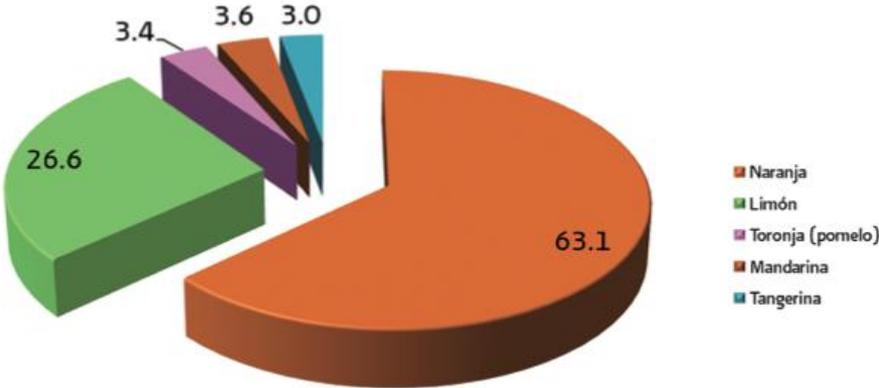


Figura 2. Estadística nacional sobre la superficie de los cítricos en México entre los años 2000 y 2009.

Para el estado de Veracruz, la citricultura es una de las principales actividades agrícolas, ya que en la actualidad se cultiva aproximadamente una superficie de 213, 107 ha y se cuenta con una producción anual de 2 millones 873 mil toneladas, siendo Alamo-Temapache el principal municipio productor de cítricos seguido de Martínez de la Torre (SAGARPA, 2009).

A pesar de ser un cultivo que genera muchos ingresos, los cítricos se ven afectados por diversas enfermedades que reducen la calidad del fruto y en algunas ocasiones causan la muerte de miles de árboles, estas suelen ser causadas por virus, hongos, nematodos, viroides y bacterias (Timmer *et al.*, 2002). Entre las enfermedades que representan una amenaza para las plantaciones cítricas se encuentran: gomosis, cáncer basal, mancha grasienta, mancha foliar, antracnosis del limón, roña, fumagina, psorosis, exocortis, Virus de la tristeza, leprosis y actualmente destaca el Huanglongbing (HLB), enfermedad de origen bacteriano (Garnsey, 1999; Orozco, 2001; Timmer *et al.*, 2002; Trujillo *et al.*, 2008).

#### **2.4. Portainjertos de cítricos**

La selección del portainjerto en la producción de cítricos es de suma importancia, debido a que el portainjerto puede influir en más de 20 características sobre el injerto. Existe desconocimiento de variedades y sus necesidades para cada uno, como es temperatura, humedad, clima y tipo de suelo, pueden repercutir fuertemente en densidad, precocidad y altos costos de producción (CCIA, 1998; Agusti 2000). Por el contrario, el buen uso de un portainjerto puede ayudar a obtener mayor cantidad y calidad en frutos, así como tratar de evitar ataques de hongos u otros patógenos (Joublan y Cordero, 2002). En la actualidad existen numerosos portainjertos, pero entre los más utilizados en la producción cítrica se encuentran: Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni*), Naranja dulce (*Citrus sinensis*), Citrages (Troyer, Carrizo, C-35), Limas Rangpur (*Citrus limonia Osbeck*) y Limones (Volkameriana, Rugoso) (Samaniego *et al.*, s/a).

Según Loussert (1992) las características de un buen portainjerto son las siguientes:

- Una asociación injerto/patrón tolerante a la enfermedad del virus de la tristeza de los cítricos.

- Una buena resistencia a la gomosis producida por *Phytophthora*, principal enfermedad criptogamita que afecta a los tejidos conductores de savia de raíces y tronco.
- Una buena adaptación a suelos alcalinos.
- El efecto favorable del patrón sobre el injerto, se traduce en una rápida entrada en producción, una productividad elevada y continua, y una buena calidad de los frutos, tanto por su calibre como por su riqueza en jugo.
- Multiplicación y cultivo fácil en vivero, ya que las plantas homogéneas ofrecen buena afinidad con el injerto de las principales especies y variedades comerciales.

#### **2.4.1. *Citrus volkameriana***

Es un híbrido natural del limonero, ha tenido gran expansión gracias a sus cualidades, ya que ofrece vigor, presenta tolerancia a la caliza, tristeza de los cítricos, exocortis y psorosis; así como una moderada resistencia a climas fríos, salinidad y ataques por *Phytophthora* ssp. Se adapta bien en suelos ligeros, bien drenados y tiene un intervalo amplio de adaptación de pH, desde suelos ácidos hasta aquellos de pH alto. En vivero tiene crecimiento rápido y origina plantas uniformes, vigorosas y precoces (Agusti 2000; Citricas, 2011).

#### **2.4.2. Carrizo**

Es un híbrido de *Citrus sinensis* Osb. naranja 'Washington' X *Poncirus trifoliata* L. Es un portainjerto de rápido desarrollo en viveros y produce plantas muy vigorosas, es recomendable para suelos profundos, se adapta a suelos calcáreos, es resistente a climas fríos así como también a podredumbre de raíz y cuello, la psorosis, xiloporosis, exocortis, al virus de la tristeza de los cítricos (VTC) así como a nematodos. Se considera un portainjerto de producción elevada (Wutsches, 1979; Castle, 1987; Medina, 1995; Jackson y Davies, 1999).

#### **2.4.3. Citrange C-35**

Citrange utilizado con mucho éxito en España, manifiesta un comportamiento similar al Carrizo (Agronet, 2005). Es un híbrido de naranjo dulce, tolerante al VTC y

resistente al nematodo de los cítricos. Da lugar a árboles más pequeños que los Citranges Troyer y Carrizo y es sensible a la clorosis férrica (Soler y Soler, 2006).

## **2.5. Generalidades de la Gomosis (*Phytophthora parasitica* Breda de Haan)**

El género *Phytophthora* (del griego Phytón: planta; pthora: destructor) fue reconocido por De Bary en 1876 (Ho-Hing, 1990). Cook y Horne en 1908 dieron a conocer los primeros reportes de presencia de *Phytophthora* en Cuba y para 1939 Cook definió a *P. parasitica* como el agente causal de la pudrición del pie y la gomosis en ese país (Zentmyer y Mitchell, 1986).

El patógeno es muy activo en suelos muy húmedos, especialmente en los arcillosos con pobre drenaje. Estas condiciones producen abundantes zoosporas que penetran en los tejidos e inician la infección que generalmente dan lugar a la enfermedad (Durán y Moreno, 2000).

Este Oomiceto presenta un micelio cenocítico ramificado en forma rizoidal, con esporangios globosos limoniformes u ovales, papilados; anteridio anfígeno, oogonio terminal. La zoospora es esférica y amarillenta; produce también abundantes clamidosporas, intercelulares, o terminales, esféricas lisas y amarillentas; zoosporas producidas heterotáticamente, a una temperatura de entre 20 °C a 25 °C (Mendoza, 1983). Gracias a sus esporas sexuales, puede sobrevivir en forma latente, tiene muy poca capacidad competitiva y es importante conocer los procesos de reproducción (Figura 3), ya que juegan un papel fundamental para el ciclo de vida, ya sean estos asexuales o sexuales (Romero, 1994).

La lluvia y el viento diseminan las esporas y en consecuencia la enfermedad puede invadir toda la plantación en pocos días, siempre y cuando existan condiciones favorables para el desarrollo del patógeno. En tanto existan estas condiciones las oosporas germinan dando esporangios que liberan las zoosporas, estas nadan en un movimiento oscilante por algún tiempo y en caso de que no encuentren el estímulo del hospedante se enquistan transformándose en nueva estructura de resistencia. Si perciben los estímulos químicos de sus hospedantes, se aproximan a ellos usando sus flagelos a través del agua y el quimiotropismo que las caracteriza; también pueden llegar a su hospedante en forma pasiva a través del salpicado de lluvia o riego (Mendoza, 1983; Pérez *et al.*, 2010;).

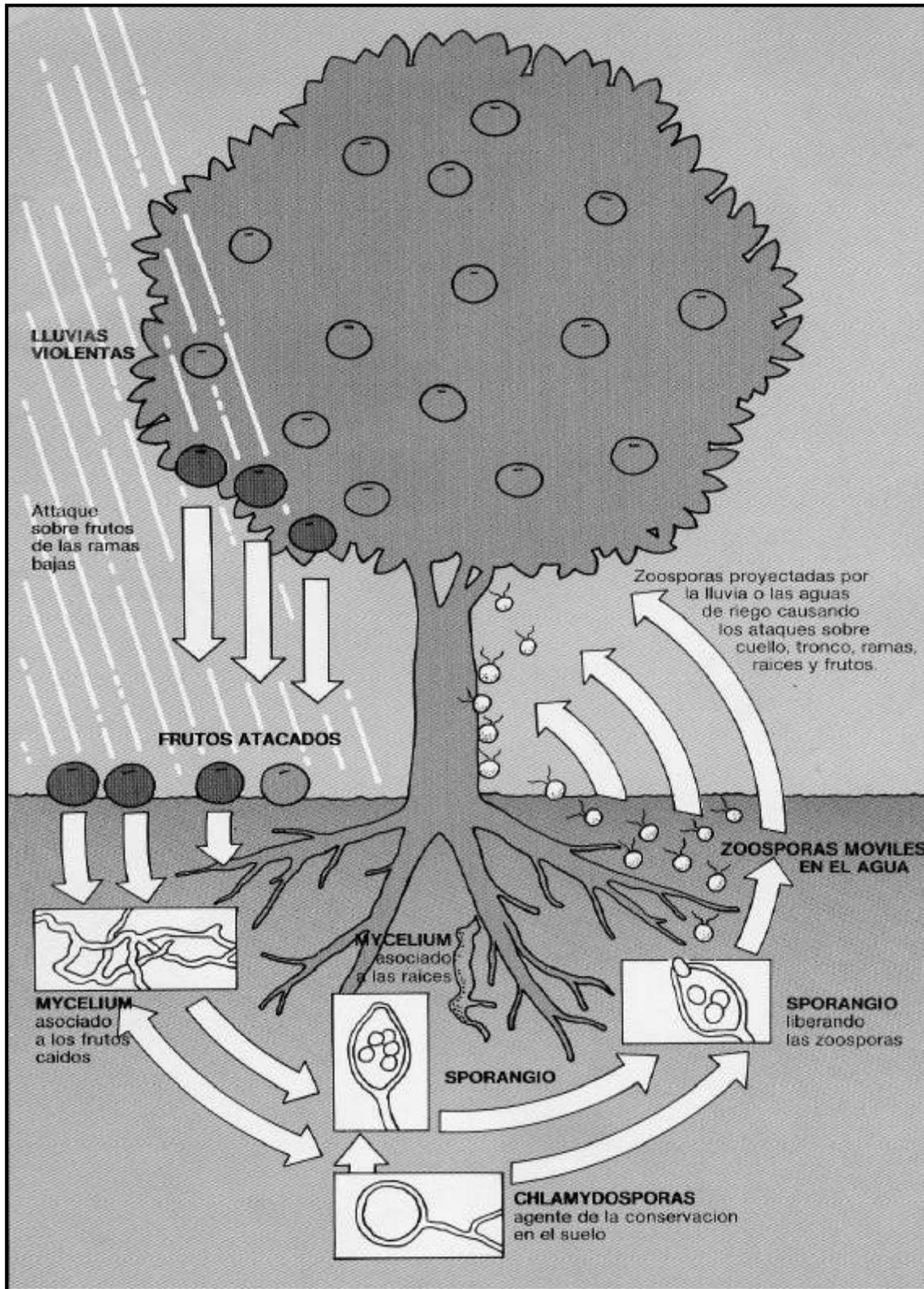


Figura 3. Ciclo biológico de los Oomicetos del género *Phytophthora* spp.  
 (Tomado de Echemedia, s/a)

Este Oomiceto generalmente pasa el invierno en forma de espora que al germinar invade en un principio el sistema radicular, logrando ocasionar lesiones en la parte basal del tallo donde se producen esporangios que posteriormente liberan zoosporas; para la germinación de éstas se requieren temperaturas de 12 a 15 °C y el desarrollo óptimo del micelio, en la planta hospedera, requiere de una temperatura de 17 a 21 °C. Para prosperar eficientemente esta enfermedad necesita como mínimo 4 horas con temperaturas abajo del punto de rocío y la temperatura nocturna no debajo de 10 °C, nublados y lluvias al día siguiente (Mendoza, 1983).

La infección de este patógeno en la planta, tiene lugar a través de alguna herida en la corteza o en la unión del injerto. Una vez que ha penetrado, invade tejidos del floema y llega al cambium, dañando la corteza interior, sin embargo la corteza exterior permanece firme con pequeñas grietas donde se exuda abundante goma (Timmer *et al.*, 2002; Agueda s/a).

Descrito el ciclo de esta enfermedad se pueden identificar algunas estrategias o métodos de control para tratar de evitarla o atenuarla; aunque una vez que la enfermedad se desencadena es muy difícil limitar su extensión (Whiteside *et al.*, 1996).

### **2.5.1. Ubicación taxonómica *Phytophthora parasítica***

De acuerdo a lo reportado por Pérez *et al.* (2010):

Reino: Stramenopila

División: Oomycota

Subdivisión: Mastigomicotina

Clase: Phycomycetes

Subclase: *Oomycetes*

Orden: Peronosporales

Familia: Phythiaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora parasitica*

## **2.5.2. Métodos de control para *Phytophthora parasítica***

### **2.5.2.1. Control cultural**

Es recomendable evitar la siembra en suelos pesados o que tengan mal drenaje, sí el suelo tiene estas características es aconsejable diseñar un buen drenaje para evitar la acumulación de agua (Boa y Bentley, 2001).

En caso de contar con suelos poco drenados, con riego por inundación o contar con algún problema de encharcamiento de agua, se deberán de realizar bordos y llevar a cabo el trasplante en la cima de éstos, para poder evitar el contacto directo del cuello del árbol con el agua. Sí el riego es por goteo se debe evitar colocar la manguera cerca del tronco del árbol, evitando así la acumulación de humedad (ETACH, 2008; SISPRO, 2008).

Las podas fitosanitarias son esenciales, así podremos evitar que durante el crecimiento del árbol las ramas se traslapen e impidan una buena iluminación y aireación, lo que generaría las condiciones óptimas para el desarrollo del patógeno (ETACH, 2008).

Al realizar el proceso de injerto es conveniente no hacerlo demasiado abajo, evitar heridas al tronco y cuello del tallo, no colocar restos de malezas ni hojarasca alrededor del tallo y moderar la fertilización nitrogenada (Posadas, 2010). La eliminación de las áreas de corteza dañadas, así como la aplicación de calor directamente a las zonas dañadas, sí bien hoy se encuentran en desuso, sin embargo, producen resultados muy interesantes y efectivos (Duran y Moreno, 2000).

Es recomendable realizar monitoreos y muestreos en campo para detectar la presencia de la enfermedad, éstos pueden ser antes de realizar la plantación, tomando muestras de suelo (en Zig- Zag) o realizando filtrados de suelo, esto para poder realizar un conteo de esporas presentes en el suelo. Cuando la plantación está establecida, el monitoreo debe realizarse después de alguna labor que implique la

formación de heridas, después del corte de frutos y después de las épocas de abundante lluvia y humedad (Reyes, 2011, Comunicación personal)<sup>1</sup>.

La DANR (1991), recomienda que para realizar un buen muestreo en campo es necesario conocer la biología del huésped y el patógeno. En el caso de *Phytophthora* spp. los primeros síntomas de su presencia suelen ser fáciles de reconocer, gracias a esto se puede realizar una detección temprana y así aplicar acciones rápidas para salvar los árboles. Durante el muestreo si se observa un árbol con el 50 % o más de daño en el tronco es recomendable y económico sustituir al árbol que tratar de controlar la infección (DANR, 1991).

#### **2.5.2.2. Control químico**

Se basa en la aplicación preventiva de fungicidas derivados de cobre (oxicloruro de cobre), dictiocarbamatos (zineb, mancozeb, etc.), ftalimidas (folpet), éstos bloquean la germinación de los esporangios y zoosporas (Agustí, 2000). Los productos deberán aplicarse en la base de los troncos y tallos cuando se prevean fuertes lluvias o se vislumbren los primeros exudados gomosos, o incluso cuando los tejidos corticales empiecen a ennegrecerse. Con los fungicidas sistémicos aplicados a las hojas (fosetil-Al y ácido fosforoso) o al suelo (fosetil Al y metalaxil), se han conseguido muy buenos resultados. La aplicación de estos productos debe coincidir con las épocas de brotación de los árboles (Duran y Moreno, 2000).

La acción de los fungicidas es sobre las esporas y sobre los micelios. La aplicación de fosetil-Al debe llevarse a cabo cuando se observe la iniciación de la lesión. Se recomienda realizar tres tratamientos mediante pulverización foliar, a concentraciones entre 0.2 y 0.3 % de producto comercial, el primero a los 10 o 20 días de iniciada la brotación de primavera, el segundo durante la brotación de verano, y el tercero a los dos meses del anterior (finales de verano). Si las lesiones se encuentran muy desarrolladas, antes de la aplicación de fosetil-Al debe realizarse una labor de cirugía, eliminando las zonas dañadas, aplicando algún fungicida de contacto y se debe sellar la herida con emulsión asfáltica. La eficacia del fosetil-Al en condiciones de campo sobre la gomosis es evidente, llega incluso a controlar la podredumbre de las raíces y mejora el sistema radical afectado por *Phytophthora* spp. El metalaxil también controla la

---

<sup>1</sup> Reyes P.N. 2011. Colegio de Postgraduados. Campus Veracruz.

enfermedad, se aplica al suelo en dosis de 30 a 50 g/m<sup>2</sup> y se distribuye por la zona de goteo de los árboles afectados (Agustí, 2000).

De una manera preventiva es recomendable recubrir los primeros 40 cm de la base del tronco principal y ramas secundarias, con caldo bordelés. Esta pasta se elabora diluyendo 250 g de sulfato de cobre y 100 g de cal de manera separada en recipientes de plástico. Luego, se mezclan con 2 litros de agua para formar una lechada con la que se recubre. También se puede aplicar en la zona de la herida de la planta después de haber realizado podas fitosanitarias (ETACH, 2008).

### **2.5.2.3. Control biológico**

El control biológico de plagas consiste en el uso de enemigos naturales y microorganismos para el control de poblaciones (Nicholls, 2008). De entre los organismos antagónicos que mayormente son usados como agentes de control biológico destacan *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. (Sivan *et al.*, 1984; Nelson y Craft, 1992).

Hallmann *et al.* (1997) aseguran que la aplicación de tratamientos con bacterias endofíticas es un método económico, rápido, práctico y seguro para proteger a las plantas contra el ataque de patógenos, ya que el uso de estas bacterias combinando tratamientos en semilla, aplicación en hojas, raíces y hasta en el propio suelo pueden incrementar su presencia y por lo tanto generar mayores y mejores beneficios a la producción.

### **2.5.2.4. Control legal**

No existe una Norma Oficial Mexicana en la que detallen algunos requisitos para el manejo o control de *Phytophthora parasitica*, pero podrían apegarse algunas reglas establecidas actualmente para cualquier actividad relacionada con la citricultura mexicana actualmente vigentes:

- NOM-079-FITO-2002: Considera los requisitos y especificaciones fitosanitarias para la producción y movilización de material propagativo libre del virus que causa la tristeza y de otras virosis asociadas a cítricos. En este documento se establecen de manera detallada los requisitos que deben cumplir los bancos de germoplasma, lotes de fundación y productores de yema y viveros de

cítricos. Lo anterior permitirá garantizar que el material que se ofrece al productor se encuentra libre de enfermedades como el VTC, psorosis, exocortis y cachexia (SAGARPA, 2002).

- NOM-011-FITO-1995: Se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de los cítricos, mediante el establecimiento de regulaciones y medidas fitosanitarias para la importación de los productos objeto de este ordenamiento (SAGARPA, 1996).
- NOM-008-FITO-1995: Establece los requisitos y especificaciones fitosanitarios para la importación de frutos y hortalizas frescos (Senasica, 2009).
- NOM-081-FITO-2001: Se implementa el manejo y eliminación de focos de infestación de plagas, mediante el establecimiento o reordenamiento de fechas de siembra, cosecha y destrucción de residuos (Senasica, 2002).

## **2.6. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal**

Se define rizósfera como la región del suelo que rodea las raíces de una planta lo cual hace diferir significativamente del resto del suelo. Debido a que en esta zona se pueden encontrar un gran número de microorganismos benéficos que pudieran estar asociados íntimamente a las raíces de las plantas y de acuerdo a esto, pudiera existir un gran efecto positivo en el desarrollo de las plantas (Ingraham e Ingraham, 1998).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) o PGPR por sus siglas en inglés (Plant Growth Promoting Rizobacteria) son microorganismos de vida libre que viven en la rizósfera en estrecho contacto con las raíces-suelo, gracias a las sustancias exudadas por las raíces: aminoácidos, proteínas, enzimas, azúcares, ácidos orgánicos y vitaminas, entre otros. Estos microorganismos tienen la capacidad de penetrar y proliferar en el interior de las raíces, establecerse y desarrollar poblaciones endófitas en los tejidos internos de las plantas (Davis y Curry, 1991; Caballero, 2006; Holguín, 2008; Lemanceau *et al.*, 2009; Riveros, 2010). Estas bacterias pueden realizar funciones como estimular la producción de sustancias reguladoras del crecimiento, fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes, control de fitopatógenos en el suelo, así como la capacidad de inducir cambios

fisiológicos en las plantas que ayudan a incrementar el crecimiento de la misma. Ayudan a activar reguladores relacionados con el crecimiento como son las auxinas, citocininas y giberelinas, inducen en la planta resistencia a patógenos y disminuyen la concentración de etileno dentro de la planta. El grupo de microorganismos al que pertenecen las BPCV son las definidas por Kloepper en 1978 como Plant growth promoting rhizobacteria. Se han aislado diferentes géneros bacterianos dentro de los principales y de interés agrícola se encuentran *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Rhodopseudomonas*, *Derxia* y *Beijerinckia* (Elbeltagy *et al.*, 2001; Kennedy e Islam 2001; Hernández y Escalona, 2003; Hernández *et al.*, 2004; Radwan *et al.*, 2004; Thankuria *et al.*, 2004).

Sin embargo, Bashan y Holguin (1998) propusieron una nueva clasificación para estos microorganismos dependiendo el beneficio que pueden aportar, de tal forma que el término se divide en PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria – Bacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas) y Biocontrol-PGPB (Biocontrol- Plant Growth Promoting Bacteria – Bacterias Promotoras del crecimiento de las plantas con actividad de biocontrol). El primero de los términos aplica a bacterias que pueden influir directamente sobre el metabolismo de las plantas, como es el desarrollo radical y por lo tanto el aumento en la absorción de agua y nutrientes, así como la estimulación de otros organismos benéficos presentes en la rizósfera. En cuanto a la clasificación de Biocontrol- PGPB, incluye aquellas bacterias que tienen la capacidad de suprimir microorganismos fitopatógenos gracias a la producción de metabolitos inhibitorios o por la inducción de resistencia natural de la planta. No obstante es importante mencionar, que en algunos casos la misma especie puede entrar en ambas clasificaciones (Hernández *et al.*, 2007).

El efecto que logran causar estos microorganismos puede ser inducido ya sea de manera directa o indirecta; en el primero de los casos, estas rizobacterias proporcionan a la planta efectos del tipo hormonal, es decir, sintetizando sustancias que actúan sobre ella estimulando el desarrollo. Estos compuestos pueden ser nitrógeno, hormonas del crecimiento y ciertos nutrientes como el hierro o fósforo. En cuanto a la manera indirecta, pueden proporcionar protección a aquellas plantas que crecen en condiciones extremas, expuestas a otros microorganismos patógenos o que se encuentran en situaciones de estrés que puede afectar su desarrollo (Wall, 2002; Sarabia *et al.*, 2010).

En general bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de promover el crecimiento de las plantas vía producción de sideróforos extracelulares que secuestran óxidos férricos para convertirlos en formas disponibles para las raíces, así mismo también se incrementa el volumen radical, incrementan la absorción de nutrimentos como son N, P y K. Existen *Pseudomonas* productoras de sustancias anti-fúngicas que logran que la planta genere raciones extra de aminoácidos: la fenazina y el DAPG (diacetilfluoroglucinol) (Peter *et al.*, 1987; Díaz *et al.*, 2001; Holguín, 2008).

## **2.7. Uso de bacterias como control biológico**

En la rizósfera existen bacterias y gracias a que colonizan las raíces de las plantas pueden ser categorizadas de acuerdo a efectos deletéreos, benéficos o neutros, siendo que estos efectos pueden variar en función del hospedero y del ambiente (Schroth y Weinhold, 1986).

Un agente de control biológico, generalmente cuenta con uno o varios mecanismos antagonistas que actúan para poder controlar o eliminar al patógeno. Esos mecanismos pueden ser: la colonización rápida del hábitat, parasitismo sobre la plaga o patógeno, producción de enzimas capaces de perforar y destruir al patógeno, producción de antibióticos, compuestos inhibitorios como sideróforos, enzimas líticas y detoxificadoras (Bais *et al.*, 2004; Serrano y Galindo, 2007). También funcionan activando el sistema de defensa de la planta al interactuar con ella, esta activación puede ser a nivel local o sistémico (Zamioudis y Pieterse, 2012).

Se ha demostrado que el uso de rizobacterias como control biológico ha traído resultados positivos, como es el caso del uso de cepas de *Pseudomonas fluorescens* que ha jugado un papel importante en el control de enfermedades en el cultivo de trigo, la cepa de *Burkholderia cepacia* ha demostrado reducción de presencia de daños causados por *Rhizoctonia solani* Kühn en algodón y así como también en el cultivo de maíz, reduciendo la incidencia de hongos como *Phythium* y *Fusarium* (Bonsall *et al.*, 1997; Mao *et al.*, 1997; Zaki *et al.*, 1997).

En el caso de las bacterias denominadas *Pseudomonas* constituyen un género muy abundante en la rizósfera de cultivos agrícolas, principalmente por la capacidad de metabolizar una amplia gama de sustancias carbonatadas así como la capacidad de suprimir el desarrollo de patógenos en la rizósfera esto gracias a su habilidad de

producir metabolitos de naturaleza antibiótica tales como pyoluteorina, pyrrolnitrina, fenacina-1-ácido carboxílico y 2-4 diacetyl-phloroglucinol (Picard *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2007; Loredó *et al.*, 2007).

Desafortunadamente en la actualidad el uso de estos productos como agentes de control representan un concepto totalmente nuevo en el control de fitopatógenos (Serrano y Galindo, 2007).

## **2.8. Interacción planta-microorganismos**

La región del suelo que rodea las raíces de la planta denominada rizósfera, la cual está definida por Hiltner (1904) como el volumen de suelo influenciado por la presencia de raíces de una planta viva, en la cual podemos encontrar gran variedad de ecología microbiana. Ésta depende en gran medida de la composición y concentración de los nutrientes exudados por las raíces de las plantas, que puede influir en gran medida en el crecimiento, desarrollo de las plantas y hasta contribuir en el control de patógenos, ya que los exudados radicales son utilizados como fuente nutritiva por los microorganismos (Ingraham e Ingraham, 1998; Wamberg *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2008; Soroa *et al.*, 2009). Como exudados importantes de la planta para el desarrollo de bacterias, hongos, actinomicetos y algas en la rizósfera se encuentran la tiamina, niacina, colina, inositol, piridoxina, ácido N-metil nicotínico entre otros (Anaya *et al.*, 2001; Acuña *et al.*, 2006). Se estima que los exudados rizosféricos pueden llegar a contener entre 10 y 44 % del carbono asimilado entre otros compuestos que ayudan al incremento de densidades poblacionales de microorganismos (Primavesi, 1984).

Los microorganismos residen dentro de los espacios intercelulares o en el interior de las células del huésped (Bandani *et al.*, 1997). En cuanto a la entrada de las bacterias ocurre en sitios de daño epidérmico, raíz lateral o aparición radicular, además a través de aberturas naturales como los estomas. La concentración de las bacterias promotoras en los tejidos radicales, así como el grado de concentración y la eficiencia están relacionados con el genotipo de la planta, tejido vegetal, estado fenológico del cultivo, desarrollo radical, flujo de fotosintatos hacia la raíz, variedades, condiciones de siembra y el uso de fertilizantes (Barranquío *et al.*, 1997).

## 2.9. Biofertilizantes

Actualmente existe un gran interés por restaurar los suelos y con ello la microfauna benéfica mediante estrategias que puedan mejorar la productividad agrícola de manera que no se contamine el medio ambiente, ya que el uso indiscriminado de insumos inorgánicos ha alterado el equilibrio ecológico (Reyes *et al.*, 2008). El uso de biofertilizantes es considerado como un componente de manejo integrado de la nutrición vegetal y se han definido como sustancias que contienen microorganismos vivos, que al aplicarse a las semillas, suelo o a las raíces de las plantas pueden proporcionar buen desarrollo, así como también mejorar la disponibilidad y la absorción de nutrientes y la sanidad vegetal en la planta (Veseey, 2003). Este biocontrol puede resultar de la interacción entre el patógeno y el controlador biológico, este realiza la producción de enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa,  $\beta$ 1, 3-glucanasa y proteasa que rompen las estructuras de los hongos parasitados; también generan metabolitos secundarios compuestos tóxicos y/o antibióticos que ayudan a suprimir principales patógenos en las raíces y por lo tanto la protección de la planta. Esto porque las raíces constituyen un buen hábitat para el desarrollo microbiano, debido al medio en el que se desarrollan, es un ambiente de alta humedad y de altas concentraciones de nutrimentos (González, 2005; Riveros, 2010; Fernández y Vega, 2011). Los exudados radicales formados por azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos en combinación con el suelo crean un medio selectivo para la existencia de grandes poblaciones microbianas, que establecen diferentes interacciones con la planta de manera positiva (Whipps, 2001; Nelson, 2004).

Hoy en día los biofertilizantes han ganado un mayor impulso ya que son considerados una entrada ideal para reducir los costos en cultivos, así como también elevar la práctica de la agricultura sustentable, además de que son más económicos y de fácil transportación en comparación con los fertilizantes químicos utilizados en la actualidad por los productores (Aguirre *et al.*, 2009). En tanto, en la parte ecología, se considera que una correcta utilización y/o aplicación permitiría la reducción de energía, menor degradación de los agroecosistemas y menores pérdidas de nutrientes (Hernández, 2000).

A pesar de todas las investigaciones realizadas, no se tiene muy claro el término de biofertilizante, sin embargo, Muraleedharan *et al.* (2010) lo definen como una

sustancia que contiene microorganismos vivos los cuales colonizan la rizósfera o el interior de la planta, promoviendo el crecimiento por el incremento de los principales nutrientes.

Numerosos microorganismos del suelo han sido aprovechados para la elaboración de estos productos, como es el caso de: *Rhizobium* utilizado como fitoestimulantes, *Azospirillum* como biopesticidas para el control biológico o *Pseudomonas* utilizadas como bioinoculantes, llamadas también PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kapulnik y Okon, 2002; Loredó *et al.*, 2007).

No obstante del conocimiento adquirido sobre las acciones que pueden generar el uso de las BPCV, como es la fijación de nitrógeno y solubilización de nutrientes, lo que conlleva al crecimiento de raíces y morfología de la planta, se presentan limitaciones al uso de biofertilizantes. Principalmente que no es conocida la eficacia de la mayoría de los mismos, debido a que aún no se ha entendido con precisión el mecanismo de acción en la promoción del crecimiento de las plantas, es por ello que día a día crece el interés por la investigación de éstos (Muraleedharan *et al.*, 2010).

Dentro de los tipos de biofertilizantes encontrados hoy en día Muraleedharan *et al.* (2010) mencionan los siguientes:

- Biofertilizantes fijadores de nitrógeno: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* y *Azotobacter*.
- Biofertilizantes solubilizadores de fósforo: *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Aspergillus*.
- Biofertilizantes movilizadores de fosfatos: Micorrizas.
- Biofertilizantes promotores del crecimiento vegetal: *Pseudomonas* spp.

## **2.10. Formulados químicos para la conservación de *Pseudomonas putida***

Existen diferentes técnicas para conservación de microorganismos, aunque es importante mencionar que ninguno de ellos es universal. Para la elección de un método es importante tener en cuenta las características fenotípicas y genotípicas de las bacterias o de cualquier tipo de material biológico a conservar, para poder realizar una correcta preservación (Morales *et al.*, 2010).

Los métodos generales de conservación pueden ser agrupados de acuerdo a dos principales factores los cuales son tiempo y características fisiológicas del microorganismo, con base en esto, se encuentran dos grandes grupos: a) Métodos a largo plazo en los que se encuentran la conservación por congelación y por liofilización; b) Métodos a corto plazo, entre los cuales están la conservación por transferencia periódica o subcultivos, así como la conservación por suspensión en agua destilada o agua estéril (Arencibia y Rosario, 2003). Para obtener una conservación exitosa es de vital importancia tener en cuenta las condiciones necesarias para poder mantener la pureza de cultivo, evitando contaminación durante el proceso de conservación así como la viabilidad celular, la cual debe de estar entre un 70 y 80 % durante el tiempo de conservación, costos del proceso cantidad de cultivo y frecuencia de uso (García y Uruburú, 1991; Meza *et al.*, 2004).

Con base a la situación problemática reportada en la bibliografía y la existente en la zona de estudio en los agroecosistemas citrícolas, el presente trabajo de investigación tiene la finalidad de aportar conocimiento y alternativas que puedan dar respuesta a las siguientes preguntas:

¿Cuál será el crecimiento y contenido nutrimental de los portainjertos de cítricos con la aplicación de *Pseudomonas putida* en comparación con la fertilización química?

¿Cuánto disminuirá la incidencia de *Phytophthora parasitica* en portainjertos de cítricos con el uso de *Pseudomonas putida*?

¿Cuál será el nivel de conocimiento y uso de rizobacterias de los viveristas certificados de Veracruz?

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el crecimiento, contenido nutrimental y la protección contra *Phytophthora parasitica* que confiere *Pseudomonas putida* a portainjertos de cítricos bajo condiciones de un vivero certificado.

#### **3.1. Objetivos Específicos**

Favorecer el crecimiento de cítricos en vivero con el uso de *Pseudomonas putida*.

Evaluar la tolerancia de portainjertos de cítricos inoculados con *Phytophthora parasitica*.

Promover la conservación de cepas de *Pseudomonas putida* con formulados químicos con base en sorbitol y glicerol.

Identificar el nivel de conocimiento de los viveristas certificados en la aplicación y beneficios de los biofertilizantes.

### **4. HIPÓTESIS GENERAL**

La inoculación con *Pseudomonas putida* favorece el crecimiento y contenido nutrimental de portainjertos de cítricos en condiciones de vivero y promueven la tolerancia a *Phytophthora parasitica*.

#### **4.1. Hipótesis Específicas**

La inoculación con rizobacterias incrementa el crecimiento y contenido nutrimental de los portainjertos de cítricos en condiciones de vivero.

Existe una correlación positiva entre la colonización por rizobacterias en plántulas de cítricos y la reducción de la presencia de *Phytophthora parasitica* en vivero.

Formulados a base de sorbitol y glicerol preservan a *Pseudomonas putida* bajo condiciones de temperatura medioambiental.

Al menos el 10 % de los productores encuestados tendrán el conocimiento necesario sobre la aplicación y beneficio de los biofertilizantes.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Microorganismos utilizados

#### 5.1.1. Activación y propagación de cepas bacterianas

Para esta investigación se utilizaron Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) pertenecientes a la especie de *P. putida* catalogadas como FCA-8 y FCA-56. Estas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Química Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana, Campus Xalapa.

Las cepas fueron activadas sembrándolas en 50 mL de medio de cultivo B-King líquido (glicerol 10 mL L<sup>-1</sup>, peptona 15 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 1 mL L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g L<sup>-1</sup>), previamente esterilizado durante 15 minutos a 120 °C, e incubadas a 28 °C.

#### 5.1.2. Obtención y crecimiento de *Phytophthora parasitica*

Se utilizó una cepa de *Phytophthora parasitica*, catalogada como CPT-12 proporcionada por el Dr. Carlos Fredy Ortiz García, del Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Esta fue aislada de corteza de limón Persa. El mantenimiento y crecimiento de la cepa fue en medio de cultivo V8 [jugo V8® (Campbell's) 300 mL L<sup>-1</sup>, CaCO<sub>3</sub> 4 g L<sup>-1</sup>, agar 15 g L<sup>-1</sup>], esterilizado en autoclave a una temperatura de 120°C durante 15 minutos e incubadas a 28°C.

#### 5.1.3. Material vegetal utilizado

Se utilizaron tres portainjertos que se seleccionaron de acuerdo a su respuesta a *Phytophthora parasitica*, los cuales fueron: *C. volkameriana*, Carrizo y C-35. La respuesta ante *P. parasitica*, según Curtis *et al.* (2000) y Curtis (2007) mencionan un nivel aceptable de tolerancia para los dos primeros injertos y para C-35 mencionan un nivel medianamente tolerante ante el patógeno.

Los tres portainjertos fueron proporcionados por el Ing. Julio Contreras González gerente-técnico del vivero "San Manuel". El trasplante e inoculación se llevó a cabo cuando las plantas presentaron hojas verdaderas y una altura entre 10 y 15 cm. Para el trasplante se utilizaron bolsas de polietileno negro con capacidad para 3.0 Kg. El sustrato utilizado fue suelo de vega de río y fue proporcionado por el vivero.

## 5.2. Fase de vivero

### 5.2.1. Localización geográfica

Esta etapa de investigación se llevó a cabo en el vivero certificado “San Manuel” localizado en el municipio de Martínez de la Torre, Veracruz, siendo su ubicación geográfica 20° 04’ de Latitud Norte y 97° 04’ de Longitud Oeste, y una altitud de 151 msnm.

### 5.2.2. Diseño experimental

De acuerdo a los portainjertos y tratamientos evaluados, se estableció un diseño experimental en parcelas divididas, las parcelas grandes estuvieron representadas por los portainjertos *C. volkameriana*, C-35 y Carrizo y, las subparcelas conformadas por cinco tratamientos con cinco repeticiones y una planta como unidad experimental por tratamiento. De acuerdo al número de cepas y los portainjeros seleccionados se consideraron los siguientes tratamientos (Cuadro 1):

Cuadro 1. Tratamientos experimentales definidos para su evaluación en condiciones del vivero “San Manuel”.

Tratamiento	Tipo de fertilización ( O manejo)
T- 1	FCA-8 + FCA-56
T- 2	FCA-56
T- 3	FCA-8
T- 4	Manejo de vivero*
T- 5	Testigo Absoluto**

\*Se manejó de acuerdo al sistema productivo del vivero en cuanto a fechas de fertilización y cantidad de aplicación de fertilizantes.

\*\*No se aplicó ningún tipo de fertilizante (químico ó biológico), sólo riegos habituales con agua corriente empleada generalmente en el sistema de producción del vivero.

### **5.2.3. Preparación de suspensión bacteriana**

Para realizar la solución bacteriana se prepararon 300 mL de medio B-king líquido (glicerol 10 mL L<sup>-1</sup>, peptona 15 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 1mL L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g L<sup>-1</sup>) por cada una de las cepas utilizadas, esterilizado durante 15 minutos a 120 °C. Para sembrar las bacterias se tomó una azada de la cepa correspondiente, que estaba sembrada en medio B-king sólido y fue depositada en el matraz con medio líquido, se incubaron durante 4 días a 28 °C.

Al transcurrir el tiempo de incubación se realizó la lectura para conocer la concentración de la suspensión con ayuda de un espectrofotómetro digital (Thermo-Spectronic Genesys 20®) a 660 nm, la suspensión fue ajustada con solución salina (0.8 %) fisiológica previamente esterilizada, a una concentración final de 10<sup>9</sup> células mL<sup>-1</sup> y un volumen total de 500 mL de suspensión por cepa bacteriana.

### **5.2.4. Inoculación de rizobacterias en portainjertos de cítricos**

Antes de realizar el trasplante cada portainjerto fue inoculado con las cepas de rizobacterias según el tratamiento correspondiente. El sistema radical de las plantas fue sumergido en la suspensión bacteriana durante 20 minutos. Los portainjertos cuyos tratamientos consistieron en la aplicación de rizobacterias, así como el testigo absoluto no se les aplicó ningún tipo de fertilización durante el tiempo de evaluación en vivero. En cambio los portainjertos correspondientes al tratamiento 4 (manejo de vivero) se fertilizaron a los 68 días después del trasplante con la fórmula química 12-11-18 (N-P-K). Estos tratamientos se manejaron de acuerdo al proceso técnico productivo desarrollado por el vivero.

## **5.3. Variables de estudio**

A cada uno de los tratamientos utilizados se les cuantificó: diámetro de la base del tallo y altura de la planta una vez al mes durante los 6 meses (posterior a trasplante) que estuvieron las plantas en vivero. Al final del experimento se evaluó: longitud y volumen de raíz, biomasa fresca y seca de toda la planta, así como colonización bacteriana de raíz (UFC g<sup>-1</sup> de raíz en medio de cultivo BK) de acuerdo a la metodología descrita por Zulueta *et al.* (2009). Se realizó análisis de macro (N, P, K, Ca, Mg y Na) y micro (Fe, Zn, Mn, Cu) elementos del suelo antes de establecer el ensayo y al final en cada uno de los tratamientos por portainjerto. Para los primeros

se utilizaron métodos diversos, así para el nitrógeno total, se calculó en relación al contenido de materia orgánica de cada suelo (método matemático), para predecir el nivel de disponibilidad de fósforo en el suelo, se utilizó el método de Olsen (Olsen *et al.*, 1954); la determinación del ion potasio intercambiable se llevó a cabo por el método flamométrico al igual que el ion sodio; los iones calcio y magnesio se determinaron por el método de Diehl *et al.*, (1950). Para los microelementos su determinación fue de acuerdo al método DTPA como agente quelante. También se llevaron a cabo análisis foliar de N, P, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mn.

A excepción de los resultados de análisis foliar y de suelo, los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y las medias se compararon por la técnica de contrastes, comparando los testigos contra todos los tratamientos y entre ellos para cada variable, mediante el programa SAS para Windows versión 6.12.

#### **5.4. Identificación molecular de colonias bacterianas obtenidas del análisis de UFC**

##### **5.4.1. Purificación de ADN de cepas bacterianas**

De las colonias obtenidas mediante la prueba de UFC de cada tratamiento al final del ensayo, se tomó una colonia bacteriana, por tratamiento, sembrada en agar nutritivo sólido y se transfirió en medio líquido constituido por agua con peptona, en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Para su propagación se dejó en agitación continua a 190 rpm durante 48 h. Se centrifugó el cultivo a 6000 rpm durante 8 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 350  $\mu$ L de solución Birboim I (Glucosa 50 mM, Tris-HCL 25 mM, pH 8.0) previamente esterilizado. Como siguiente paso se agregaron 650  $\mu$ L de solución Birboim III (e.g. para preparar 5mL agregar: 250  $\mu$ L de SDS 20 % +100  $\mu$ L de NaOH 10N y el resto de agua milipore estéril), se agitó por inversión dos veces para después adicionar 400  $\mu$ L de solución Birboim III (Acetato de potasio + ácido acético para ajustar pH 4.8) y se agitó por inversión dos veces más.

Las muestras se mantuvieron en hielo por 30 minutos para posteriormente centrifugarlas a 9000 rpm por 10 min. Se colectó el sobrenadante en tubos Eppendorf, se adicionó un volumen de isopropanol frío y se mantuvo a -20 °C durante 1 h. Nuevamente se volvió a centrifugar a 1000 rpm por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 350  $\mu$ L de agua destilada. Se agregó 1

μL de RNasa, se incubó en Termoblock (Nahita®) por 30 minutos a 37 °C y se adicionó la décima parte del volumen total de acetato de amonio 10N mezclando en vortex (Corning®). Se adicionaron 350 μL de fenol-Tris, se mezcló con ayuda de un vortex y se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm, la fase acuosa se traspasó a un tubo nuevo Eppendorf. Para limpiar remanentes de fenol-Tris se agregaron 350 μL de cloroformo y se centrifugó por 5 minutos a 1400 rpm, de nuevo la fase acuosa obtenida se traspasó a un tubo nuevo, para posteriormente añadir 2 volúmenes de Isopropanol frío. Enseguida se mezcló por inversión y se mantuvo la fase acuosa durante 5 minutos a -20 °C, como siguiente paso se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm para compactar el ADN, se volvió a descartar el sobrenadante y se lavó 2 veces la pastilla con 0.7 mL de etanol 70 % frío. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y por último se resuspendió en 200 μL de TE (10 mM- 1 mM- pH 8) según el tamaño de la pastilla.

La calidad del ADN extraído de cada tratamiento se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con buffer TBE 0.5X en una cámara horizontal (EasyCast™) 95 V durante 1 hora. El gel de agarosa fue teñido en 100 mL de bromuro de etidio por 15 minutos. Las bandas de ADN fueron observadas en un transiluminador (UVP®) de luz blanca (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **5.4.2. Amplificación del gen ADN ribosomal de las cepas *P. putida***

Para la amplificación del ADN ribosomal purificado se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con los primers: Bact Forward 5'-GAT CCT GGC TCA AC-3' y Bact Reverse 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC-3' (Tambong *et al.*, 2009). Cada reacción se preparó a un volumen final de 25 μL, conformado por: agua ultrapura estéril, 9.3 μL; 10mM dNTPs los Oligo A y Oligo B; 25 mM de MgCl<sub>2</sub>; 2.0 μL de ADN de la muestra y Taq ADN polimerasa 5U/U 0.2 μL, fue depositada en tubos Eppendorf de 1.5 mL los cuales se colocaron en un termociclador (Bio-Rad®) con el siguiente programa: una desnaturalización inicial de 2 min a 92 °C, 30 ciclos en desnaturalización a 92 °C por 1 minuto, alineamiento a 55 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Los amplificadores obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con buffer TBE 1X en una cámara horizontal a 95 V durante 1 hora. Las bandas de ADN fueron observadas en un transiluminador de luz blanca.

### **5.5. Prueba de patogenicidad**

Para evaluar la tolerancia a *Phytophthora parasitica* en los portainjertos que fueron inoculados con las BPCV, se trataron 10 plantas por tratamiento elegidas aleatoriamente.

Para la inoculación de *Phytophthora parasitica* sobre las plantas, se procedió a desinfectar el tallo a una altura de 5 cm de la base con alcohol al 70 %, con un sacabocados esterilizado se extrajeron 0.5 cm de diámetro de la corteza en el cual se colocó un disco de medio de cultivo V8 del mismo diámetro, con micelio de *Phytophthora parasitica*. El tallo inoculado se envolvió con cinta microporosa para mantener en su sitio el disco de medio de cultivo conteniendo el micelio. Las plantas fueron regadas hasta saturar el suelo de la maceta, se cubrieron individualmente con bolsas de polietileno transparente (60 x 90 cm) a manera de cámara húmeda. Durante las primeras 24 horas se mantuvieron a una temperatura de 20 °C y en cuarto oscuro; después de este tiempo se procedió a quitar las bolsas, se incrementó la temperatura a 25 °C y se eliminó la oscuridad.

Transcurridos 15 días se evaluó la incidencia con base en la presencia de síntomas ocasionados por la infección del patógeno.

### **5.6. Evaluación del crecimiento de *P. putida* en dos medios de cultivo y de formulados para su conservación**

Para conocer el crecimiento de *P. putida* en un medio alternativo a B-king, se realizaron siembras de la bacteria en medio líquido y sólido elaborados a base de caldo nutritivo y agar nutritivo, se establecieron 3 repeticiones por medio de cultivo, estos se incubaron a 28 °C durante 24, 48 y 72 horas. Para conocer la concentración de las placas se realizaron lavados aplicando 15 mL de sorbitol + glicerol al 10 %. Al finalizar la incubación se procedió a hacer una lectura, tanto del lavado de cajas como de la concentración de bacteria en medio líquido, esto con ayuda de un espectrofotómetro digital (Termo-Spectronic Genesys 20®).

Para evaluar la capacidad de conservación de las rizobacterias en formulados elaborados a base de sorbitol, glicerol, y leche semidescremada, se llevaron a cabo pruebas para conocer la concentración y temperatura adecuadas para la preservación. Con base en pruebas preliminares se establecieron las concentraciones que se describen a continuación. En leche semidescremada, glicerol y sorbitol se valoraron concentraciones de 5 y 10 % además de la combinación de éstos. Así como la aplicación de peptona de carne (1 g por cada 50 mL) en cada uno de los tratamientos de los formulados. Se elaboraron tres repeticiones por tratamiento y se incubaron durante 7 y 15 días a temperaturas de 4° y 28 °C. Los tratamientos de los formulados quedaron como se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tratamientos con sorbitol y glicerol para la conservación de las cepas FCA-8 y FCA-56 de *P. putida*

Formulados	Concentración	Costo de elaboración de 1 L de formulado
Leche	5 %	\$ 19.75
Sorbitol	10 %	\$ 28.66
Glicerol	10 %	\$ 40.25
Sorbitol + Leche	10 %	\$ 46.16
Glicerol + Leche	10 %	\$ 57.75
Sorbitol + Glicerol	10 %	\$ 84.91

Para obtener las bacterias que se conservarían en los formulados, se realizó el lavado bacteriano de cajas Petri (100 x 20 mm) que estuvo durante 48 h de incubación a 28 °C, aplicando 15 mL de solución Tween 20 al 0.01 %. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a una velocidad de 4000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se realizó un lavado de la pastilla, aplicando 10 mL de agua destilada estéril, en seguida, se volvió a centrifugar durante 5 min a la misma velocidad. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió con el formulado correspondiente hasta obtener la concentración de  $10^9$  células mL<sup>-1</sup> mediante la lectura en un espectrofotómetro a 660 nm, posteriormente fueron incubados de acuerdo a la temperatura y el tiempo indicado anteriormente.

Para conocer la concentración en cada uno de los formulados, se realizó la lectura con ayuda de un espectrofotómetro (Thermo-Spectronic Genesys 20®) a 660 nm a los 7 y 15 días de incubación.

### **5.7. Aplicación de encuesta a viveristas citrícolas certificados**

Para conocer la disponibilidad, uso y conocimiento de biofertilizantes por parte de los viveristas, en especial aquellos elaborados a base de bacterias benéficas se elaboró un cuestionario, este instrumento fue aplicado a viveristas certificados de la zona de Martínez de la Torre (Anexo 1). Los datos obtenidos se clasificaron de acuerdo a las respuestas de los productores, y se obtuvieron los valores porcentuales de cada pregunta.

### **5.8. Calculo de costos**

Además de identificar los beneficios que representa la aplicación de las bacterias en el desarrollo de las plantas, se calculó el costo de la aplicación de las rizobacterias y se comparó con el de aplicación de fertilizantes, para definir si el uso de bacterias es más económico que la fertilización química, además de los beneficios adicionales al suelo.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Contenido de nutrientes del suelo utilizado en el proceso productivo del vivero

El análisis del suelo realizado previo y posterior al establecimiento del experimento en el vivero "San Manuel" se muestra en el Cuadro 3, el suelo que se utilizó fue de una textura franco-arenoso con un contenido de 78 % de arena, 18 % de limo y 4 % de arcilla. De acuerdo a Soler y Soler (2006) este tipo de suelo influye en que el porte del árbol sea de mayor tamaño, así como también en el sistema radical y por lo tanto, es el indicado para obtener fruta de mejor calidad.

En el análisis previo al montaje del experimento, el pH del suelo presentó un valor de 6.5 (Cuadro 3) de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000 es un suelo moderadamente ácido. Conforme a Loussert (1992) los agrios requieren un suelo ligeramente ácido a neutro de entre 6.5 a 7.0. En el análisis posterior al experimento, el pH en el suelo del vivero fue modificado obteniendo un valor diferente dependiendo el tratamiento utilizado, es decir, en unos aumentó y en otros disminuyó su valor. En los tres portainjertos utilizados, el pH se incrementó en los tratamientos representados por las cepas FCA-8 + FCA-56, FCA-8, FCA-56 y testigo absoluto con un valor de entre 7 a 7.5, resultando neutro a moderadamente alcalino, el cual está cercano al requerimiento de los cítricos. Ante esto Kirlw y Bouldin (1987) y Kirk *et al.* (1993) (citados por Robles y Barea, 2004) mencionan que los microorganismos modifican las características fisicoquímicas del suelo. La actividad microbiana es responsable directa o indirecta de cambios en la disponibilidad nutrimental así como de variaciones en el valor del pH y del potencial de óxido-reducción. En tanto, para el tratamiento manejo de vivero, el pH resultó afectado mostrando un valor de entre 4.8 y 5.3 dando como resultado un suelo de fuertemente ácido a moderado, esto puede atribuirse a la aplicación de fertilizantes químicos durante el ciclo de producción de la planta en vivero.

El porcentaje de materia orgánica (M.O.) detectado de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000, indica que es un suelo con contenidos medios en cuanto a la presencia de residuos orgánicos (1.9 %), sin embargo, el valor inicial se modificó, incrementándose a 2.3 % en el testigo absoluto para el portainjerto C-35. Para los

portainjertos Carrizo y *C. volkameriana* no hubo incremento, sin embargo, se mantuvo el porcentaje inicial de esta variable en la categoría media en todos los tratamientos aplicados. De acuerdo a Baraona y Sancho (2000) los porcentajes mínimos de M.O. requeridos por los cítricos van de 2 a 4 %, este valor es cercano al registrado en todos los tratamientos.

De acuerdo con la clasificación de Tavera (1985) el porcentaje de N obtenido al inicio del experimento es pobre (0.09 %). Esta característica se mantuvo durante los seis meses evaluados en el vivero, después de la inoculación, en todos los tratamientos aplicados en los tres portainjertos.

Conforme a los valores descritos por la NOM-021-SEMARNAT-2000 el contenido de P asimilable es alto desde el inicio del experimento (Cuadro 3), elevando la cantidad del mismo en las plantas tratadas con el manejo de vivero presentándose este comportamiento en los tres portainjertos utilizados.

El potasio (K) con base a lo mencionado por Etchevers *et al.* (1971) se presenta de manera inicial en un rango alto ( $0.6 \text{ meq } 100 \text{ g}^{-1}$  o  $\text{cmol } (+) \text{ kg}^{-1}$  de suelo). Este valor tiene poca variación en la mayoría de los tratamientos en todos los portainjertos disminuyendo a un valor medio ( $0.5 \text{ meq } 100 \text{ g}^{-1}$ ) en algunos tratamientos, con excepción del testigo absoluto que se incrementó en los portainjertos C-35 y Carrizo.

Para el Ca de acuerdo a Etchevers *et al.* (1971) la concentración al iniciar el experimento es media ( $5.7 \text{ meq } 100 \text{ g}^{-1}$  o  $\text{cmol } (+) \text{ kg}^{-1}$ ), pero tiende a incrementarse en todos los tratamientos en los tres portainjertos excepto el manejo de vivero que disminuye y se clasifica como bajo, al igual que el tratamiento de la combinación de cepas FCA-8+FCA-56 en *C. volkameriana*.

Mg se presenta de manera inicial con un valor de  $0.5 \text{ meq } 100 \text{ g}^{-1}$  o  $\text{cmol } (+) \text{ kg}^{-1}$  y de acuerdo a la NOM- 021- SEMARNAT-2000 indica que su presencia es baja. El valor inicial se incrementó a un valor medio en todos los tratamientos en los tres portainjertos, aunque su valor no es constante entre uno y otro.

Cuadro 3. Contenido de macro y microelementos en el suelo utilizado en el proceso productivo del vivero antes y después de concluir la investigación.

Tratamientos	pH	M.O	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Fe	Zn	Mn
	1:2	%		mg kg <sup>-1</sup>	meq 100 g <sup>-1</sup> ó cmol (+) kg <sup>-1</sup>					mg kg <sup>-1</sup>	
Valor inicial de suelo en Vivero	6.5	1.9	0.09	91	0.6	5.7	.5	1.3	70	10	4
<b>C-35</b>											
FCA-8 + 56	7.4	1.7	0.09	83	0.6	5.9	1.3	2.0	46	7	3
FCA-56	7.4	1.6	0.08	72	0.5	6.0	1.4	2.2	76	5	4
FCA-8	7.4	1.8	0.09	84	0.6	8.5	1.1	1.8	46	7	4
Manejo de Vivero	5.0	1.8	0.09	218	1.9	5.1	1.8	2.0	62	8	25
Testigo	7.4	2.3	0.12	79	0.6	7.2	1.3	1.9	47	7	4
<b>Carrizo</b>											
FCA 8 + 56	7.0	1.9	0.09	70	0.5	7.2	0.9	3.3	87	14	6
FCA-56	7.2	1.7	0.09	74	0.5	6.8	1.0	2.3	64	7	4
FCA-8	7.3	1.9	0.09	81	0.5	6.8	1.2	2.6	58	10	4
Manejo de Vivero	4.8	1.9	0.09	200	1.9	4.5	1.9	2.2	75	9	19
Testigo	7.2	1.8	0.09	75	0.6	6.2	1.3	2.2	67	6	4
<b>C. Volkameriana</b>											
FCA 8 + 56	7.3	1.6	0.08	--	0.6	4.7	1.1	2.3	47	4	4
FCA-56	7.5	1.6	0.08	60	0.5	7.3	1.5	3.2	46	5	3
FCA-8	7.5	1.7	0.09	62	0.6	5.7	1.3	3.3	48	7	3
Manejo de Vivero	5.3	1.9	0.09	215	0.6	4.1	2.0	2.5	48	8	15
Testigo	7.5	1.8	0.09	68	0.5	6.4	1.6	2.3	43	6	3

Para Cu el valor inicial reportado es de  $1.3 \text{ mg kg}^{-1}$  (Cuadro 3), de acuerdo a la clasificación de micronutrientes de Viets y Lindsay (1973), la presencia de este elemento en el suelo es marginal. Sin embargo, como en el caso del Mg el valor se incrementó en todos los tratamientos de los tres portainjertos, llegando a valores adecuados.

El Fe de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000 presenta valores adecuados para los tres portainjertos evaluados en todos los tratamientos (Cuadro 3), al igual que los valores para los iones Zn y Mn. De acuerdo a lo mencionado por Slaton *et al.* (2012) los niveles muy altos de micronutrientes no indican que las plantas en estos suelos sean afectados por toxicidad de algún micronutriente específico, como en este caso no se presentaron síntomas visibles de toxicidad.

## **6.2. Contenido nutrimental de hojas de los portainjertos de cítricos Carrizo, C-35 y *C. volkameriana***

El contenido nutrimental en las hojas de los patrones inoculados con rizobacterias fue notablemente favorecido, el Cuadro 4 muestra los contenidos de macro y micro elementos cuantificados en los tratamientos evaluados, el análisis se realiza en contraste con el tratamiento testigo absoluto.

En el portainjerto C-35 el tratamiento de manejo de vivero presentó el nivel más alto de N (4.21 %) siendo un 93.1 % superior para FCA-56. El contenido de P fue mayor en el tratamiento FCA-56 con un 36.36 % más. Para K se encontró el contenido más alto en el tratamiento donde se combinaron las dos cepas bacterianas con un 6.5 % mayor al testigo absoluto. El contenido de Ca fue mayor para las plantas inoculadas con FCA-56. Para Na el testigo absoluto obtuvo el contenido más alto de todos los tratamientos empleados, FCA-56 obtuvo el nivel más alto para el contenido de Mg (0.04%) siendo un 23.52 % superior al testigo absoluto. En cuanto a la determinación de microelementos el tratamiento FCA-56 presentó los contenidos más altos de Cu (111 %) y Mn (55 %) superando al testigo absoluto en 52.05 y 61.8 %, respectivamente. Para Zn el tratamiento con la combinación de bacterias fue favorable ya que se obtuvo el mismo porcentaje que el testigo absoluto con un 48 %. El contenido de Fe fue mayor en el testigo absoluto presentando un 138 % (Cuadro 4).

Para Carrizo el nivel de N se vio favorecido en el tratamiento de manejo de vivero con un 62.5 % más que el testigo absoluto (Cuadro 4), por otra parte, las plantas tratadas

con la cepa FCA-56 presentaron un 7.72 % más, respecto al testigo absoluto. El mayor contenido de P se presentó en FCA-56 con un 58.82 % más que el testigo. La concentración de K fue mayor en los tratamientos manejo de vivero y cepa FCA-8, los cuales presentaron un incremento de 39.3 % y 38.6 %, respectivamente respecto al testigo. Para Ca la combinación de rizobacterias FCA-56 y FCA-8 mostró un incremento de 62.74 % en comparación con el testigo absoluto. Para Na el mejor tratamiento fue FCA-8, ya que presentó un 150 % más que el testigo absoluto.

En cuanto a Mg el tratamiento que se favoreció en cuanto a este elemento fue el constituido por la cepa FCA-56, presentando un incremento de 15 % respecto al testigo absoluto. Las cepas FCA-56 + FCA-8 y FCA-56 fue el tratamiento que presentó el mayor contenido de Fe con un 54.36% más que el testigo. En el caso de Cu, este elemento fue disminuyendo, sin embargo, los tratamientos donde se observó menor reducción en relación al testigo fueron, manejo de vivero con un 11.9 % menos y FCA-56 con un 29.05 % menos. El Zn en las cepas FCA-56 y FCA-8 se presentó un 4.34 % más en comparación con el testigo absoluto. En cuanto a Mn, la cepa FCA-56 presentó un 61.76 % más que el testigo absoluto (Cuadro 4).

En el portainjerto *C. volkameriana* el elemento N, se incrementó en el tratamiento de manejo de vivero en un 92.69 % más en relación al testigo (Cuadro 4), además, el tratamiento de la cepa FCA-56 tuvo un incremento de 38.76 % respecto al testigo absoluto. Para P y K el tratamiento de la cepa FCA-56 aumento en 41.66 % y 36 %, respectivamente en relación al testigo absoluto.

Para Ca las cepas FCA-56 y FCA-8 presentaron los niveles más altos y similares con un 49.31 %. El contenido de Na (0.03 %) se mantuvo estable en los cinco tratamientos durante los seis meses. Mg tuvo un incremento de 35.29 % respecto al testigo absoluto, en los tratamientos de la cepa FCA-56 y manejo de vivero. El mayor contenido de Fe se presentó en el tratamiento de manejo de vivero con un 32.63 %, para el tratamiento de la cepa FCA-56 el incremento de este elemento fue de 7.36 % más que el testigo absoluto. Para los elementos Cu y Mn el mejor tratamiento fue la cepa FCA-8 con 34.19 % y 23.43 %, respectivamente más que el testigo absoluto. En Zn los tratamientos de las cepas FCA-56 y FCA-8 presentaron la menor pérdida de este elemento en comparación con el resto con un 2.22 % menos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Contenido nutrimental de las hojas de los portainjertos C-35, Carrizo y *C. volkameriana*.

Tratamientos	N	P	K	Ca	Na	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
<b>C-35</b>										
FCA-8+ 56	2.7	0.44	1.64	3.73	0.03	0.38	113	91	48	47
FCA-56	2.9	0.45	1.62	5.93	0.03	0.42	121	111	45	55
FCA-8	2.8	0.32	1.50	3.56	0.02	0.34	119	76	38	40
Manejo de Vivero	3.9	0.27	1.43	3.23	0.02	0.34	110	61	44	42
Testigo	2.0	0.33	1.54	3.00	0.04	0.34	138	73	48	34
<b>Carrizo</b>										
FCA-8 + 56	2.7	0.38	1.90	4.98	0.04	0.37	159	61	19	49
FCA-56	2.7	0.54	1.86	3.64	0.03	0.46	158	83	59	61
FCA-8	1.8	0.35	2.01	3.80	0.05	0.37	151	82	46	46
Manejo de Vivero	4.2	0.19	2.02	2.58	0.03	0.22	66	103	31	35
Testigo	2.5	0.34	1.45	3.06	0.02	0.40	103	117	46	53
<b><i>C. volkameriana</i></b>										
FCA-8 +56	2.1	0.23	1.96	2.76	0.03	0.43	96	79	36	49
FCA-56	2.4	0.34	2.04	3.27	0.02	0.46	102	132	44	65
FCA-8	2.4	0.24	1.63	3.27	0.02	0.45	97	208	44	79
Manejo de Vivero	3.4	0.23	2.00	2.59	0.02	0.46	126	68	39	46
Testigo	1.7	0.24	1.50	2.19	0.03	0.34	95	155	45	64

Estos resultados indican que el suelo utilizado es de calidad para el desarrollo de las plantas por su contenido nutrimental. Es importante indicar que de acuerdo a Rojas *et al.* (2001), se han reportado trabajos en donde se demostró que plantas inoculadas con BPCV son capaces de asimilar el nitrógeno fijado por estas, cualidad que en el caso de esta investigación pudo haber ocurrido con excepción del tratamiento de la cepa FCA-8 en el portainjerto Carrizo, los demás tratamientos presentaron valores más altos que el testigo absoluto; el testigo catalogado como manejo de vivero fue mayor en el contenido de nitrógeno debido a la aplicación de fertilizante químico. De igual manera Torrente (2010) menciona que se han estudiado varias especies de bacterias promotoras del crecimiento en el cultivo de caña de azúcar, para estudiar diferentes mecanismos de acción entre las que destaca la fijación de nitrógeno.

### **6.3. Crecimiento vegetativo de los portainjertos C-35, Carrizo y *C. volkameriana* promovido por la inoculación de *P. putida***

El contraste de medias para altura de planta en el portainjerto C-35, no presentó diferencias significativas al comparar los testigos con los tratamientos a base de bacterias, pero sí entre ellos ( $P = 0.0124$ ), siendo mejor el testigo con manejo de vivero (MV). En el diámetro de tallo se presentaron diferencias significativas del MV con el tratamiento de combinación de cepas FCA-8 + FCA-56 ( $P = 0.0480$ ) y con la cepa FCA-56 ( $P = 0.0089$ ). El testigo absoluto (TA) presentó diferencias para los mismos tratamientos, con una  $P = 0.0180$  y  $P = 0.0028$ , respectivamente; los tratamientos con bacterias presentaron el diámetro mayor en relación a los dos testigos (testigo absoluto y manejo de vivero). Para longitud de raíz no se presentaron diferencias significativas en ningún tratamiento al ser comparados con los dos testigos (testigo absoluto y manejo de vivero). El volumen de raíz fue mayor en todos los tratamientos a base de bacterias con relación a los dos testigos; al comparar el MV, los tratamientos de combinación de cepas FCA-8+FCA-56 y la cepa FCA-56 presentaron el mismo valor ( $P = 0.0139$ ), FCA-8 presentó una  $P = 0.0165$ . Para TA se presentó un valor de  $P = 0.0033$  para FCA-8+FCA-56,  $P = 0.0007$  en la cepa FCA-56 y una  $P = 0.0040$  en la cepa FCA-8. En peso seco de raíz no se presentaron diferencias significativas al ser comparados los tratamientos de bacterias con ambos testigos. Peso seco aéreo fue mayor en los tratamientos con bacterias al ser comparados con MV, con una  $P = 0.0001$ , similar en los tres portainjertos (Cuadro 5).

Para Carrizo el contraste de medias mostró que la altura de tallo fue mayor en MV con relación a todos los tratamientos a base de bacterias, FCA-56 +FCA-8 ( $P=0.0002$ ), cepas FCA-56 y FCA-8 ( $P=0.0001$ ) y el TA ( $P=0.0002$ ) (Cuadro 5). Para diámetro de tallo, longitud de raíz y peso seco aéreo el análisis no arrojó diferencias en ningún tratamiento. En volumen de raíz sólo la cepa FCA-8 presentó diferencias significativas, con un volumen menor al ser comparado con TA ( $P=0.0069$ ). El peso seco de raíz fue mayor en el MV con relación a los tratamientos de combinación de cepas FCA-56+FCA-8 ( $P=0.0020$ ), cepa FCA-56 ( $P=0.0054$ ) y cepa FCA-8 ( $P=0.0222$ ).

Para el TA los tratamientos mostraron un comportamiento similar, obteniendo una  $P=0.0154$ ,  $P=0.0100$  y  $P=0.0385$ , respectivamente (Cuadro 5).

En *C. volkameriana* el análisis indicó que en altura de planta el MV fue superior a todos los tratamientos bacterianos (Cuadro 5) obteniendo una  $P=0.0001$  para la combinación de cepas FCA-8+FCA-56 y cepa FCA-56; y una  $P=0.0111$  para la cepa FCA-8; de igual manera para el TA ( $P=0.0001$ ). El TA mostró menor altura que el FCA-8 ( $P=0.0433$ ). Para diámetro de tallo, el MV solo fue mayor para FCA-56 ( $P=0.0127$ ) y TA ( $P=0.0214$ ). Longitud de raíz, peso seco de raíz y peso seco aéreo no indicaron diferencias significativas entre tratamientos. El volumen de raíz fue menor en la combinación de cepas FCA-56 +FCA8 al ser comparados con los dos testigos, con una  $P=0.0033$  en MV y una  $P= 0.0427$  para TA.

La diferencia que muestra el tratamiento manejo de vivero en altura de tallo con relación a las demás variables parece estar relacionada con la fertilización química suministrada, que redundo además en un mayor contenido de nitrógeno en el tejido vegetal en este tratamiento. Estos resultados concuerdan con González (1992) en un estudio sobre fertilización química de patrones de cítricos donde reporta que aquellos tratados con dosis bajas de nitrógeno y fósforo, mostraron mayor desarrollo vegetativo durante su estudio y los contenidos foliares para nitrógeno aumentaron conforme se aumentaba la dosis de fertilizante. Pulido *et al.* (2002) al evaluar la interacción de rizobacterias en la producción de tomate reporta que los incrementos obtenidos en los valores de crecimiento, demostraron que los tratamientos donde se utilizaron bacterias promotoras del crecimiento vegetal tales como *Azospirillum* spp., *Burkholderia* spp. *Azotobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. superaron al testigo absoluto. De igual manera, Reyes *et al.* (2008) reportan incrementos significativos en

variables como altura, número de hojas, longitud de raíz y peso seco radical en cultivo de pimentón morrón inoculado con rizobacterias.

Cuadro 5. Promedio de las variables de crecimiento de C-35, Carrizo y *C. volkameriana* con la inoculación de *P. putida*.

TRATAMIENTOS	Altura de planta (cm)	Diámetro de tallo (cm)	Longitud de raíz (cm)	Volumen de raíz (cm)	Peso seco de raíz (g)	Peso seco aéreo (g)
<b>C-35</b>						
FCA-56 + FCA-8	84.92	0.628	41.30	23.40	6.52	11.14
FCA-56	83.94	0.648	42.90	25.00	6.68	10.04
FCA-8	86.88	0.622	47.00	23.20	6.16	11.16
Manejo vivero	91.76	0.570	37.30	15.80	3.94	11.80
Testigo absoluto	79.70	0.558	37.80	14.20	4.16	8.56
Error estándar	3.995	0.021	3.938	2.105	0.664	1.424
<b>Carrizo</b>						
FCA-56 + FCA-8	80.30	0.596	43.80	18.60	5.00	9.28
FCA-56	79.18	0.586	37.24	18.80	5.02	8.78
FCA-8	73.03	0.564	40.90	15.40	3.72	11.44
Manejo vivero	98.88	0.554	38.30	21.00	5.30	10.76
Testigo absoluto	79.18	0.562	33.60	23.80	5.38	10.02
Error estándar	3.995	0.021	3.938	2.105	0.664	1.424
<b><i>C. volkameriana</i></b>						
FCA-56 + FCA-8	67.61	0.574	32.30	25.40	7.86	14.44
FCA-56	64.25	0.584	30.70	29.40	8.42	15.66
FCA-8	76.85	0.638	34.90	30.60	8.54	14.50
Manejo vivero	89.10	0.658	31.00	34.60	8.32	29.20
Testigo absoluto	67.21	0.590	32.40	31.60	9.00	13.80
Error estándar	3.995	0.021	3.938	2.105	0.664	1.424

En otro estudio en el cual se utilizaron cepas de *Herbaspirillum* spp., Punschke y Mayans (2011) mencionan que observaron diferencias significativas en las variables de producción de materia seca de la parte aérea (follaje), así como en la biomasa seca radicular en plantas de arroz en comparación con el testigo, bajo condiciones controladas. En cuanto a diámetro de tallo, Soroa *et al.* (2009) mencionan que al evaluar la influencia que ejercen las bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre plantas de Gerbera, observaron los valores más altos de este indicador al aplicar cepas de *Azospirillum brasilense* y *G. hoi-like*. Chiquito (2011) menciona que, en un estudio en limón Persa se presentaron diferencias significativas en variables de biomasa seca al ser inoculado con *Pseudomonas putida*.

Los resultados muestran que con excepción de la altura de planta, donde el manejo de vivero fue superior, las variables no mostraron una tendencia marcada entre tratamientos; esto indica que las condiciones de manejo general, incluyendo el suelo usado y las rizobacterias tuvieron un efecto similar con el tratamiento de manejo de vivero, que llevó una fertilización completa.

#### **6.4. Cuantificación de unidades formadoras de colonias bacterianas**

El análisis de varianza de parcelas divididas del número de poblaciones presentes después de la inoculación con rizobacterias, mostró diferencias significativas para tratamientos ( $P=0.0001$ ) en la interacción patrón\*tratamiento. Los tratamientos de las cepas FCA-56 y FCA-8 mostraron mayor población con 229.33 y 230.47 x 10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> de raíz respectivamente, siendo diferentes estadísticamente a los testigos (Figura 4).

En el análisis de varianza para cada portainjerto en C-35 se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 5) ( $P=0.0125$ ). La prueba de medias de Tukey mostró que la cepa FCA-8 presentó el mayor número de colonias con 207.60 x 10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> de raíz seguido de la cepa FCA-56 con 179.20 x 10<sup>5</sup> UFC g<sup>-1</sup> de raíz.

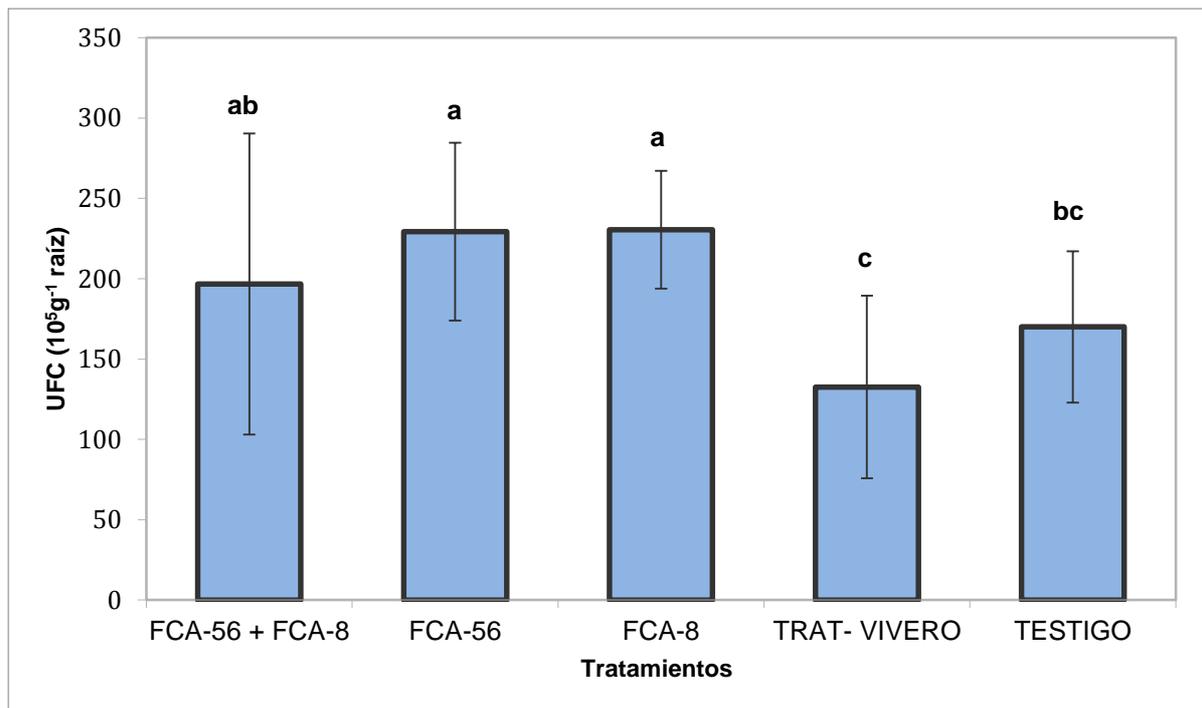


Figura 4. Poblaciones de *Pseudomonas putida* en la rizósfera de portainjertos de cítricos con base a los tratamientos utilizados (Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey  $p \leq 0.05$ )).

Para Carrizo la diferencia significativa entre tratamientos fue de  $P=0.0008$ , la prueba de medias de Tukey entre tratamientos mostró un mayor número de colonias para la cepa FCA-56, cepa FCA-8 y testigo absoluto (Figura 5). Es notoria la cantidad de colonias presentes en el tratamiento de testigo absoluto, ya que se presenta una cantidad relativamente alta ( $216.80 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup> de raíz) y similar a los tratamientos que se inocularon. Esto pudiera atribuirse a la contaminación entre plantas debido al escurrimiento de agua al realizar los riegos, ya que no hubo una distancia relativamente considerable entre plantas.

El portainjerto *C. volkameriana* presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $P= 0.084$ ), la combinación de bacterias (FCA-56+FCA-8) fue diferente al testigo absoluto y representó para este portainjerto el mayor número de colonias con  $298.0 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup> de raíz, seguido del tratamiento FCA-56 con  $255.80 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup> de raíz (Figura 5).

Con base a los dos análisis podemos observar que se presentaron bacterias en todos los tratamientos, pero el mayor número de colonias encontradas en la rizósfera de los

portainjertos evaluados se presentaron en los tratamientos donde se aplicaron bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Esto nos indica que las condiciones presentes fueron favorables para el incremento de las BPCV, así como la capacidad simbiótica con la raíz de los portainjertos de cítricos. Por lo contrario, Barea y Azcón (1982) mencionan que la disminución de la población de las bacterias inoculadas está relacionada con el cambio de medio de crecimiento, además de que las bacterias en general presentan dificultades para adaptarse y desplazarse a lo largo de la raíz. En contraste, García *et al.* (1995) mencionan que la disminución de las bacterias se da al momento de la inoculación, sin embargo, después de establecerse la asociación, la población microbiana puede aumentar, que es lo que sucedió en nuestro caso.

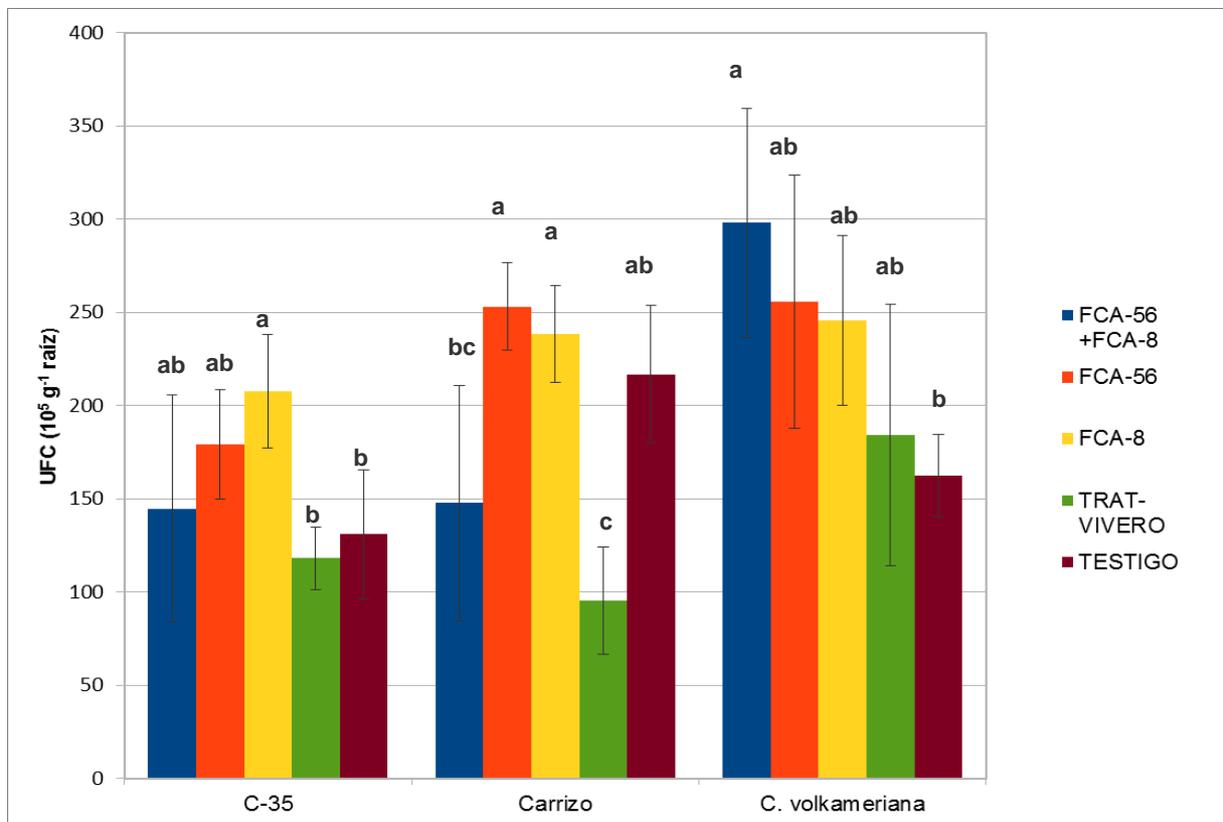


Figura 5. Cuantificación de unidades formadoras de colonias rizosféricas encontradas por portainjerto de cítricos (Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey  $p \leq 0.05$ )).

## 6.5. Amplificación del gen ADN ribosomal de las cepas *P. putida*

En la Figura 6 se observa que las cepas aisladas de C-35 corresponden a *Pseudomonas putida*, con base a la amplificación del gen 16S ADNr. El fragmento obtenido fue de aproximadamente 700 a 800 pb, que es similar al observado con el de la bacteria en medio de cultivo. Esto mismo se encontró en los demás portainjertos (Figuras 7 y 8). Hernández *et al.* (2010) también reaislaron las bacterias de *P. putida* inoculadas al momento del trasplante en sus ensayos, lo que indica una colonización exitosa por las cepas bacterianas.

Aunque la colonización fue efectiva la concentración de cada tratamiento varió. En C-35 y *C. volkameriana*, el testigo negativo presentó en todas las repeticiones a *P. putida* favoreciendo el supuesto de contaminación. Para Carrizo, tres repeticiones del testigo negativo contenían la bacteria inoculada (Figura 7). La presencia de *P. putida* en todos los tratamientos, además de contaminación, también puede indicar que el suelo usado contiene de manera natural esta especie. Tal vez esta sea la razón de que esta bacteria fue aislada por primera vez en cítricos; además, esta asociación tiene un efecto positivo en el incremento de las colonias en la rizósfera y en el desarrollo de la planta.

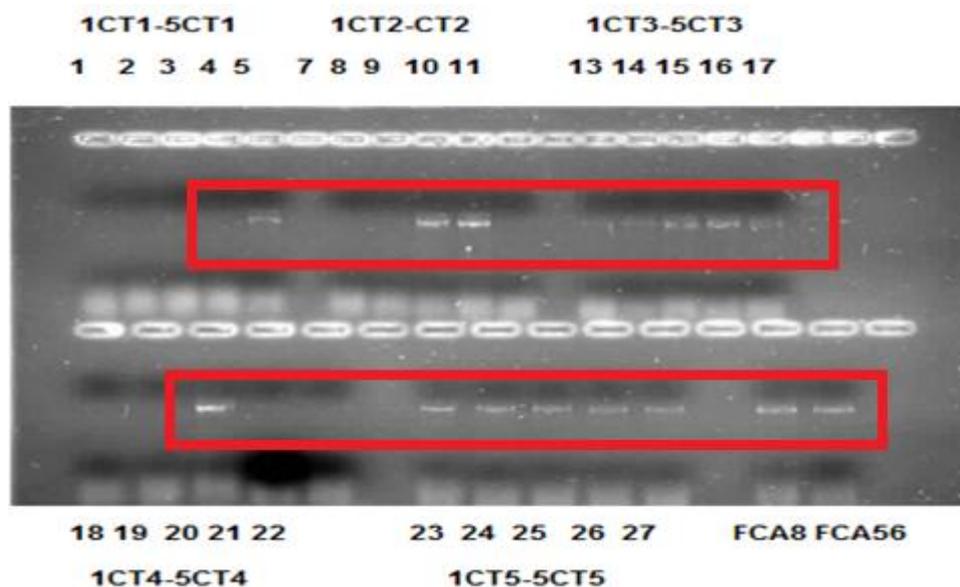


Figura 6. Identificación molecular de *P. putida* en los tratamientos (T1-T5) del portainjerto C-35 por PCR. FCA-8 y FCA-56 amplificado de medio de cultivo.

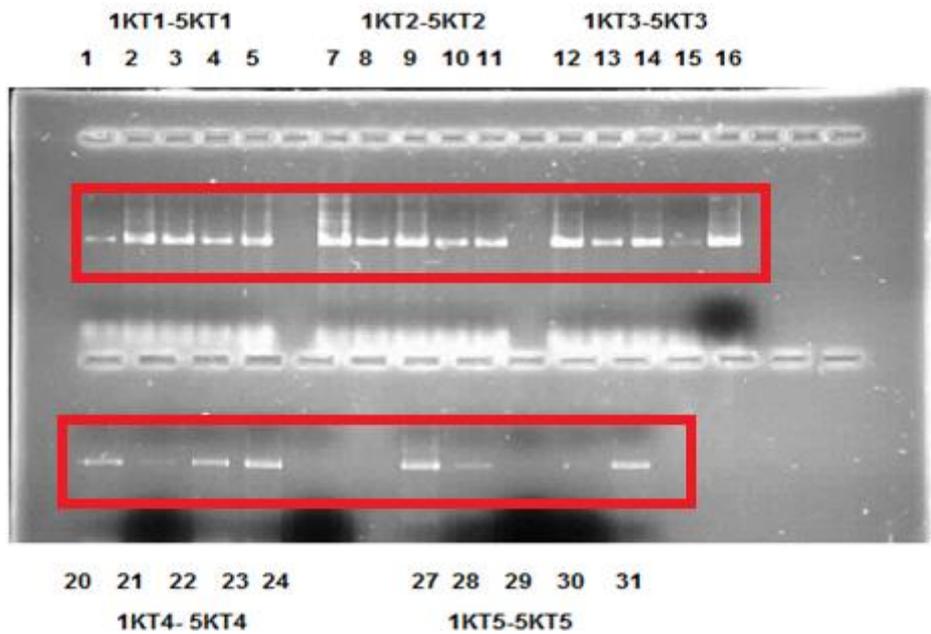


Figura 7. Identificación molecular de *P. putida* en los tratamientos (T1-T5) del portainjerto Carrizo por PCR.

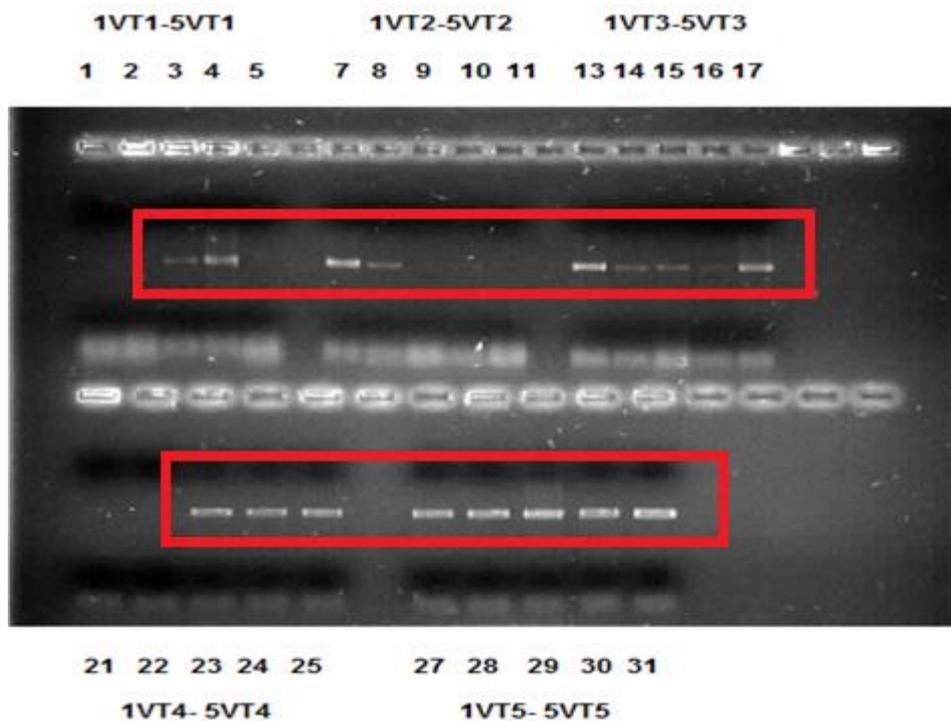


Figura 8. Identificación molecular de *P. putida* en los tratamientos (T1-T5) de *C. volkameriana* por PCR.

## 6.6. Evaluación antagónica de las cepas rizobacterianas de *P. putida* frente a *P. parasítica*

Al evaluar el antagonismo *in vivo* de las rizobacterias ante la cepa CPT-12 no se presentó ningún daño por *P. parasítica*, ya que ninguna de las plantas inoculadas con este patógeno presentó síntomas. Sólo se observó la cicatrización por el daño mecánico realizado sobre el tallo a los quince días después de haber efectuado la inoculación (Figura 9). Esto se puede atribuir a dos aspectos, que la virulencia de la cepa de *P. parasítica* haya disminuido o bien, a los procesos fisiológicos y bioquímicos de la planta en los cuales se presenta la biosíntesis de metabolitos secundarios que son los implicados en los procesos infecciosos (García y Pérez, 2003), indicando una mayor tolerancia de éstos patrones a la gomosis a diferencia de lo reportado por Curtis *et al.* (2000). Dentro de los mecanismos de defensa se encuentra la producción fitoalexinas los cuales son sintetizados por las plantas ante la presencia de una invasión microbiana (Müller y Börger, 1941 citado por Vivanco *et al.*, 2005). Esto último se considera viable porque se aisló *P. putida* de todos los tratamientos.

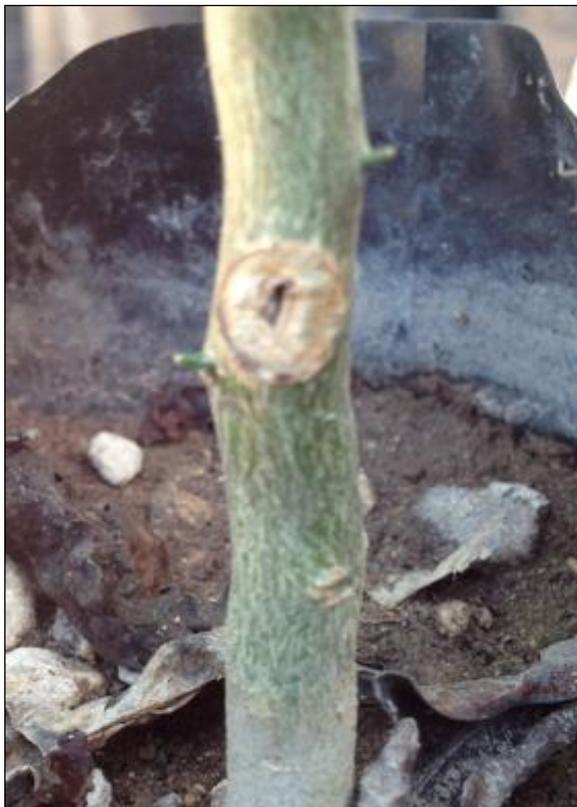


Figura 9. Cicatrización del tallo de portainjertos a los 15 días después de la inoculación con *P. parasítica*.

### 6.7. Valoración del crecimiento de *P. putida* en un medio de cultivo alternativo

El análisis de varianza no presentó diferencias significativas en la concentración de bacterias en medios sólidos, tanto para agar nutritivo ( $P= 0.9727$ ) como para el medio de cultivo B-King ( $P=0.3043$ ), por lo que ambos medios se pueden utilizar para la multiplicación de la bacteria (Figura 10).

En relación a los medios líquidos, en el análisis de varianza se encontraron diferencias significativas en los dos medios utilizados, caldo nutritivo ( $P= 0.0004$ ) y B-King ( $P= 0.0001$ ). En caldo nutritivo se presentaron diferencias de medias entre las primeras 24 horas de incubación. Para el medio B-King hubo diferencias significativas en las dos ultimas etapas de incubación (Figura 11).

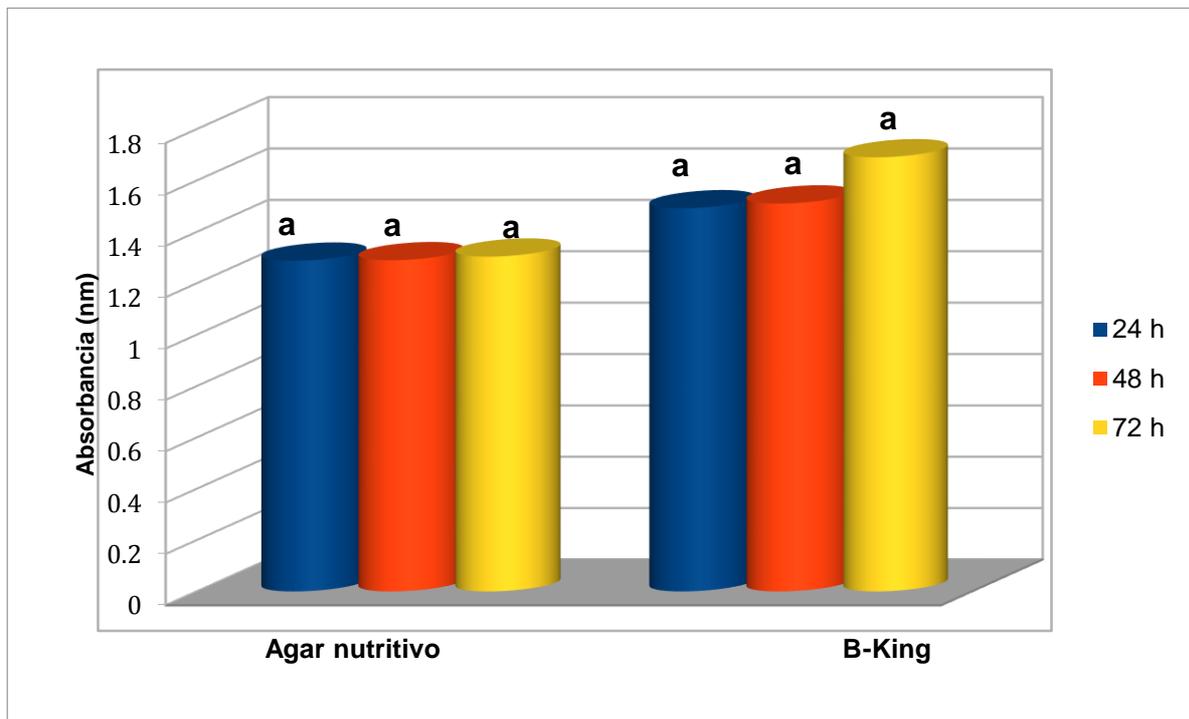


Figura 10. Concentración de bacterias inoculadas en medio AN y B-king sólido incubadas a 24, 48 y 72 horas.

Granados y Villaverde (1997) mencionan que las bacterias del género *Pseudomonas* se desarrollan favorablemente en B-king ya que este medio incrementa la producción de la pioverdina o fluorescencia, cualidad característica de *P. fluorescens* y *P. putida*.

Sin embargo como se puede observar en los resultados no se descarta el medio de cultivo elaborado a base de caldo nutritivo, ya que puede ser un medio alternativo para el desarrollo de *P. putida* siendo incluso igual al B-King, sobre todo en su condición como medio líquido.

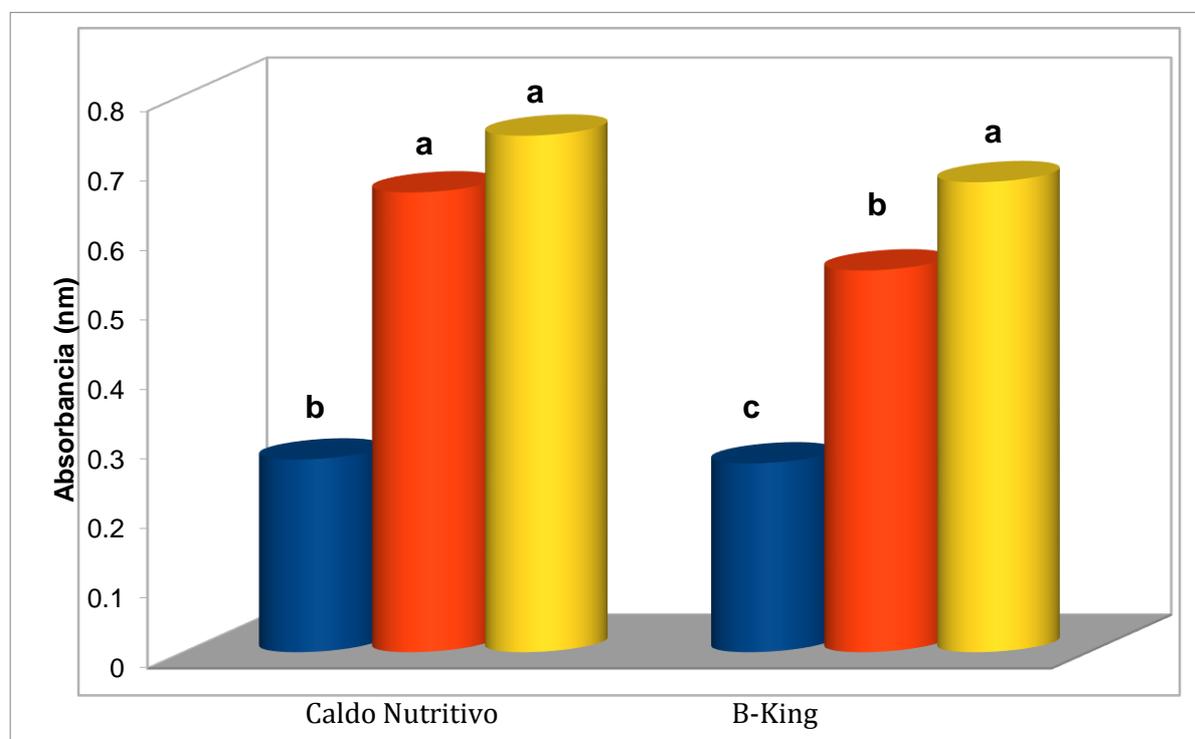


Figura 11. Concentración de bacterias inoculadas en medio CN y B-king líquido incubadas a 24, 48 y 72 horas.

### 6.8. Evaluación de formulados químicos para la conservación de cepas rizobacterianas de *P. putida*

De acuerdo a los resultados obtenidos, los formulados incubados a una temperatura de 4 °C (Figura 12) y 28 °C (Figura 13) presentaron diferencias significativas ( $P=0.0001$ ). La prueba de medias de Tukey indica que los formulados elaborados con sorbitol, glicerol y sorbitol+glicerol al 10 %, presentan las concentraciones más altas de bacterias a los 7 y 15 días en ambas temperaturas. La leche no resultó ser un buen medio de conservación. Esto es un indicativo de que tanto sorbitol como glicerol, solos o combinados son efectivos para la conservación de las bacterias. Esto ha sido observado también por Henao *et al.* (2006) que reportan un resultado favorable al utilizar glicerol al 10 % para la criopreservación de *Aspergillus niger*. Freeire y Sato (1999) reportan que la aplicación de glicerol al 20 y 40 % ha funcionado en el

almacenamiento para rizobios con excelentes resultados, ya que pueden mantener la viabilidad de estos organismos conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por más de un año.

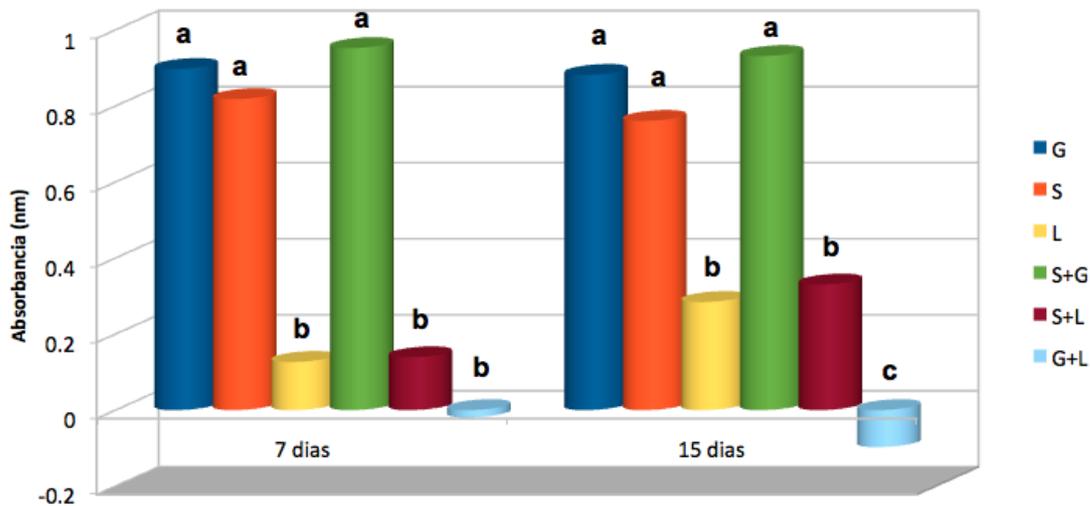


Figura 12. Concentración a los 7 y 15 días para formulados incubados a  $4^{\circ}\text{C}$ . G= Glicerol, S= Sorbitol, L= Leche, S+G= Sorbitol + Glicerol, S+L= Sorbitol + Leche y G+L= Glicerol + Leche. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

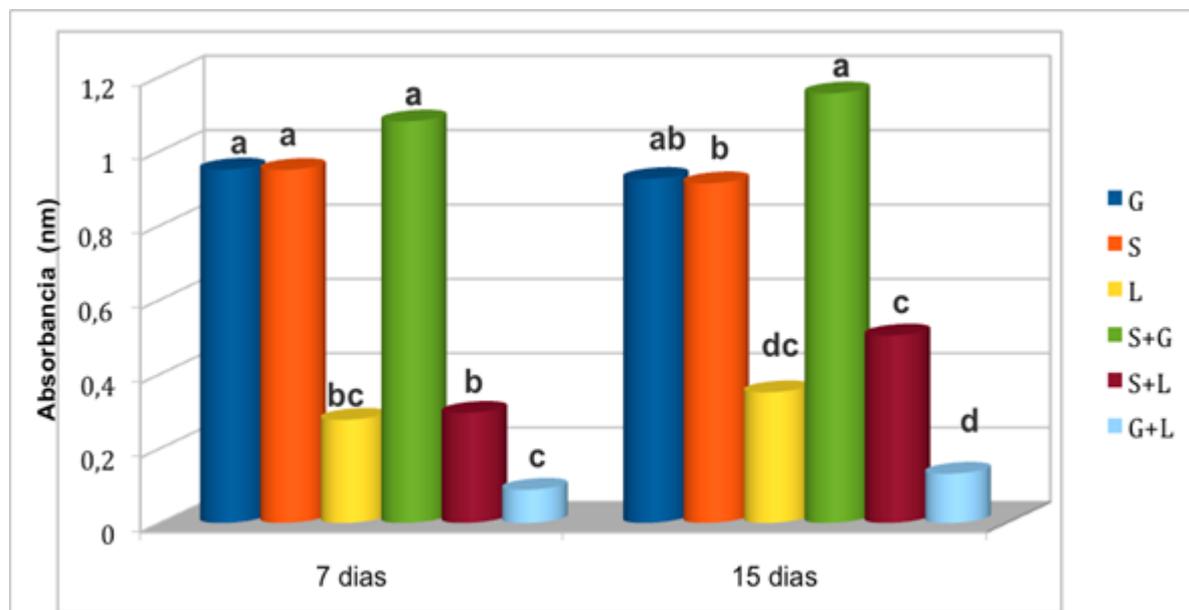


Figura 13. Concentración a los 7 y 15 días para formulados incubados a  $28^{\circ}\text{C}$ . G= Glicerol, S= Sorbitol, L= Leche, S+G= Sorbitol + Glicerol, S+L= Sorbitol + Leche y G+L= Glicerol + Leche. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

## 6.9. Análisis de costos entre la fertilización biológica y química

Con base a los datos obtenidos por el técnico encargado de un vivero certificado, el gasto total para la fertilización química es de \$60,249.90 aproximadamente, usando la fórmula 12-11-18. La cantidad de plantas que se manejan en el vivero por ciclo de producción es de 250,000 aplicando durante los 12 meses de estancia en éste un total de 4 fertilizaciones, de acuerdo a la edad de las mismas. La primera fertilización inicia a los 15 días después del trasplante (3 g/planta), posteriormente se aplica a los 45 días (5 g/planta), a los 90 días (10 g/planta) y a los 120 días (15 g/planta). Lo que da un total de 33 g por planta en todo el ciclo productivo.

En cuanto a los costos para inocular *P. putida* por inmersión, con un litro de medio de cultivo B-K se puede fertilizar un aproximado de 500 plantas, al utilizar aproximadamente 2 mL por planta, con una concentración bacteriana de  $10^9$  células mL<sup>-1</sup> y el costo de éste es de \$66.19 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Relación de costos aproximados para elaborar 1 L de medio de cultivo para *P. putida*.

Reactivo químico	Cantidad	Precio
Glicerol	10 mL	\$ 2.22
Peptona de carne	15 g	\$ 11.7
MgSO <sub>4</sub>	1 g	\$ 1.23
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g	\$ 1.22
Agar agar	10 g	\$ 29.82
Agua destilada	Aforar a 1 L	\$ 20. 00
TOTAL		\$66.19*

\*En el precio del litro de medio de cultivo no se considera infraestructura, mano de obra especializada ni equipo de laboratorio, se estima que puede incrementarse hasta un 40 % del precio total.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la utilización de rizobacterias en la producción de plantas de cítricos, favorece el crecimiento y el contenido nutrimental. Además de proveer información para producir formulados que promueven la conservación de organismos benéficos por tiempos prolongados y fáciles de utilizar, con el fin de sustituir la fertilización química.

En relación al costo total de la aplicación de un fertilizante químico y uno biológico se puede observar que a lo largo del ciclo de producción (12 meses), se pueden reducir los costos de éstos hasta en un 45 %, al aplicar un fertilizante a base de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, teniendo en cuenta que durante el ciclo sólo se realiza una inoculación, la cual se aplica antes de llevar a cabo el trasplante (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación del gasto entre un fertilizante químico y uno biológico por un ciclo de 12 meses.

Tipo de fertilizante	Costo de aplicación por planta	Costo por aplicación para 250,000 plantas en un ciclo
Químico (12-11-18)	\$ 0.2409	\$ 60,246.90
Biológico ( <i>P. putida</i> )	\$ 0.1853	\$ 46,333.00

#### **6.10. Interpretación de la encuesta realizada a viveristas certificados en la zona de Martínez de la Torre, Ver.**

Para conocer la disponibilidad de los viveristas certificados, productores de plantas de cítricos en la región de Martínez de la torre, en la adopción de biofertilizantes se les aplicó un cuestionario. Con este instrumento se pudo constatar el conocimiento que tienen respecto a los fertilizantes empleados en el manejo del vivero, así como también las principales enfermedades que aquejan su sistema de producción y el tipo de control que utilizan. A continuación se mencionan los datos obtenidos de acuerdo a las respuestas de los encuestados:

En relación a la fertilización, el 80 % de los viveristas realiza esta actividad durante el trasplante, esto para promover mayor cantidad de raíces y solamente el 20 % lo realiza desde semillero; posteriormente el 100 % continúa aplicando fertilizante para el crecimiento y desarrollo del portainjerto.

En cuanto a dosis de fertilizantes químicos aplicados a los portainjertos en el 80 % de los casos varía para cada viverista, empleando desde 10 hasta 100 g por planta durante un ciclo. Esto es desde el trasplante hasta que este haya obtenido su completo desarrollo cualidad requerida para realizar el injertado. El 20 % indicó que la fertilización la aplicaba de acuerdo con la edad del portainjerto, esto es, 3 g a los dos meses, 5 g a los 4 meses, 10 g a los seis meses y 15 g a los 8 meses.

El inventario sobre la cantidad de portainjertos que se manejan en los diferentes viveros es variable, un 20 % maneja un total de 250,000 plantas, otro 20 % menciona manejar 145,000 de los cuales 100,000 son *C. volkameriana*, 30,000 Carrizo y 15,000 Troyer. Otro 20 % llega a manejar 50,000 unidades y el restante 40 % cerca de 30,000 unidades de portainjertos en existencia.

El 40 % reporta gastos que van desde los \$60,000 hasta los \$ 91,000 por concepto de compra de fertilizante químico y el 60 % no supo dar este dato. En cuanto al volumen de fertilizante utilizado, varía dependiendo del número de portainjertos que se maneja en el vivero, de esta manera tenemos, que el 20 % emplea volúmenes de 350 kilogramos de fertilizante para darle mantenimiento a 145 mil portainjertos, 20 % utiliza 8,253 kilogramos para mantener a 250,000 portainjertos y el 60 % restante no facilitó información acerca de este tema.

En tanto en el tema de conocimiento y empleo de fertilizantes biológicos, el 80 % opina conocer sobre esta técnica y sólo el 20 % lo desconoce. Del 80 % de los viveristas que dicen conocer los fertilizantes biológicos, el 40 % señala los hongos micorrizogenos y el 40 % restante los productos derivados de lombricomposta. Este 80 % menciona conocer los efectos que pueden reflejarse con el uso de estos insumos, como es, la reducción del crecimiento y desarrollo de portainjertos. Sin embargo, el 100 % menciona no conocer productos elaborados a base de bacterias benéficas. Este es un campo importante de capacitación y difusión de estos microorganismos benéficos.

El 40 % señala haber empleado algún tipo de biofertilizante, sin embargo, no han quedado satisfechos debido a que no han observado diferencia alguna al compararlos con aquellos que fueron tratados con fertilizantes químicos, el 60 % restante no ha hecho uso de estos productos. Aquí es necesario hacer un análisis de costo/beneficio a largo plazo, esto es, no sólo el costo inicial entre fertilización química y

biofertilización, sino también su efecto como organismos protectores de plantas (Hernández, 2008) incluyendo los beneficios ambientales.

El 100 % de los viveristas indican que están de acuerdo en evaluar experimentalmente el uso de productos elaborados a partir de bacterias benéficas, ya que desconocen las propiedades que pueden brindarle a los portainjertos. El 80 % señala que el costo es una limitante del uso y solamente el 20 % menciona que no lo es.

Al plantear la comparación de los costos del biofertilizante junto con los productos químicos, dado el supuesto que en el primero de los casos el precio aumentará \$0.50 más, pero pudiera disminuir la incidencia de problemas fitosanitarios, el 100 % de los entrevistados indican su intención de adoptar esta estrategia de manejo para disminuir el uso de productos químicos. Sin embargo el 60 % alude no necesitar capacitación, que lo único que requieren es una guía técnica para el empleo de estos productos.

En relación a la presencia de las enfermedades dentro del vivero, el 80 % reporta al Damping Off como la principal enfermedad y el 20 % no reporta incidencia, debido a que realizan manejo preventivo dentro del vivero. Dentro de la estimación de daños producidos por esta enfermedad, el 80 % señala daños del 1 % de pérdida y el 20 % de los encuestados reporta una pérdida del 30 %. Para el manejo de las enfermedades el 40 % menciona el uso de la desinfección de sustratos, la utilización de semilla certificada y la aplicación de productos químicos, solamente el 60 % aplica medidas preventivas sin especificar cuáles. En cuanto al tipo de fungicidas utilizados, el 60 % emplea sistémicos y el 40 % fungicidas de contacto.

Es claro que los viveristas tienen un amplio conocimiento para la producción intensiva de plantas, pero no consideran aspectos de protección medio ambiental, ya que usan fertilización química ampliamente, así como plaguicidas para el manejo de enfermedades y plagas en vivero. Esto abre la posibilidad de uso de organismos benéficos que reducirían la fertilización y el uso de plaguicidas, por la protección que confieren. Es necesario tomar en cuenta que las respuestas obtenidas no garantizan una confiabilidad plena relacionada con estos temas, ya que al ser empresas privadas son muy aprensivos para dar esta información; por lo que se reserva mucho el proceso de producción que emplean en su vivero.

## VII. CONCLUSIONES

Se demostró que la inoculación con rizobacterias estimula el crecimiento de los portainjertos C-35, *C. volkameriana* y Carrizo. Variables como, peso seco aéreo y volumen de raíz, mostraron mejores resultados en aquellas plantas inoculadas con la cepa *P. putida*. La aplicación de *P. putida* afecto de manera positiva el contenido nutrimental foliar de los portainjertos de cítricos, en aquellas plantas inoculadas con la cepa FCA-56 y la combinación de cepas FCA-8+FCA-56. Sin embargo con base al análisis foliar el tratamiento de manejo de vivero presentó mayor porcentaje de nitrógeno en los 3 portainjertos evaluados debido a la fertilización.

El método de extracción de ADN aplicado permitió obtener la cantidad adecuada de ADN para la identificación de colonias bacterianas obtenidas de los portainjertos a los 6 meses de inoculación. Al realizar la amplificación del gen 16s reveló un fragmento de 800 pb de todos los tratamientos seleccionados al azar, que indican la presencia de *P. putida*.

La capacidad antagónica de *P. putida* ante *P. parasitica* no se fue posible determinarla porque no se presentó daño alguno por el hogo en ningún tratamiento, al parecer la cepa aplicada había perdido su capacidad patogénica o bien los patrones son más tolerantes de lo considerado inicialmente, probablemente incrementado por la presencia de las rizobacterias. Por lo que es necesario probar la inoculación en otros portainjertos reportados como susceptibles.

La conservación de rizobacterias se obtuvo conn formulados a base de sorbitol, glicerol y su combinación (sorbitol + glicerol), ya que en este medio se mantiene la viabilidad y la concentración adecuada por un período de hasta 15 días a 4 y 28 °C. El crecimiento de *P. putida* en un medio sólido alternativo a B-king como es el agar nutritivo, indica la factibilidad de uso de un medio alternativo y más económico.

De acuerdo a los datos obtenidos en la encuesta aplicada se observó que la mayoría de los viveristas sólo utilizan fertilizantes químicos y en dosis diversas, para poder aportar a la planta los requerimientos nutricionales necesarios, estos pueden ser líquidos, granulados o foliares. Sin embargo, 100 % menciona que les gustaría adoptar una estrategia de manejo a base de productos biológicos, como es la aplicación de

productos elaborados a base de hongos y bacterias promotores del crecimiento para poder reducir el uso de productos sintéticos. Es importante dar a conocer a los productores cuales son las propiedades que estos productos pueden brindar, ya que muchos mencionan carecer de esta información.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Acuña O., W. Peña., E. Serrano, L. Pocasangre, F. Rosales, E. Delgado, J. Trejos, y A. Segura. 2006. La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de suelos. In: XVII Reunião Internacional da Associação para a Cooperação nas Pesquisas sobre Banana no caribe e na América Tropical. Santa Catarina, Brasil. pp. 222- 233.
- Agueda S. s/a. Gomosis de los cítricos. Bases conceptuales para el Manejo Ecológico de Plagas y Enfermedades. 5: 227- 229.
- Aguirre M., J. Irizar G. M., O. A. Grajeda, M. Peña del Río, C. Loredó O. y A. Gutiérrez B. 2009. Los Biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 5: 80.
- Agronet. 2005. Tecnología de producción de naranja y toronja. <http://www.agronet.com.mx/cgi/articles.cgi?Action=Viewhistory&Article=0&Type=A&Datemin=2005-12-01%2000:00:00&Datemax=2005-12-31%2023:59:59> (01/09/2011).
- Agustí, M. 2000. Citricultura. Edit. Mundi-Prensa. España. 264 p.
- Arencibia A., D. F. y L. A. Rosario F. 2003. Métodos de conservación de cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas en el ensayo de Ames. Revista de Toxicología en línea. [http://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/19002.pdf](http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19002.pdf) Sertox. pp. 19-39. Consultado el 25 de febrero de 2014.
- Amorós, M. 2003. Producción de Agrios. Edit. Mundi-Prensa. España. 242 p.
- Anaya, L., A., F. Espinosa G., y R. Cruz, O. 2001. Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación. Editorial Plaza y Valdés. México. pp. 100-101.
- Bais H., P., S. Park W., T. Weir L., R. Callaway M. y J. Vivanco M. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. Trends in Plant Science. 9:26-32.
- Baldani J., L. Caruso, V. L. D. Baldani, S. R. Goi y J. Döbereiner. 1997. Recent Advances in BNF with Non-legume Plants. Soil Biology & Biochemistry 29: 911-922.
- Barahona, C., M. y E. Sancho. 2000. Fruticultura I. Edit. EUNED. E.U.A. 146 p.
- Barea J., M. y A. Azcón A. 1982. La rizosfera: interacciones microbio-planta. Anales de edafología y agrobiología 7/8: 1517-1532.
- Barraquío W., L., L. Revilla y J. Ladha K. 1997. Isolation of Endophytic Diazotrophic Bacteria from Wetland Rice. Plant and Soil. 194:15-24.
- Bashan Y. y G. Holguin 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biology & Biochemistry 30: 1225-1228.

- Bates M. 1972. The human environment. University Of California. E.U.A. 22 p.
- Boa E., y J. Bentley 2011. Guía práctica de plagas y enfermedades de árboles agrícolas en Bolivia. <http://www.jefferybentley.com/Plagas%20y%20enfermedades%20de%20arboles%20agriolas%20en%20Bolivia.pdf> (Consultado: 19/12/ 2011).
- Bonsall R., F., D. Weller M. y L. Tomashow S. 1997. Quantification de 2,4-diacetylphloroglucinol by fluorescent *Pseudomonads* spp. *in Vitro* and the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 951-955.
- Caballero M. J. 2006. Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 4:154-161.
- Castle W., S. 1987. Citrus rootstocks. *In: Rootstock for fruit crops*. Roma, R.C. and Carlson (eds.). John Wilwy and Sans, New York. pp. 361-399.
- Cítricas. 2011. Limón Volkameriano. <http://citricas.com/?p=295> (Consultado: 20/08/2011).
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.1998. Frutos de la Investigación Corpoica Cinco Años. Compendio de Productos y Procesos de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Colombia. 144 p.
- Curtis D., S. 2007. Tolerancia de 27 portainjertos para cítricos a *Phytophthora* en condiciones de vivero y laboratorio. 1ª. Semana Internacional de citricultura. Veracruz, México. Instituto Nacional de Investigaciones, Agrícolas y Pecuarias. <http://www.concitver.com/semana%20de%20la%20citricultura/ponencias/1.%20LUNES26NOVPDF'S/4.%20Sergio%20Curti%20Diaz/1000%20PLATICA%20PATRONES%20SEMANA%20CITRICULTURA.pdf>. (Consultado: 14/12/2011).
- Curtis D. S., X. Loredó S., U. Díaz Z., J. Sandoval, R. y J. Hernández, H. 2000. Tecnología para producir Limón Persa. Libro Técnico No.8. INIFAP-CIRGOC SAGARPA. Campo Experimental Ixtacuaco. Veracruz, México 144 p.
- Chiquito-Contreras R., G. 2011. Rizobacterias y hongos micorrizogenos arbusculares como alternativa biotecnológica para mejorar el vigor y sanidad de portainjertos de cítricos. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Campus Veracruz, México. 117 p.
- Division of Agriculture and Natural Resources (DANR). 1991. Integrated Pest Management for Citrus. University of California. 2da Edition. 3303: 114- 115.
- Davis T., D. y A. Curry E. 1991. Chemical regulation of vegetative grown. *Critical Plant Sci.* 10:151-188.
- Díaz V., P., R. Ferrera C., J. J. Almaraz S., G. Alcántar G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en lechuga de tierra. *Terra Latinoamericana* 19 327- 335.
- Díaz C., C. 2010. Naranja dulce, Limón partido. *Claridades Agropecuarias*. Universidad Autónoma de México 187: 32-39.

- Diehl H., C. Goetz A., C. Hach. 1950. The versenate titration for total hardness. American Water Works Association Journal 42: 40-48.
- Durán, V., N. y P. Moreno. 2000. Enfermedades de los Cítricos. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología. Mundi-Prensa. España. 2:30-31.
- Elbeltagy A., K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, T. Hamada, T. Isawa, H. Mitsui, K. Minamisawa. 2001. Endophytic colonization and in plant nitrógeno fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. Applied and Environmental Microbiology 67: 5285-5293.
- Equipo Técnico de Acción Contra el Hambre (ETACH). 2008. Orientaciones Técnicas para el Cultivo de Cítricos en el Departamento de CAAZAPÁ. Acción Contra el Hambre. Paraguay. 28 p.
- Etchevers B., J. D., W. Espinoza G. y E. Riquelme. 1971. Manual de fertilidad y fertilizantes, 2da Ed. Corregida. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Chillán, Chile. 62 p.
- Fernández O. y L. Vega. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Manejo de plagas. Costa Rica 62:96-100.
- Freire J., R. y M. Sato L. 1999. Conservación de Cultivos de Rizobios. Latinoamericana de Biología. 41: 34-41.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2012. Citrus Fruit. Fresh and Processed. Annual Statistics. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS\\_BULLETIN\\_2012.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf).
- García G., Y. Sánchez, J. Peña, J. y Z. Moreno. 1995. Respuesta de maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno. Terra 13: 71-80.
- García M., R., L. Pérez R. 2003. Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 9:5-10.
- García M., D. y F. Uruburú. 1991. La conservación de cepas microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo. Universidad de Valencia. Pp. 74-79.
- Garnsey S., M. 1999. Systemic diseases. *In*: Citrus health management. Plant Health Management Series. Press. St. Paul, Minnesota, USA. 197 p.
- Gliessman R., S. 1998. Agroecology: ecological processes in sustainable agriculture. Sleeping Bear Press. E.U.A. 349 p.
- González C., M. 2005. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosfericos. Terra 23: 29-37.
- Granados, P., R. y P. Villaverde M. 1997. Microbiología. Bacteriología, características y clasificación bacteriana. Virología, Características y técnicas Bioquímicas. Editorial Paraninfo. España. 323 p.

- Hallmann J., A. Quadt-Hallmann, W. Mahaffee, y J. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43:895.
- Hart D., R. 1979. Agroecosistemas. Conceptos Básicos. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza. Costa Rica. 201 p.
- Hartmann A., M. Rothballer y M. Schmid. 2008. Lorens Hiltner. A Pioneer in rhizosphere microbiol ecology and soil bacteiology research. *Springer Science* 312:7-14.
- Henao I., C. Franco, M. y G. Marín. 2006. Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. *Revista Universitas Scientaurum* 11:51-60.
- Hernández A., F. 2008. La coinoculación *Glomus hoi* like-*Bradyrhizobium japonicum* en la producción de soya (*Glycine max*) variedad Verónica para semilla. *SciELO. La Habana* 29:41-45.
- Hernández A., A. Medina, M. Quiñones, M. Hofte, M. Heydrich y A. Hernández N. 2004. Strain identification of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas fluorescens* associated to maize crop by polyphasic taxonomy. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:159-163.
- Hernández L., B. Bautista, G. Velázquez y R. Hernández. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 66- 74.
- Hernández L. y A. Escalona. 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: Las bacterias PGPR. La ciencia y el Hombre. <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol16num1/articulos/microorganismos/micro.htm> (Consultado 19/05/12).
- Hernández M., I. 2000. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como complemento de la nutrición mineral del tomate (*L. esculentum*). Tesis de maestría. INCA. 89 p.
- Hernández R., A., León P. D., Rives N. R., Díaz O. A., Almaguer Ch. M. y Acebo G. Y. 2010. Identificación de aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* fluorescentes con actividad antagonica ante *Curvularia* spp. *Revista Protección Vegetal* 25: 181-189.
- Ho-Hing H. 1990. Taiwan *Phytophthora*. *Bot Bull Academia Sinica* 31:89–106.
- Holgún Z., G. 2008. La comunicación entre bacterias y plantas. *Ciencia* 59: 72-78.
- Ingraham L., J. y A. Ingraham C. 1998. Introducción a la Microbiología. Reverté. Barcelona. España. pp. 710-711.
- Jackson L. K. y F. Davis S. 1999. Citrus growing in Florida. 4° Ed. University Press of Florida. Gainesville, FL. 303 p.
- Joublan J., P. y N. Cordero. 2002. Comportamiento de algunos cítricos sobre diferentes portainjertos, en su tercera temporada de crecimiento, Quillón VIII región, Chile. *Agricultura técnica* 62:469-479.

- Kapulnik, Y. y Y. Kon. 2002. Plant growth promotion by rizosphere bacteria. In: Waisel Y., Eshell A. y Kafki U. (eds). Plant roots. The hidden half. Marcel. New York. Pp. 869-895.
- Kennedy, I. R. E. N. Islam. 2001. The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen fixation requirements on farms. Australian Journal of Experimental Agriculture 41: 477-457.
- Leff, E. 1981. Agroecosistemas, recursos naturales y desarrollo económico En: Agroecosistemas de México, contribuciones a la enseñanza, investigación y divulgación agrícola. Colegio de Postgraduados. México. pp. 245- 254.
- Loredo P., J., L. Beltrán y A. Peña del Río. 2007. Uso de biofertilizantes para la producción de maíz forrajero en condiciones de temporal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias 2:60.
- Lemanceau P., P. Bauer, S. Kraemer y J. Brian F. 2009 Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. Plant and Soil 321:513–535.
- Loussert R. 1992. Los Agrios. Edit. Mundi- Prensa. Madrid. 64 p.
- Mao W., J. Lewis A., P. Hebbar K. y R. Lumsden D. 1997. Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist for reducing corn damping off caused by species de *Phythium* and *Fusarium*. Plant Disease. 81:450- 454.
- Medina, S.1995. El cultivo moderno del naranjo limonero y otros agrios. Editorial De Vecchi. Barcelona. 95 p.
- Mendoza, C. Z.1983. Principios de Fitopatología y Enfermedades Causadas por Hongos. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, México. 285 p.
- Meza R., A. Monroy, M. Mercado, R. Poutou, P. Rodríguez y A. Pendroza. 2004. Study of the stability in real time of cryopreserved strain Banks. Universitas Sclietiatum (2):35-42
- Morales, G., Y., E. Duque, A. Rodríguez O., De la Torre J., C. Martínez R., T. Pérez R. y R. Muñoz J. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. Laboratorio de Microbiología de Suelo. Centro de investigaciones en Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. 19 p.
- Muraleedharan H., S. Seshadri y K. Perumal. 2010. Biofertilizar (Phosphobacteria). Shri AMM Murrugappa Chettiar Research Centre. Taramani. 16 p.
- Nelson L., M. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants.  
<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/rhizobacteria/>  
(Consultado:14/06/2011).
- Nicholls E., C. 2008. Control Biológico de insectos. Un Enfoque Agroecológico. Universidad de Antioquia 233 p.

- Olsen S., R., C. Cole V., F. Watanabe S. y L. Dean A. 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. Department of Agriculture. Circular 939. U.S. Washington, D. C.
- Orozco S., M. 2001. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México. Universidad Autónoma de México. México. 150 p.
- Pérez C., M., A. Peñaranda L., y G. Herazo M. 2010. Impacto, Manejo y Control de enfermedades causadas por *Phytophthora palmivora* en diferentes Cultivos. Universidad de Pamplona. 71 p.
- Peter J., A., V. Calvacante A., J. Baldani I. y J. Döbereiner. 1987. Bioassay for studying the role of siderophores in potato growth stimulation by *Pseudomonas* spp. in short potato rotations. *Soil Biology* 19:443-445.
- Picard C., F. Di Cello F., M. Ventura, R. Fani y A. Guckert. 2000. Frequency and Biodiversity of 2-4 Diacetylphloroglucinol- producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied and Environmental Microbiology* 66:948-955.
- Pimavesi, A. 1984. Manejo Ecológico del Suelo. Edit. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 499 p.
- Posadas, M. C. 2010. Plagas y Enfermedades de importancia económica en cítricos de la región de Temapache, Veracruz. Tesis Profesional. Universidad Veracruzana. pp. 44-48.
- Pulido, L. 2002. Manejo integrado de biofertilizantes para la producción de posturas de alta calidad en los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) y cebolla (*Allium cepa* L.) sobre suelos ferralíticos rojos de Ciego de Ávila. Tesis Doctoral. Cuba. 97 p.
- Punschke K. y M. Mayans. 2011. Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia* 15:19-26.
- Radwan, T., Z. Mohamed, V. Reis. 2011. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesq. Agropec. Bras.* 39: pp. 987-994. 2004
- Reyes I., G. Alvarez, El- Ayoubi, H., y A. Valey. 2008. Selección y Evaluación de rizobacterias del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro* 20:37-48.
- Riveros, A. A. 2010. Inducción de Resistencia en Plantas. Interacción: Planta-Patógeno. Universidad de Tolima. Colombia. 113 p.
- Robles C. y J. Barea M. 2004. Respuesta de la planta y del suelo a inoculación con *Glomus intraradices* y rizobacterias en maíz en cultivo intensivo. *Terra Latinoamericana* 22:59-69.
- Rojas A., G. Holguin, B. Glick, R. y Y. Bashan 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N<sub>2</sub>-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 181-87.

- Romero C., S. 1994. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 138 p.
- Ruiz, R., O. 1995. Agroecosistema: el término, concepto y su definición bajo el enfoque agroecológico y sistémico. *In: Agroecología y Desarrollo sustentable*. 2do. Seminario Internacional de Agroecología. Universidad Autónoma Chapingo. México. pp. 103- 113.
- Samaniego R. J., C. Cabrera F., C. Morid M. y U. Medina V. (s/a). Tecnología de Producción de Naranja y Toronja. En: Jornada de Tecnología de Productos Cítricos. Fundación Produce. México. pp. 4-15.
- Sambrook J., E. Fritch F. y T. Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning, a laboratory Manual*, Vol, 1. Ed. Cold – Spring Harbor Laboratory Press. USA
- Sarabia O. M., P. Madrigal R., T. Martínez M. y A. Carreón Y. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12:65-71.
- Sarandón J., S. 2002. El agroecosistema: un sistema natural modificado. *In: Agroecología: El camino para una agricultura sustentable*. Editorial Científicas Americanas. Argentina. 557 p.
- Schroth M., N. y A. Weinhold R. 1986. Root-colonizing bacteria and plant health. *Hortscience* 21:1295-1298.
- Serrano C., L. y F. Galindo E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*. 19 p.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2012. México, entre los líderes en producción de cítricos a nivel mundial. [http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/sanluispotosi/boletines/Paginas/BO\\_L1301112.aspx](http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/sanluispotosi/boletines/Paginas/BO_L1301112.aspx) (Consultado 16/02/2013).
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2002a. NORMA Oficial Mexicana NOM-079-FITO-2002. Requisitos fitosanitarios para la producción y movilización de material propagativo libre de virus tristeza y otros patógenos asociados a cítricos. 17 p.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana. 1996. NOM-011-FITO-1995. Establecimiento de la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de los cítricos. 16 p.
- NOM- 021- SEMARNAT-2000. 2002. Secretaría de Medio ambiente y Recursos Naturales. Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. México. 85 p.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2012. Estadísticas del Sector Agroalimentario y Pesquero. México: quinto productor mundial de cítricos. <http://www.siap.gob.mx/opt/123/69/68.html>. (14/05/2013).

- Senasica. 2009. Norma Oficial Mexicana NOM-088-FITO-1995. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=569> (Consultado 29/04/2011).
- Senasica. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-081-FITO-2001. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=702> (Consultado 29/04/2011).
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2011. Reporte especial CÍTRICOS. México. 12 p.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2012. México: Quinto productor de mundial de cítricos. <http://www.siap.gob.mx/opt/123/69/68.html>
- Sistema de Productos Cítricos. 2008. Plagas y enfermedades. [http://www.campotabasco.gob.mx/sispro\\_citricos/tor\\_enfermedades2part.html](http://www.campotabasco.gob.mx/sispro_citricos/tor_enfermedades2part.html) (Consultado: 17/07/11).
- Sivan A., Y. Elad y I. Chet 1984. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology* 74:498–501.
- Slaton N., M. Morteza y L. Espinoza. 2012. Como interpretar los resultados de los análisis de suelo. Division of Agriculture. Edit. Research & extension. E.U.A. 4 p.
- Soler A., J. y F. Soler G. 2006. Cítricos. Variedades y técnicas de cultivo. 237p.
- Soroa B., M. R., F. Hernández A., F. Soto, y A. Terry E. 2009. Identificación de algunas especies de microorganismos benéficos en la rizósfera de gerbera y su efecto en la productividad. *Revista Chapingo. Horticultura* 15:41-48.
- Tambong J. T., R. Xu y E. S. P. Bromfield. 2009. Intercistronic heterogeneity of the 16S-23S rRNA spacer region among *Pseudomonas* strains isolated from subterranean seeds of hog peanut (*Amphicarpa bracteata*). *Microbiology* 155: 2630-2640.
- Tavera, G. 1985. Criterios para interpretación y aprovechamiento de los reportes de laboratorio para las áreas de asistencia técnica. Publicación Especial 3. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. México. 150 p.
- Thakuria, D., N.C.Talukdar, C. Goswami, S. Hazarika, R. C. Boro, y M. R. Khan. 2004. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Current Science* 86:978-985.
- Timmer, L. W., Garnsey S. M., y Graham J. H. 2002. Plagas y enfermedades de los cítricos. The American Phytopathological Society. Edit. Mundi- Prensa. España. 2da. Edición. pp. 6-27.
- Trujillo, A. J., H. M. Sánchez A., P. L. Robles-García. 2008. Situación actual y perspectivas del Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos en México. <http://www.concitver.com/huanglongbingYPsilidoAsiatico/Memor%C3%ADa-15%20Trujillo.pdf> (Consultado 23/03/14).
- Vázquez, M. L. L. 2010. Manejo de plagas en la agricultura ecológica. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana. Cuba. 120 p.

- Veseey J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacterias as biofertilizers. *Plant and Soil* 255:571-586.
- Viets, F. G. y W. Lindsay L. 1973. Testing soils for zinc, copper, manganese and iron. In: *Soil Testing and Plant Analysis*. Edit. Soil Science Society of America. E.U.A. pp. 153-172
- Wall G., L. 2002. Plantas, bacterias, hongos, mi mujer, el cocinero y su amante: sobre interacciones biológicas, los ciclos de los elementos y otras historias. Buenos Aires, Argentina. Siglo XXI. 64 p.
- Wamberg C., S. Christensen, I. Jakobsen, A. K. Müller y S. J. Sørense. 2003. The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). *Soil Biology and Biochemistry* 35:1349-1357.
- Whipps J., M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52:487-490.
- Whiteside J., S. Garnsey, L. Timmer. 1996. Plagas y enfermedades de los cítricos. Mundi-Prensa. España. 80 p.
- Wutscher H., K. 1979. Citrus rootstocks. In: *Horticultural Reviews Vol 1*. Janick, J. Edit. AVI Publishing Company, Inc. Westport Connecticut. pp. 30-269.
- Zaki K., J. Misaghi y A. Heydari. 1997. Control of cotton seedling damping off in the field by *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Plant Disease*. 82: 291-293.
- Zamioudis C. y C. Pieterse M. J. 2012. Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. *MPMI* 25:139–150
- Zentmyer G.,A. y D. Mitchell C. 1986. Phytophthora diseases of fruit trees in the tropics. *Trop Plant Pathology* :287-309.
- Zulueta R., R., C. Lara L. y A. Trejo D.2009. Manual de Prácticas Generales del Laboratorio de Organismos Benéficos. Universidad Veracruzana. pp.37-41.

## IX. ANEXO

### 9.1. Cuestionario aplicado a viveristas certificados de la zona de Martínez de la Torre, Ver.



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## CAMPUS VERACRUZ

El presente instrumento tiene el objetivo de conocer la disponibilidad de los viveristas productores de cítricos a la adopción de biofertilización con rizobacterias, que además son agentes de control biológico y promueven el crecimiento de las plantas.

Nombre del vivero \_\_\_\_\_

Nombre del propietario \_\_\_\_\_

Nombre del responsable técnico \_\_\_\_\_

Localidad \_\_\_\_\_

Municipio \_\_\_\_\_

### Manejo del vivero:

1. ¿Qué tipo de fertilización utiliza?

2. ¿En que etapas del desarrollo de su planta realiza la fertilización?

3. ¿Cuánto aplica de fertilizante por planta?

4. En su inventario ¿que cantidad de patrones maneja por ciclo?

5. ¿Cuál es el precio del total de fertilizante que utiliza en total?

6. ¿Cuánto es el volumen de fertilizante que utiliza en total?

**Fertilizantes biológicos:**

7. ¿Conoce o ha escuchado hablar de los fertilizantes biológicos?

Si

No

8. ¿Qué tipo de fertilizantes biológicos conoce?

9. ¿Ha tenido referencia acerca de los fertilizantes biológicos elaborados a base de hongos y bacterias benéficas?

Si Cuales? \_\_\_\_\_ No

10. ¿Conoce los beneficios de estos microorganismos?

Si Como cuales? \_\_\_\_\_ No

11. ¿Ha aplicado alguno de estos fertilizantes biológicos?

Si Cuales? \_\_\_\_\_  
No

12. ¿Ha quedado satisfecho con los resultados obtenidos?

Si No ¿Por qué? \_\_\_\_\_

13. ¿El producto biológico que aplica le ha traído beneficios en el vigor de la planta y en la protección fitosanitaria?

Si

No

14. ¿Qué opina acerca de esta técnica de control?

15. ¿Evaluaría de manera experimental el comportamiento de las bacterias benéficas en su vivero?

Si No ¿Por qué? \_\_\_\_\_

16. ¿Considera la necesidad de una capacitación para poder emplear estos organismos?

Si

No

17. ¿Considera que costo del producto podría ser una limitante para su adopción?

Si

No

18. Si el costo del biofertilizantes se incrementara \$ 0.50 más que el producto que actualmente utiliza, pero este ayudara a disminuir aun más sus problemas fitosanitarios, ¿ Lo compraría?

Si

No ¿Por que? \_\_\_\_\_

19. ¿Utilizaría este tipo de productos para reducir en su vivero el uso de fertilizantes químicos?

Si

No

**Enfermedades presentes en vivero:**

20. ¿Cuáles son las principales enfermedades que existen en su vivero?

21. ¿En que porcentaje considera usted que se estiman los daños producidos por estas enfermedades?

22. ¿Cuál es la enfermedad que más se presenta en su vivero?

23. ¿Qué tipo de control utiliza actualmente para el manejo de las enfermedades en su vivero?

24. ¿Cuál ha sido el costo del producto?

25. ¿Esta conforme con el producto?

Si ¿Por qué?

No ¿Por qué?

26. ¿Utiliza fungicidas de contacto o sistémicos?

27. ¿Cada que tiempo?

28. ¿Cuánto es el precio total de los fungicidas que utiliza por cada ciclo?

¡ MUCHAS GRACIAS POR SU COOPERACIÓN!