



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS VERACRUZ

POSTGRADO EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES

**RIZOBACTERIAS Y HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES COMO
ALTERNATIVA BIOTECNOLÓGICA PARA MEJORAR EL VIGOR Y SANIDAD
DE PORTAINJERTOS DE CÍTRICOS**

ROBERTO GREGORIO CHIQUITO CONTRERAS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

TEPETATES, MANLIO FABIO ALTAMIRANO, VERACRUZ.

2011

La presente tesis, titulada: **Rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares como alternativa biotecnológica para mejorar el vigor y sanidad de portainjertos de cítricos**, realizada por el alumno: **Roberto Gregorio Chiquito Contreras**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
AGROECOSISTEMAS TROPICALES**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. ELISEO GARCÍA PÉREZ

ASESOR:



DR. FRANCISCO OSORIO ACOSTA

ASESOR:



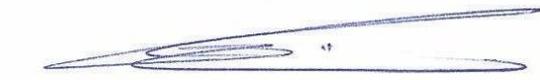
DR. JUAN ANTONIO VILLANUEVA JIMÉNEZ

ASESOR:



DR. GUILLERMO CARRILLO CASTAÑEDA

ASESOR:



DR. RAMÓN ZULUETA RODRÍGUEZ

Tepetates, Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, 27 de Junio de 2011.

RIZOBACTERIAS Y HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES COMO
ALTERNATIVA BIOTECNOLÓGICA PARA MEJORAR EL VIGOR Y SANIDAD DE
PORTAINJERTOS DE CÍTRICOS

Roberto Gregorio Chiquito Contreras, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2011

El aprovechamiento de agentes biológicos como rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares constituye una alternativa viable para disminuir el uso de agroquímicos en la producción agrícola. Se evaluó el potencial de rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares como promotores del crecimiento y agentes de control biológico en plantas de cítricos. En la primera etapa de tres, se realizaron pruebas de reacción bioquímica, las cuales permitieron la identificación de las cepas FCA-56 y FCA-60 como *Pseudomonas putida*, FCA-8 como *Pseudomonas fluorescens* y en el caso de las cepas FCA-9, FCA-10, FCA-35 y FCA-52 se confirmó el género *Pseudomonas*. Además, se determinó la capacidad antagónica *in vitro* de las siete cepas rizobacterianas sobre el crecimiento de *Phytophthora parasitica*. Todas las cepas inhibieron el crecimiento del patógeno, la mayor inhibición se obtuvo con las cepas FCA-56 (56.84 %) y FCA-8 (56.63 %). En la segunda etapa, se identificaron molecularmente las cepas FCA-8, FCA-56 y FCA-60; para cada cepa se amplificó un fragmento de ADNr de 750 pb. Los fragmentos generaron secuencias consenso de 315, 365 y 370 nucleótidos para FCA-8, FCA-56 y FCA-60, respectivamente. Las secuencias consenso se compararon con secuencias del Genbank (NCBI), se obtuvo el 100 % de similitud de las tres cepas con la especie *P. putida*. En la tercera etapa, se evaluó el efecto de las tres cepas rizobacterianas y un consorcio de hongos micorrizógenos arbusculares sobre el crecimiento de los portainjertos *Citrus volkameriana* y lima Rangpur injertados con limón Persa, y su efecto antagónico frente a *P. parasitica*. Las cepas rizobacterianas y el consorcio micorrizógeno en lo individual y combinados, promovieron el crecimiento de las plantas y confirieron capacidad antagónica frente a *P. parasitica* en condiciones de vivero.

Palabras clave: *Pseudomonas putida*, *Phytophthora parasitica*, antagonismo, ADNr 16S, colonización micorrízica.

RHIZOBACTERIA AND ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI LIKE
BIOTECHNOLOGICAL ALTERNATIVE TO IMPROVE THE VIGOR AND HEALTH OF
CITRUS PLANT

Roberto Gregorio Chiquito Contreras, Ph. D.
Colegio de Postgraduados, 2011

The use of biological agents such as rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi is a viable alternative to reduce the use of agrochemicals in agricultural production. The potential of rhizobacteria and vesicular arbuscular mycorrhizae (VAM) as growth promoters and biological control agents was evaluated in citrus plants. In the first stage of three, biochemical techniques were used to identify the strains FCA-56 and FCA-60 as *Pseudomonas putida* and FCA-8 as *Pseudomonas fluorescens*, while the *Pseudomonas* genus was confirmed for the strains FCA-9, FCA-10, FCA-35 and FCA-52. *In vitro* antagonism of seven rhizobacteria strains against *Phytophthora parasitica* was evaluated. All strains inhibited growth of the pathogen, with the greatest inhibition obtained with strains FCA-56 (56.84 %) and FCA-8 (56.63 %). In the second stage, the strains FCA-8, FCA-56 and FCA-60 were identified using molecular techniques. From each strain, a 750 bp rDNA fragment was amplified and consensus sequences of 315, 365 and 370 nucleotides were generated for FCA-8, FCA-56 and FCA-60, respectively. The consensus sequences were compared with sequences from Genbank (NCBI) and 100 % similarity with the species *P. putida* was obtained for all three strains. In the third stage, the effect of these three strains, and VAM, was evaluated on the growth of rootstocks of *Citrus volkameriana*, Rangpur lime and grafts of Tahiti lime, as was their antagonistic effect against *P. parasitica*. The rhizobacteria strains and VAM, both individually and in combination, promoted the growth of the plants and conferred antagonistic capacity against *P. parasitica* under nursery conditions.

Key words: *Pseudomonas putida*, *Phytophthora parasitica*, antagonism, 16S rDNA, mycorrhizal colonization.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante el periodo de enero de 2007 a diciembre 2009, para realizar mis estudios de doctorado en el Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, por permitir y facilitarme el proceso para formar parte de su programa de postgrado en Agroecosistemas Tropicales.

Al Dr. Eliseo García Pérez, por fungir como mi Profesor Consejero, por su dirección y asesoría permanente, por su amistad, apoyo y enseñanzas, que en todo momento durante mi formación académica y realización de éste trabajo de investigación me brindó oportunamente.

Al Dr. Francisco Osorio Acosta, por la dirección y asesoría constante durante la realización de está tesis, siendo por demás valioso, su amistad, consejos, enseñanza, apoyo y paciencia, que en todo momento tanto fuera como dentro de las instalaciones del Campus Veracruz me brindó.

Al Dr. Juan Antonio Villanueva Jiménez, por sus asesorías proporcionadas durante la estructuración y redacción de la tesis, por su amistad, apoyo y paciencia demostrada en todo momento, insidiendo positiva y significativamente en mi formación académica y profesional.

Al Dr. Guillermo Carrillo Castañeda, por sus oportunas y valiosas intervenciones en el asesoramiento y sugerencias para la realización de la tesis, por su amistad y apoyo recibido.

Al Dr. Ramón Zulueta Rodríguez, por su asesoramiento y acertadas sugerencias durante la estructuración y redacción de la tesis, por su amistad, facilidades y consejos recibidos antes y durante la realización de los estudios doctorales.

A la M. en C. Doris Guadalupe Castillo Rocha, a quien respeto y admiro por su grandiosa amistad incondicional, apoyo, consejos y palabras de aliento que me impulsan siempre a ser mejor profesionista y ser humano.

A mis profesores del Campus Veracruz por las enseñanzas recibidas en cada una de sus clases.

A Laura, Rosario, Faby y al Sr. Andrés, por su amabilidad y disponibilidad para facilitar la información que agiliza los procesos académicos.

Al personal directivo y administrativo del Campus Veracruz.

A toda mi Familia, por estar presentes siempre que los necesito, con cariño y admiración.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. Situación problemática.....	3
2. Preguntas de investigación.....	6
3. Hipótesis de trabajo.....	6
4. Objetivos.....	7
5. Marco teórico.....	8
5.1. Concepto de agroecosistema.....	8
5.2. Jerarquía de agroecosistemas.....	10
5.3. Alternativas metodológicas para el análisis de agroecosistemas.....	12
5.4. Importancia de los cítricos.....	14
5.4.1. Portainjertos de cítricos.....	16
5.5. La rizósfera.....	17
5.5.1. Exudados radicales.....	18
5.6. Interacción molecular planta-microorganismos.....	19
5.6.1. Formas de nutrición de los microorganismos patógenos.....	21
5.6.2. Activación del sistema molecular defensivo de la planta.....	22
5.6.3. Respuesta defensiva gen por gen.....	23
5.6.4. Respuesta defensiva de reacción hipersensible.....	25
5.6.5. Síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis.....	26
5.6.6. Respuesta de resistencia sistémica.....	27
5.7. Importancia de los microorganismos benéficos en la agricultura.....	28
5.7.1. Cualidades de las rizobacterias.....	29
5.7.2. Rizobacterias PGPR como promotoras del crecimiento vegetal.....	30
5.7.3. Rizobacterias PGPR como agentes de control biológico.....	31
5.7.4. Géneros importantes de rizobacterias PGPR.....	31
5.7.5. Enfoque sistémico de la interacción planta-rizobacteria-patógeno.....	32
5.7.6. Hongos formadores de micorriza arbuscular HMA.....	34
5.7.7. Clasificación, estructura y función de los HMA.....	35

	Página
5.7.8. Efecto de los HMA en la nutrición mineral de las plantas.....	36
5.7.9. Influencia de la inoculación de PGPR y HMA en plantas de interés agrícola.....	37
6. Literatura citada.....	39

CAPÍTULO I. CAPACIDAD ANTAGÓNICA *IN VITRO* DE RIZOBACTERIAS CONTRA *Phytophthora parasitica* AGENTE CAUSAL DE GOMOSIS EN CÍTRICOS..... 48

RESUMEN.....	48
ABSTRACT.....	49
1.1. Introducción.....	50
1.2. Materiales y métodos.....	51
1.2.1. Procedencia y caracterización bioquímica de rizobacterias.....	51
1.2.2. Obtención y mantenimiento de <i>Phytophthora parasitica</i>	52
1.2.3. Evaluación de medios de cultivo.....	52
1.2.4. Evaluación de la capacidad antagónica <i>in vitro</i>	53
1.3. Resultados y discusión.....	54
1.3.1. Caracterización bioquímica de rizobacterias.....	54
1.3.2. Evaluación de medios de cultivo.....	56
1.3.3. Evaluación de la capacidad antagónica <i>in vitro</i>	57
1.4. Conclusiones.....	59
1.5. Literatura citada.....	59

CAPITULO II. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE RIZOBACTERIAS DEL GÉNERO *Pseudomonas* AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE *Citrus volkameriana*..... 62

RESUMEN.....	62
ABSTRACT.....	63

	Página
2.1. Introducción.....	64
2.2. Materiales y métodos.....	66
2.2.1. Procedencia y cultivo de las cepas <i>Pseudomonas</i>	66
2.2.2. Extracción y cuantificación del ADN de las cepas <i>Pseudomonas</i>	66
2.2.3. Amplificación del gen ADN ribosomal 16S de las cepas <i>Pseudomonas</i>	67
2.2.4. Análisis de la secuenciación del gen ADNr 16S de las cepas <i>Pseudomonas</i>	68
2.3. Resultados y discusión.....	68
2.3.1. Extracción y cuantificación del ADN de las cepas <i>Pseudomonas</i>	68
2.3.2. Amplificación del gen ADN ribosomal 16S de las cepas <i>Pseudomonas</i>	70
2.3.3. Análisis de la secuenciación del gen ADNr 16S de las cepas <i>Pseudomonas</i>	72
2.4. Conclusiones.....	75
2.5. Literatura citada.....	76
CAPÍTULO III. BIOFERTILIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS Y HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES PARA MEJORAR EL VIGOR Y SANIDAD DE PORTAINJERTOS DE CÍTRICOS FRENTE A <i>Phytophthora parasitica</i>.....	78
RESUMEN.....	78
ABSTRACT.....	79
3.1. Introducción.....	80
3.2. Materiales y métodos.....	82
3.2.1. Propagación y obtención de los inóculos rizobacterianos y consorcio micorrizógeno.....	82
3.2.2. Material vegetal utilizado.....	83
3.2.3. Diseño experimental.....	84

	Página
3.2.4. Biofertilización de los portainjertos <i>C. volkameriana</i> y lima Rangpur.....	84
3.2.4.1. Variables de estudio.....	85
3.2.5. Evaluación de la actividad antagónica de las cepas rizobacterianas y el consorcio micorrizógeno frente a <i>P. parasitica</i> en invernadero.....	85
3.3. Resultados y discusión.....	86
3.3.1. Crecimiento de <i>C. volkameriana</i> y lima Rangpur promovido por la biofertilización con rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares.....	86
3.3.2. Crecimiento de limón Persa promovido por la biofertilización con rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares.....	90
3.3.2.1. Contenido de nutrientes en hojas de limón Persa.....	92
3.3.3. Determinación de poblaciones rizobacterianas y colonización micorrízica.....	96
3.3.4. Evaluación de la actividad antagónica de las cepas rizobacterianas y el consorcio micorrizógeno frente a <i>P. parasitica</i> en invernadero.....	99
3.4. Conclusiones.....	101
3.5. Literatura citada.....	101
CONCLUSIONES GENERALES.....	106

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Nivel de tolerancia de portainjertos de cítricos a enfermedades de importancia económica.....	17
Cuadro 1.1. Caracterización bioquímica de siete cepas rizobacterianas aisladas de la rizósfera de <i>C. volkameriana</i>	55
Cuadro 1.2. Respuesta de crecimiento de cepas rizobacterianas y de <i>P. parasítica</i> en cinco medios de cultivo.....	56
Cuadro 1.3. Actividad antagónica <i>in vitro</i> de siete cepas de <i>Pseudomonas spp.</i> sobre la cepa CPT-12 de <i>P. parasítica</i> en el medio de cultivo BK+MA.....	57
Cuadro 2.1. Cuantificación por espectrofotometría del ADN genómico extraído de las cepas <i>Pseudomonas</i>	69
Cuadro 2.2. Secuencias del gen 16S ribosomal obtenidas en las tres cepas rizobacterianas del género <i>Pseudomonas</i>	73
Cuadro 2.3. Identificación molecular del gen 16S ribosomal obtenido en las tres cepas rizobacterianas.....	74
Cuadro 2.4. Comparación entre la identificación bioquímica (Capítulo I) y molecular efectuada en las cepas rizobacterianas.....	74
Cuadro 3.1. Promedios de las variables de crecimiento de <i>C. volkameriana</i> y lima Rangpur biofertilizados con rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares para las parcelas grandes.....	88
Cuadro 3.2. Biofertilización con rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares sobre el crecimiento de <i>C. volkameriana</i> y lima Rangpur.....	89
Cuadro 3.3. Promedios de las variables de crecimiento de limón Persa injertado sobre <i>C. volkameriana</i> y lima Rangpur biofertilizados con rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares, para las parcelas grandes.....	90
Cuadro 3.4. Efecto de la biofertilización de rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares sobre el crecimiento del injerto limón Persa.....	91
Cuadro 3.5. Influencia de la biofertilización de rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares en la composición nutrimental de la hoja de limón Persa.....	95

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Jerarquía de sistemas de acuerdo a su nivel de complejidad.....	11
Figura 2. Jerarquía de agroecosistemas de acuerdo a la propuesta de Conway (1987).....	12
Figura 3. Interacción sistémica planta-rizobacteria-patógeno.....	33
Figura 1.1. A la izquierda se muestra la restricción del crecimiento micelial de la cepa CPT-12 (<i>P. parasitica</i>) por la presencia de la cepa FCA-56 (<i>P. putida</i>) y a la derecha se observa el crecimiento pleno de CPT-12 <i>in vitro</i>	58
Figura 2.1. Extracción total de ADN genómico de las tres cepas rizobacterianas.....	69
Figura 2.2. Visualización de los fragmentos amplificados de 750 pb del gen 16S ribosomal extraído de las tres cepas rizobacterianas del género <i>Pseudomonas</i>	70
Figura 3.1. Poblaciones rizobacterianas de <i>Pseudomonas putida</i> cuantificadas en la rizósfera de <i>C. volkameriana</i> y lima Rangpur....	97
Figura 3.2. Colonización rizosférica del consorcio micorrizógeno MTZ-1 en <i>C. volkameriana</i> y lima Rangpur.....	99
Figura 3.3. Daño ocasionado por <i>P. parasitica</i> sobre la corteza de <i>C. volkameriana</i> biofertilizado con rizobacterias y el consorcio micorrizógeno.....	100

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los cítricos son la base de una agroindustria de suma importancia para la población y comercio en muchos países de clima tropical y subtropical, debido a la gran cantidad de empleos que generan durante su proceso productivo, por el número de divisas que ingresan vía exportación y por el amplio mercado interno a partir de su industrialización, comercialización y consumo de fruta (Peña, 2003). En México, la producción de cítricos se realiza en 23 estados, destacando en orden de importancia por su superficie sembrada Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas, Michoacán, Nuevo León, Colima y Oaxaca. Situación que lo ubica como el quinto productor a nivel mundial, con una superficie sembrada mayor a las 532 mil ha, con una producción anual superior a 6.77 t de fruta fresca, de las cuales naranja, limón mexicano y limón persa son las especies que representan el 95 % de la producción nacional y el 5 % restante conformado por mandarina, tangerina, lima y toronja (Puente, 2002; Peña, 2003; FAO, 2009; SIAP, 2009).

En el estado de Veracruz se destinan más de 212 mil ha para la producción de cítricos, sobresalen los municipios de Martínez de la Torre, Temapache, Papantla, Tihuatlán y Atzálan. Este escenario productivo lo ubica como el principal proveedor de frutas cítricas para el mercado nacional e internacional. Destacan las exportaciones de limón Persa hacia los Estados Unidos, Europa y Asia (SIAP, 2009).

Por su condición de árboles perennes los cítricos pueden permanecer en campo durante años, por lo que se ven continuamente amenazados por patógenos como bacterias, hongos, insectos, ácaros, nematodos, virus, viroides y fitoplasmas (Romero, 2004; Román *et al.*, 2004). El ataque de algunos de estos patógenos provoca la aparición de enfermedades de importancia económica como la gomosis, ocasionada por el oomiceto del género *Phytophthora* particularmente por las especies *P. parasitica* Breda de Haan y *P. citrophthora* R.E. Smith & E.H. Smith. La presencia de este patógeno se caracteriza por el oscurecimiento gradual de la corteza del árbol, que provoca posteriormente un agrietamiento y presencia de secreciones gomosas de

coloración café, pudrición de raíces, presencia de follaje amarillento, ramas secas y caída severa de hojas y frutos. Estos síntomas provocan un decaimiento generalizado del árbol, que puede ser lento o rápido, hasta ocasionarle la muerte, la cual puede ocurrir en uno o dos meses cuando el avance de la enfermedad es severo (Timmer *et al.*, 2002; Agustí, 2003; Javier-Alva y Mattos, 2006).

En la agricultura moderna en general y en el cultivo de cítricos en particular, el control de plagas y enfermedades, así como el incremento en los volúmenes de producción se han caracterizado por el uso desmedido de agroquímicos tales como fungicidas, bactericidas, insecticidas, nematocidas y fertilizantes inorgánicos con la finalidad de garantizar producciones aceptables. En este contexto, tal esquema de producción ha generado serios problemas de contaminación ambiental, salud pública y baja fertilidad del suelo (Landeros-Sánchez *et al.*, 2007; Reyes *et al.*, 2008). La disminución en la fertilidad del suelo se relaciona a la pérdida de materia orgánica, alteraciones severas del pH y reducción de la actividad microbiológica. Ante tal problemática, es necesario implementar estrategias de producción sustentables, que no causen daños a la salud y coadyuven en la conservación del suelo y agua, componentes determinantes para el equilibrio y óptimo funcionamiento de los agroecosistemas (Sugden *et al.*, 2004; Wardle *et al.*, 2004; Barea *et al.*, 2005; Rives *et al.*, 2007).

Actualmente la biotecnología agrícola ofrece opciones de producción viables y rentables como la biofertilización. Esta tecnología impacta de forma favorable el rendimiento de los cultivos, sin dañar el ambiente, la salud humana y coadyuva en la recuperación y mejoramiento de la fertilidad de los suelos. La biofertilización consiste principalmente en el uso de microorganismos benéficos vivos, como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y los hongos formadores de micorriza; ambos tipos de microorganismos son capaces de estimular el crecimiento, desarrollo y sanidad de la planta, así como mejorar e incrementar la fertilidad del suelo, debido a su capacidad para descomponer materia orgánica, fijar nitrógeno atmosférico (Robles y Barea, 2004; Song *et al.*, 2007), solubilizar fósforo, promover la síntesis de hormonas y actuar como agentes supresores de organismos patógenos a través de la

producción de metabolitos antagónicos como sideróforos, enzimas líticas (glucanasas y quitinasas) y antibióticos (Vázquez *et al.*, 2000; Hodge *et al.*, 2001; Whipss, 2001; Xavier y Germida, 2003; Gamalero *et al.*, 2004; Pennisi, 2004; Kloepper *et al.*, 2004; Bever *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2009; Santoyo *et al.*, 2010).

De acuerdo con los antecedentes expuestos, el aprovechamiento de microorganismos benéficos como las rizobacterias y los hongos micorrizógenos arbusculares, representa para los esquemas de prácticas agrícolas sustentables un potencial ecológicamente viable. Por lo cual, en la presente investigación se evaluó la capacidad antagónica *in vitro* de rizobacterias del género *Pseudomonas* spp., sobre *P. parasítica*, agente causal de la gomosis; y se determinó en condiciones de vivero comercial el efecto de la inoculación individual y combinada de *P. putida* y un consorcio de hongos micorrizógenos arbusculares, como biofertilizantes, en el vigor y sanidad de los portainjertos *Citrus volkameriana* Tan. & Pasq., y lima Rangpur (*Citrus limonia* Osbeck), injertados con limón Persa (*Citrus latifolia* Tanaka).

1. Situación problemática

En México el estado de Veracruz es la principal entidad productora de cítricos, representa el 49 % del volumen de producción de la citricultura nacional, con una superficie cultivada superior a las 212 mil ha y rendimiento promedio de 14 t ha⁻¹, lo que genera una considerable cantidad de empleos estimados en 8 millones de jornales durante el proceso productivo (FAO, 2009; SIAP, 2009).

A pesar de los volúmenes de producción, generación de ingresos y divisas, la industria citrícola mexicana y en particular la veracruzana, enfrentan serios problemas de tipo político, socioeconómico, ambiental y técnico-productivo (Puente, 2002; Peña, 2003). En el ámbito político se tiene una escasa difusión de programas de apoyo gubernamental, constante importación de jugo concentrado y la no aplicación de las normas mexicanas fitosanitarias de producción; en la parte socioeconómica predomina el bajo nivel de organización de los productores, constante incertidumbre

de precios en el mercado nacional e internacional motivado por el intermediarismo, precios bajos en picos de cosecha y presencia cada vez mayor de bebidas sustitutas; entre las limitantes de tipo ambiental destacan los períodos prolongados de sequía e incidencia de altas temperaturas; en el rubro técnico-productivo se identifican la producción predominante de temporal, baja productividad por escasa adopción de tecnologías, insuficiente servicio de asesoría técnica integral especializada, amplio periodo de estancia de la planta producida en vivero y control deficiente de plagas y enfermedades, las cuales pueden provocar hasta 30 % de pérdidas (Román *et al.*, 2004). El embate de plagas y enfermedades ha sido tradicionalmente controlado con el uso desmedido de insumos químicos, situación que ha dado origen a diversos problemas de salud, contaminación de mantos freáticos y pérdida en la fertilidad del suelo (Barea *et al.*, 2005; Landeros-Sánchez *et al.*, 2007; Reyes *et al.*, 2008).

Entre las principales plagas de importancia económica destacan el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida* Kirkaldy), psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri* Kuwayama), mosca de la fruta (*Anastrepha ludens* Loew), minador (*Phyllocnistis citrella* Stainton), ácaro rojo (*Panonychus citri* McGregor), piojo harinoso (*Planococcus citri* Risso) y trips (*Scirtothrips citri* Moulton) (Agustí, 2003; Román *et al.*, 2004). Respecto a la presencia de enfermedades, la citricultura a nivel mundial se mantiene en alerta debido a la incidencia, rápida proliferación y severos daños provocados por las enfermedades de origen viral y bacterial, tal y como ocurre actualmente con el virus de la tristeza de los cítricos (VTC) y dragón amarillo o Huanglongbing (HLB) provocado por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, ambas enfermedades sumamente peligrosas, ya que pueden acabar con los cítricos (Román *et al.*, 2004; Robles, 2008). Sin embargo, existe otro grupo de enfermedades de importancia económica cuyo origen es de tipo fungoso entre las que destacan la gomosis (*Phytophthora parasitica* Breda de Haan y *P. citrophthora* R.E. Smith & E.H. Smith), antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.), mancha grasienta (*Mycosphaerella horii* Hara) y fumagina (*Capnodium citri* B. & Desm.) (Timmer *et al.*, 2002; Román *et al.*, 2004).

La enfermedad gomosis se caracteriza principalmente por la presencia de secreciones gomosas de coloración café en grietas que se forman sobre la corteza del árbol. Esta enfermedad provoca un decaimiento generalizado del árbol, hasta provocar su muerte (Agustí, 2003; Javier-Alva y Mattos, 2006).

Tradicionalmente la prevención y control de este patógeno se ha realizado a través de medidas terapéuticas, que consisten en la realización de cirugías para la extracción de tejido dañado y aplicaciones de fungicidas de acción sistémica o de contacto. Si bien, esta estrategia ha permitido la solución al problema, el uso continuo y desmedido de agroquímicos han generado resistencia del patógeno hacia los componentes químicos utilizados. Esta situación ha provocado la búsqueda e implementación de alternativas ecológicamente viables, sustentables, eficientes y rentables para su control (Zavaleta-Mejía, 2000; Fernández-Herrera *et al.*, 2007).

Ante esta problemática, la biotecnología agrícola promueve el uso de microorganismos benéficos como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrizógenos arbusculares, los cuales pueden ser aprovechados como biofertilizantes y agentes de control biológico (Ryan *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2009). Entre los géneros más importantes de estos microorganismos destacan por el lado de las rizobacterias: *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. y *Azospirillum* spp. Por parte de los hongos micorrizógenos arbusculares se cuenta con *Acaulospora* spp., *Glomus* spp. y *Gigaspora* spp. (Kloepper *et al.*, 2004; Fernández-Herrera *et al.*, 2007; Bever *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2009; Santoyo *et al.*, 2010).

2. Preguntas de investigación

Considerando la situación problemática, particularmente lo relacionado con la incidencia de la enfermedad denominada gomosis, la presente investigación se diseñó con la finalidad de generar conocimiento y una alternativa de manejo agroecológico que responda a las siguientes preguntas de investigación:

1. ¿Cuál será el desarrollo de *P. parasitica in vitro* con la presencia de cepas rizobacterianas del género *Pseudomonas* spp.?

2. ¿Será similar la identidad de las especies de *Pseudomonas* spp. identificadas bioquímicamente con la obtenida por secuenciación?

3. ¿Cómo influye la inoculación individual y combinada de tres cepas rizobacterianas de la especie *Pseudomonas putida* con un consorcio de hongos micorrizógenos arbusculares, sobre el vigor y sanidad de *C. volkameriana* y lima Rangpur, en presencia de *Phytophthora parasitica* con manejo técnico-productivo de vivero?

3. Hipótesis de trabajo

Las hipótesis planteadas en esta investigación fueron diseñadas con relación a las preguntas de investigación anteriormente señaladas, quedando de la siguiente forma:

1. El crecimiento micelial de *P. parasitica in vitro* es inhibido por la presencia de rizobacterias del género *Pseudomonas* spp.

2. La identificación molecular confirma de manera confiable, los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, que las rizobacterias aisladas de la rizósfera de *C. volkameriana* corresponden a las especies *P. fluorescens* y *P. putida*

3. La biofertilización individual y combinada de tres cepas rizobacterianas de la especie *P. putida* y un consorcio de hongos micorrizógenos arbusculares en el sistema radical de *C. volkameriana* y lima Rangpur, mejora el vigor e incrementa su tolerancia a *Phytophthora parasitica*.

4. Objetivos

1. Evaluar el potencial de siete cepas rizobacterianas del género *Pseudomonas* spp. como inhibidoras del crecimiento de *Phytophthora parasitica in vitro*.

2. Identificar molecularmente tres cepas rizobacterianas aisladas de la rizósfera de cítricos, a través de su material genético ADNr 16S.

3. Mejorar el vigor y tolerancia a *P. parasitica* de *C. volkameriana* y lima Rangpur en vivero, mediante la biofertilización combinada de tres cepas rizobacterianas de *P. putida* y un consorcio de hongos micorrizógenos arbusculares.

5. Marco teórico

5.1. Concepto de agroecosistema

Debido a la gran diversidad ecológica y cultural exhibida en nuestro país, se han generado distintas formas de producción de la tierra, que van desde la recolección hasta la compleja agricultura moderna, producto de la llamada “Revolución Verde”. Tales formas de producción y aprovechamiento de la tierra constituyen los sistemas de producción agrícola, también llamados agroecosistemas, los cuales son determinados por el medio físico-biológico y las condiciones sociales imperativas de las poblaciones humanas inmersas en tal diversidad ecológica. Sin embargo, la constante interacción de los factores antes señalados generó la complejidad de los agroecosistemas existentes en nuestro país (Altieri, 2002; Gliessman, 2002).

El surgimiento desde la década de 1970 hasta la fecha de diferentes conceptualizaciones sobre agroecosistema y otros términos afines ha dado lugar a confusiones y en repetidas ocasiones a una manipulación arbitraria del concepto. El término de agroecosistema empieza a difundirse mundialmente con la aparición de la revista *Agro-Ecosystem* (Hernández, 1987) y tres años después se lleva a cabo en México el primer seminario sobre Agroecosistemas de México, evento convocado por el maestro Efraim Hernández Xolocotzi (1913-1991), primera persona en el país, y de las primeras a nivel mundial, que empezó a manejar y a utilizar el concepto de agroecosistema para desarrollar investigaciones y entender la actividad agrícola en su amplitud socio-cultural y biológica, en las dimensiones espacial y temporal (Hernández, 1987; Marten, 1988; Altieri, 2002).

Una de las primeras definiciones de referencia sobre este concepto es la de Hernández (1977), quien señala que el agroecosistema es un ecosistema modificado en menor o mayor grado por el hombre, para la utilización de los recursos naturales en los procesos de producción agrícola, pecuaria, forestal o de la fauna silvestre, con el propósito de producir alimentos y fibras que satisfagan sus necesidades.

Por su parte Ruiz-Rosado (2006), define al agroecosistema como la unidad de estudio de la actividad agrícola bajo un enfoque agroecológico y sistémico, en el cual, inciden los factores tecnológicos, socioeconómicos y ecológicos para la obtención de alimentos y otros satisfactores del ser humano, a través del tiempo. En este contexto, sugiere que para tener un enfoque más cercano a la realidad de un agroecosistema se requiere indiscutiblemente de una visión holística, en la cual se considerará al agroecosistema como una entidad o sistema complejo, que es más que la suma de sus partes, ya que la sustentabilidad agroecológica a cualquier nivel jerárquico es compleja por naturaleza y por ende, deberán considerarse diferentes formas de evaluación para una mejor comprensión del sistema. Además señala que la dimensión del agroecosistema depende del nivel de análisis que se requiera, o de las necesidades docentes, de investigación y desarrollo; tomando en cuenta la propuesta de niveles de jerarquías de Conway y Barbier (1990), se puede considerar un agroecosistema desde el nivel de animal o planta hasta el complejo sistema de granja o finca.

Por lo tanto, un agroecosistema se entiende como un ecosistema natural modificado por el hombre y un sitio de producción agrícola, por ejemplo una granja o finca. El concepto de agroecosistema ofrece un marco de referencia para analizar sistemas de producción de alimentos en su totalidad, que incluye el complejo conjunto de entradas (insumos agrícolas) y salidas (producción de alimentos) así como las interacciones entre sus partes. Los agroecosistemas son más complejos que los ecosistemas naturales, principalmente por el impacto de la participación del hombre en su estructura y función (Gliessman, 2002).

Todos los agroecosistemas se caracterizan por poseer una estructura y función, como resultado del manejo que el agricultor, campesino o productor desarrolla en ellos. Dicha estructura y función dependen de los niveles de diversidad e interacciones que ocurren en el medio físico-biológico y socioeconómico inmersos en el agroecosistema, así como de los insumos externos aportados por el hombre. Tales factores determinan características o cualidades como productividad, estabilidad,

sustentabilidad y equidad, consideradas por Conway (1987) como propiedades emergentes.

A estas propiedades Marten (1988) agrega la autonomía del agroecosistema, entendida como la autosuficiencia o independencia relativa a factores externos (mercados, política, etc.) y la define como el control de los movimientos de materiales, energía e información que ocurren dentro y fuera del agroecosistema. Dentro este contexto, Okey (1996) considera también importante la elasticidad, diversidad y complejidad como propiedades extras para evaluar la estructura, función y salud de los agroecosistemas.

5.2. Jerarquía de agroecosistemas

Los agroecosistemas son el resultado de las modificaciones y alteraciones que el ser humano hace a los ecosistemas en forma constante, con la finalidad de producir alimentos, fibras, combustibles y otros satisfactores, lo que hace que los agroecosistemas sean muy diferentes a los ecosistemas naturales, existiendo jerarquías o clases que los caracterizan (Granados y López, 1996; Gliessman, 2002).

De manera general todos los sistemas se encuentran constituidos en jerarquías o clases de tipo piramidal, es decir, están constituidos tanto por otros sistemas o subsistemas relacionados entre sí por un proceso o patrón de interacciones (Chiavenato, 1997). Al respecto, Boulding citado por Chiavenato (1997), propone una jerarquía para los agroecosistemas según su nivel de complejidad (Figura 1), en este sentido, ubica al agroecosistema en el nivel social, localizado en el octavo lugar de su jerarquía como un sistema abierto; considera que la unidad no es el individuo, sino el papel desempeñado por él.

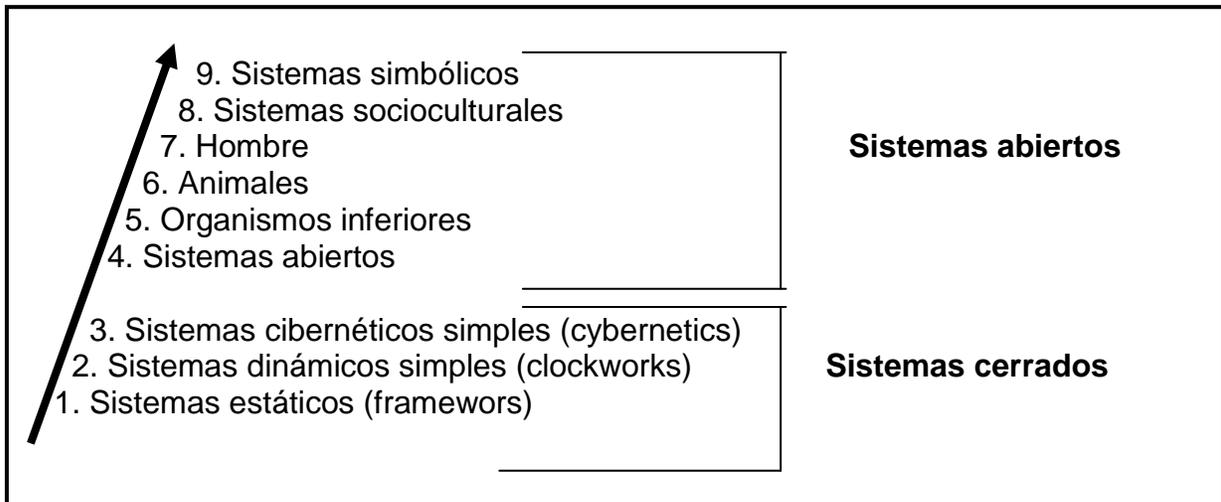


Figura 1. Jerarquía de sistemas de acuerdo a su nivel de complejidad (Chiavenato, 1997).

Para Hart (1985) el agroecosistema es un sistema en el que converge un cultivo y/o una actividad pecuaria, los cuales se encuentran inmersos en el sistema finca, considerado éste último como el sistema mayor, diseñado y controlado por un sistema socioeconómico.

Otra propuesta de jerarquía de agroecosistemas, es aquella sugerida por Conway (1987), en la cual señala a las propiedades emergentes (productividad, estabilidad, sustentabilidad y equidad) de los agroecosistemas como base para su jerarquización, los cuales pueden ser vistos desde una planta, animal, finca, región, hasta el sistema “mundo” (Figura 2). Sin embargo, si tomamos en cuenta el hecho de que los agroecosistemas son sistemas ecológicos modificados por el hombre, las plantas o animales silvestres no cumplen con esta característica; por lo tanto, su visión resulta en una jerarquización de sistemas en general, y no de agroecosistemas en lo particular.



Figura 2. Jerarquía de agroecosistemas de acuerdo a la propuesta de Conway (1987).

Trébuil (1990), en su contribución de los métodos de diagnóstico en sistemas agrarios, ubica al agroecosistema en un nivel superior al ecosistema, en donde las relaciones son físico-biológicas. Considera que el nivel superior al agroecosistema corresponde a los sistemas agrarios (nivel regional) donde están presentes los factores físico-biológicos, políticos y económicos.

5.3. Alternativas metodológicas para el análisis de agroecosistemas

De la necesidad por conocer la estructura, procesos, funcionamiento, desarrollar y evaluar políticas y programas encaminados a lograr la sustentabilidad de la agricultura, surge el análisis de agroecosistemas, el cual trata de enfrentar dos limitantes: primero, ¿Cómo integrar y manejar la composición de sustentabilidad ecológica, económica, social e institucional y engloba a su vez las perspectivas de

diversas disciplinas? y, segundo, ¿Cómo medir desarrollo sustentable en poco tiempo? (Gallardo, 2002).

Ante tal problemática, se desarrollaron diferentes propuestas metodológicas para efectuar un análisis de tipo integral de los diferentes factores involucrados directa o indirectamente en los agroecosistemas. Entre estas metodologías encontramos la propuesta de análisis de agroecosistemas de Conway (1985), análisis de sistemas agrarios de Trébuil (1990), sistema de investigación-extensión de fincas (Jones y Wallace, 1986; Schiere *et al.*, 1999), estudio de agroecosistemas de Hernández (1987), salud de agroecosistemas (Okey, 1996), entre otras. Todas ellas con cierto grado de carácter participativo y flexible.

Son participativos porque proponen la formación de grupos de trabajo con diversas disciplinas (multidisciplinarios), guiados bajo un sólo objetivo interdisciplinario o bien, transdisciplinario donde se suma al grupo de trabajo la visión del productor, es decir con un enfoque holístico (Ruiz-Rosado, 2006). Y flexibles, porque muestran la posibilidad de usar una gama de técnicas y herramientas sin necesidad de un proceso metodológico rígido; determinando por la combinación de los paradigmas cualitativos y cuantitativos (Reichardt y Cook, 2005; Gallardo, 2002).

Por otra parte, Gallardo (2002) menciona que este tipo de metodologías empleadas para el análisis de agroecosistemas poseen ciertas características en común, tales como: 1. Enfoque en el uso de trabajo multidisciplinario y técnicas de apreciación rápida; 2. Se fundamentan en conceptos ecológicos y socioeconómicos; 3. Reconocen la importancia del intercambio entre productividad, estabilidad, sustentabilidad y equidad en el desarrollo agrícola; 4. Tienen una aplicación no sólo en fincas, sino pueden usarse en sistemas mayores como una villa, cuenca, región o nación.

5.4. Importancia de los cítricos

La producción de cítricos es una actividad que a nivel mundial se realiza a escala comercial y se desarrolla en regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios del planeta, ello provoca que su producción y comercialización este gobernada por la estacionalidad. Actualmente, los cítricos son los frutos de mayor producción en el mundo, por ejemplo en los países del hemisferio norte se concentra alrededor del 60 % de la producción mundial, tal es el caso de Estados Unidos, México, España, Italia y China; el resto proviene de países del hemisferio sur como Argentina, Australia y Brasil, este último el más importante de dicha región (Agustí, 2003; Robles, 2008).

El origen geográfico de los cítricos se ubica en Asia oriental, este género posee tres especies y numerosos híbridos de interés comercial pertenecientes a la familia de las Rutáceas subfamilia Aurantoidea. Cuando se hace referencia a naranjas, limones, toronjas, entre otros, se utiliza la palabra cítricos, los cuales se caracterizan por poseer un alto contenido de ácido cítrico y vitamina C, cualidad que les proporciona su valor nutricional y típico sabor ácido (Agustí, 2003; Robles, 2008).

La estructura física de un árbol de cítricos en general se caracteriza por tener un sistema radicular de tipo pivotante con abundantes raíces secundarias. El tronco es de 6 a 10 m de altura, con la copa redondeada y corteza lisa color castaño, con ramas angulosas y espinosas. Las hojas son simples, oblongas, ovadas o elípticas de 6 a 15 cm de longitud y de 2 a 9 cm de anchura, con ápice agudo y base redondeada u obtusa, con el haz de color verde brillante y envés mate, en la axila de la hoja es común la presencia de espinas de tamaño y dureza variables. Las flores son ligeramente aromáticas, solas o agrupadas con o sin hojas, con presencia de 4 a 5 pétalos blancos glandulosos y con 20 a 25 estambres. El fruto es un hesperidio globoso u oval de 3 a 10 cm de diámetro, con la corteza lisa o rugosa de coloración variada desde amarillo-verdoso (limas, limones y pomelos) al anaranjado-rojizo (naranjas y mandarinas), consta de exocarpio con tricomas glandulares que contienen aceites esenciales, mesocarpio suave de color blanco y endocarpio con vesículas que

almacenan jugo. Las semillas son lisas o rugosas blancas de forma ovoide o redondeada, las cuales pueden ser monoembriónicas y poliembriónicas (Agustí, 2003; Amorós, 2003).

Debido a la amplia variedad de cítricos, estos generalmente se agrupan dentro de un considerable número de variedades comerciales, las cuales se encuentran distribuidas entre: 1. Naranjas dulces, 2. Mandarinas, 3. Pomelos, 4. Limoneros, 5. Limas y, 6. Híbridos. A continuación se mencionan varias de las variedades comerciales ubicadas en cada uno de los grupos de cítricos de acuerdo a lo señalado por Agustí (2003) y Amorós (2003).

1. Las naranjas dulces se dividen en tres grupos:

- a. Navel: agrupa las variedades Navelina, Newhall, Washington navel, Navelate, Lane late y Verna.
- b. Sanguinas: comprende las variedades Sanguinelli, Entrefina y Doblefina.
- c. Blancas: representadas por las variedades Pera, Natal, Hamlin, Pineapple, Salustiana y Valencia late.

2. Las mandarinas están divididas en dos grupos:

- a. Satsuma: con las variedades Owari, Clausellina, Okitsu wase y Hashimoto.
- b. Clementinas: comprende las variedades Fina, Clemenules, Oroval, Marisol, Oronules, Esbal, Beatriz de Anna, Clemenpons, Loretina, Hernandina, Guillermina, Clemenules, Clementard, Monreal, Borrull, Nour, Campeona, Dancy y Ponkan.

3. Los Pomelos comprenden las variedades Marsh, Redblush o Red Marsh, Rio Red, Ray Ruby y Star Ruby.

4. El grupo de limoneros está constituido por las variedades Eureka, Lisbon, Villafranca, Fino y Verna.

5. Las limas se encuentran divididas en los grupos de limas ácidas y dulces, de las cuales, las que tienen importancia comercial son las limas ácidas representadas por las variedades Persa (conocida en México como limón Persa), Tahití y Mexicana.
6. El grupo de híbridos está subdividido en:
 - a. Tangors: Kiyomi, Temple, Murcott y Ortanique.
 - b. Tangelos: destacan Orlando, Minneola, Mapo, Seminole, Sampson, Sunrise, Nova, Cami y Thornton.
 - c. Mandarinero: comprende Fremont, Fairchild, Robinson, Osceola, Page, Fortune, Kara, Wilking, Palazzelli, Michal, Malaquina y Malvasio.

5.4.1. Portainjertos de cítricos

En general, la producción de cítricos se realiza a partir del cultivo de árboles conformados por la unión de dos individuos de diferente especie por medio del injerto. Proceso que consiste en tomar un patrón o portainjerto, el cual constituye el sistema radical y un fragmento del tronco; sobre éste se injerta la yema que representa la variedad comercial de interés; la cual formará la copa y área productiva del árbol. La razón de realizar injertos en cítricos es para combinar en un solo árbol las características genéticas deseables de dos plantas o especies (Agustí, 2003; Robles, 2008).

En México las huertas establecidas a escala comercial usaron como patrón al naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), se ha estimado su presencia en alrededor del 90 % de las plantaciones cítricas de nuestro país. Esta situación se debe a su amplia adaptación y rusticidad que permite obtener aceptables rendimientos en los cultivares que se le injertan. Además puede prosperar en diversos tipos de suelo y tolera a ciertas plagas y enfermedades. Sin embargo, el naranjo agrio es sensible al ataque del virus de la tristeza de los cítricos (VTC). La estrategia para evitar el colapso de la actividad cítrica por la presencia del VTC, fue promover por dependencias gubernamentales,

asociaciones de viveristas y productores, la sustitución del naranjo agrio por portainjertos tolerantes al VTC tales como Citrange 35, Carrizo, Troyer, *Citrus volkameriana*, *C. macrophylla*, lima Rangpur, Citrumelo Swingle, entre otros, sin embargo, estos patrones son susceptibles al ataque de plagas y enfermedades (Agustí, 2003; Peña, 2003; Robles, 2008). En el Cuadro 1 se muestra el nivel de tolerancia de portainjertos a enfermedades de importancia económica.

Cuadro 1. Nivel de tolerancia de portainjertos de cítricos a enfermedades de importancia económica.

Portainjertos	Tolerancia a enfermedades			
	VTC	Exocortis	Psorosis	Gomosis
Naranjo Agrio	5	2	3	2
Citrango Carrizo	2	4	2	3
Citrango Troyer	2	4	2	3
Limón Volkameriana	2	2	2	3
Lima Rangpur	2	4	4	4
Citrumelo Swingle	1	2	2	1
Mandarino Cleopatra	1	2	2	3

1. Muy satisfactorio; 2. Satisfactorio; 3. Aceptable; 4. Insatisfactorio; 5. Muy insatisfactorio (Curti-Díaz *et al.*, 2000).

5.5. La rizósfera

La rizósfera fue definida por Hiltner en 1904, como la franja de suelo influenciada por las raíces de las plantas y en la cual existe un incremento significativo de la actividad microbiana, caracterizada además por la compleja relación entre minerales, gases, líquidos y materia orgánica derivada de la presencia de células vivientes y muertas; la presencia de esta gran actividad microbiana es resultado de la exudación de sustancias orgánicas por parte de la raíz (Whipps, 2001; Sugden *et al.*, 2004; Lambers *et al.*, 2009).

Para comprender con mayor facilidad el papel que desempeña la rizósfera, ésta se ha dividido en tres regiones: 1. Ectorrizósfera, zona alrededor de la raíz que constituye un hábitat altamente favorable para el desarrollo de microorganismos; 2. Endorrizósfera, involucra a la epidermis y a las células corticales de la raíz, y 3. Rizoplano, considerado como la superficie de la raíz en donde se desarrollan colonias microbianas (Whipss, 2001; Sánchez, 2007; Berg, 2009).

Un aspecto importante de la rizósfera, es la presencia de una gran variedad de sustancias orgánicas liberadas por la raíz, que directa o indirectamente tienen influencia positiva o negativa sobre la diversidad de microorganismos que ahí habitan (Vázquez *et al.*, 2000; Wardle *et al.*, 2004; Sugden *et al.*, 2004; Lambers *et al.*, 2009). La presencia de varios grupos de microorganismos que habitan en la rizósfera, resulta de vital importancia para las plantas, ya que son capaces de estimular el crecimiento y desarrollo vegetal, ofrecer un sistema de bioprotección contra algunas enfermedades, y además contribuyen en la mejora de las características físicas y químicas del suelo. Entre los microorganismos más importantes encontramos a las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, hongos micorrízicos arbusculares y rizobiáceas como *Rhizobium* capaz de efectuar la fijación de nitrógeno atmosférico (Díaz *et al.*, 2001; Hodge *et al.*, 2001; Xavier y Germida, 2003; Pennisi, 2004; Fernández-Herrera *et al.*, 2007; Martínez y Pugnaire, 2009).

5.5.1. Exudados radicales

La diversidad de comunidades microbianas que se encuentran interactuando en la rizósfera, es el resultado de las sustancias orgánicas exudadas por la raíz (Gamalero *et al.*, 2004; Pennisi, 2004), tales como: aminoácidos (asparagina, glutamina, serina, glicina, fenilalanina, arginina, prolina, entre otros), ácidos orgánicos (oxálico, cítrico, málico, acético, fumárico, entre otros), carbohidratos (glucosa, fructosa, maltosa, ribosa, xilosa, rafinosa, oligosacáridos), derivados de ácidos nucleicos (adenina, guanina, citosina, entre otros), factores de crecimiento (biotina, tiamina, niacina, inositol, piridoxina), enzimas (amilasa, proteinasa) y sustancias promotoras e

inhibidoras del crecimiento como auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y ácido cianhídrico (Bais *et al.*, 2006; Wardle *et al.*, 2004; Sánchez, 2007).

Dependiendo de la especie, edad y condiciones ambientales de las plantas, los exudados radicales pueden constituir hasta 40 % del peso seco vegetal. Sin embargo, algunos grupos de microorganismos como hongos micorrízicos y rizobacterias de la especie *Pseudomonas fluorescens* pueden alterar favorablemente la composición y presencia de los exudados radicales, con la finalidad de aprovecharlos durante el proceso de colonización del sistema radical, con lo que incrementan sus poblaciones e impactan positivamente en la sanidad y vigor de la planta (Gamalero *et al.*, 2004; Sugden *et al.*, 2004; Wardle *et al.*, 2004; Berg, 2009). Además de la alteración de los exudados radicales, los microorganismos juegan un papel importante en la rizósfera durante el proceso de formación de los agregados del suelo, en el mejoramiento de la estructura del suelo, el ciclado y la disponibilidad de nutrimentos necesarios para las plantas y en los ciclos biogeoquímicos (Hodge *et al.*, 2001; Sugden *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2007).

5.6. Interacción molecular planta-microorganismos

Las plantas en general constituyen excelentes hábitats para la proliferación de microorganismos, particularmente las raíces representan un lugar óptimo para la actividad microbiana, debido a que el sistema radical se desarrolla en un medio cuya humedad es comúnmente poco variable y con altas concentraciones de nutrientes, por lo que constituyen un ambiente ideal para la actividad de las diferentes comunidades microbianas tanto de acción benéfica como patógena. Tales comunidades proliferan debido a la presencia de los exudados radicales, formados por azúcares, mucigel, ácidos orgánicos y aminoácidos, componentes que pueden conformar hasta un 40 % de los fotosintatos de la planta (Song *et al.*, 2007; Rives *et al.*, 2007), la presencia de estos exudados radicales modifican la composición del suelo en la periferia de la raíz creando un medio selectivo para la existencia de grandes poblaciones microbianas heterótrofas, las cuales establecen con la planta

diferentes interacciones de tipo benéfico, patogénico y neutral (Rives *et al.*, 2007; Berg, 2009; Bever *et al.*, 2009).

La base fisiológica y bioquímica de los procesos de resistencia generados por las plantas ante el ataque de patógenos, como hongos y bacterias, está relacionada con la biosíntesis de metabolitos secundarios implicados durante la etapa infecciosa (Vivanco *et al.*, 2005). Diversos cambios químicos ocurren en las plantas después de iniciada una infección, y algunos de estos cambios se han asociado con la expresión de un mecanismo de defensa, caracterizado por la síntesis de sustancias llamadas fitoalexinas (García y Pérez, 2003; Vivanco *et al.*, 2005). Las reacciones de defensa de las plantas tienen una particular diversidad bioquímica, cualidad que tiene poca similitud con otros organismos. De hecho, la capacidad de síntesis bioquímica de las plantas es única (García y Pérez, 2003; Vivanco *et al.*, 2005; Rudrappa *et al.*, 2007).

Para los organismos patógenos, en 1905, Marshall Ward postuló que los “anticuerpos” y las toxinas producidas por la planta desempeñaban una función importante para frenar el proceso infeccioso. Estos compuestos defensivos podían encontrarse preformados antes de la infección o sintetizarse en respuesta a la misma. En 1941, Müller y Börger refinaron la concepción de Ward, designando el nombre de fitoalexinas a los compuestos químicos sintetizados por la planta en respuesta a una invasión microbiana (Kuc, 1995; García y Pérez, 2003; Vivanco *et al.*, 2005). La síntesis de fitoalexinas ocurre por medio de dos sistemas metabólicos: 1. Interacción de un organismo hospedero (planta) con un huésped (patógeno) y, 2. Inhibición del patógeno (García y Pérez, 2003).

La primera fitoalexina reportada, fue aislada y caracterizada en 1960 por Cruickshank y Perrin (Kuc, 1995). Al compuesto aislado, un isoflavonoide del grupo de los pterocarpanos, se le denominó pisantina, el cual fue aislado de vainas de chícharo (*Pisum sativum*), posteriormente se identificaron otras fitoalexinas como la faseolina en frijol y gliceolina en soya. Otras fitoalexinas han sido detectadas en plantas de zanahoria, papa y orquídeas (García y Pérez, 2003; Vivanco *et al.*, 2005). Las

fitoalexinas constituyen un grupo químicamente heterogéneo de varias clases de productos naturales. Se han identificado cerca de 150 metabolitos distribuidos dentro del grupo de los isoflavonoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, poliacetilenos, dihidrofenantrenos, estilbenos y otros tipos de sustancias (García y Pérez, 2003; Vivanco *et al.*, 2005; Rudrappa *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2008; Wissuwa *et al.*, 2009).

Las fitoalexinas son consideradas compuestos antimicrobiales de bajo peso molecular producidas por las plantas ante el ataque de un patógeno, por agentes químicos, daño mecánico o estrés. Estas moléculas son sintetizadas en las células sanas adyacentes a las células dañadas y se acumulan tanto en tejidos necróticos resistentes como susceptibles, es decir, se producen restringidamente en un sitio alrededor del lugar donde ocurrió el daño o infección (García y Pérez, 2003).

Además de las fitoalexinas, existe un extenso grupo de metabolitos secundarios, presentes en concentraciones variables, en todos los tejidos vegetales, cuya función primordial se asocia a la defensa contra invasiones microbianas. A diferencia de las fitoalexinas, estos compuestos se caracterizan por su estado permanente, cuyo propósito es servir de barrera inicial a la propagación de bacterias u hongos dentro de los tejidos de la planta, ejerciendo una presión selectiva sobre los patógenos potenciales. Este proceso de resistencia se da por la diversidad química de los productos naturales generados en las plantas. La función primordial de los metabolitos secundarios no es necesariamente antibacteriana o antifúngica, también actúan como inhibidores de la germinación de esporas, entre otras (García y Pérez, 2003; Vivanco *et al.*, 2005).

5.6.1. Formas de nutrición de los microorganismos patógenos

Como parásitos, los fitopatógenos están obligados a obtener los nutrientes de su hospedante, por lo cual necesitan invadir al tejido para eventualmente reproducirse. Además, necesitan evadir o contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta. Aquellos patógenos capaces de desarrollarse y reproducirse sólo en tejidos de

hospedantes vivos son llamados biotróficos, estos patógenos también conocidos como parásitos obligados, necesitan mantener la célula hospedante viva y emplean para ello mecanismos de invasión sutiles. Ejemplo de ello son los apresorios de algunos hongos, estructuras de penetración que evitan un daño excesivo del tejido vegetal durante las fases iniciales de la patogénesis. Entre los patógenos biotróficos se encuentran virus, nematodos y algunos hongos especializados como las royas (Heath, 2000; Gozzo, 2003; Wissuwa *et al.*, 2009).

Otro grupo de patógenos denominados necrotróficos producen la muerte de las células hospedantes, de donde obtienen los nutrientes a partir del tejido muerto. En este grupo se incluyen la mayoría de los hongos y las bacterias fitopatógenas. Generalmente ambos tipos utilizan diferentes toxinas capaces de degradar el tejido de la planta y facilitar la invasión (García y Pérez, 2003; Gozzo, 2003; Torres *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007).

5.6.2. Activación del sistema molecular defensivo de la planta

Ante la invasión de tejidos vegetales por un microorganismo, la respuesta defensiva inmediata es la muerte celular controlada. Esta respuesta hipersensible de las células vegetales ocurre en aproximadamente 24 horas después que la planta percibe un patógeno potencial. Este proceso comparte características generales con la apoptosis (muerte celular programada). El objetivo de la apoptosis es el aislamiento inmediato del invasor en la zona donde se ha detectado la presencia del patógeno, esta reacción provoca la supresión de nutrientes requeridos por el atacante, aislamiento del área afectada por medio del refuerzo de las paredes celulares con células circundantes y secreción de fitoalexinas en la zona aislada. Tales respuestas defensivas resultan eficaces particularmente cuando la planta es invadida por patógenos biotróficos, ya que este tipo de microorganismos mantienen viva la célula a diferencia de los necrotróficos, los cuales provocan muerte celular mediante la secreción de enzimas digestivas que permiten al invasor aprovechar los nutrientes

liberados del tejido muerto (Vivanco *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2008).

5.6.3. Respuesta defensiva gen por gen

Los mecanismos de defensa vegetal requieren sistemas de percepción de microorganismos invasores que permitan activar los genes implicados en la respuesta defensiva. Este sistema de percepción debe estar capacitado para distinguir los elementos propios de la planta de aquellos que son de origen patógeno. Tal sistema de percepción recibe el nombre de inductores. El primer inductor identificado en plantas fue una proteína de bajo peso molecular denominada monilicolina A, la cual fue detectada y aislada del hongo fitopatógeno *Monilinia fructicola* por Cruickshank y Perrin en 1968. Desde entonces se han identificado numerosos inductores de naturaleza química diversa, cuya función específica es la inducción de genes (resistencia gen por gen) implicados en reacciones de defensa. Este mecanismo de defensa en las plantas, se ha denominado resistencia antihuésped (García y Pérez, 2003; Raaijmakers *et al.*, 2006; Rudrappa *et al.*, 2007; Wissuwa *et al.*, 2009).

Los inductores de la síntesis y acumulación de fitoalexinas no sólo provienen de la planta hospedera, sino del patógeno como hongos, bacterias, virus y otros que liberan o producen inductores de diversa naturaleza química como sales inorgánicas, carbohidratos complejos, oligoglucanos, lípidos, ácidos grasos, oligómeros de quitosano, polipéptidos y etileno (García y Pérez, 2003; Vivanco *et al.*, 2005; Rudrappa *et al.*, 2007; Wissuwa *et al.*, 2009). Algunos de ellos son productos de la hidrólisis enzimática de la pared celular de las plantas. El proceso de inducción para la producción de estas sustancias aún no está claro, pero se ha descrito que en varias especies estos inductores, producidos por patógenos, estimulan la transcripción del ARN mensajero del hospedero, el cual codifica la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de las fitoalexinas (Heath, 2000). Además de la infección de un patógeno, también pueden ser inductores de la síntesis de fitoalexinas otros factores

como daño mecánico, choque térmico, estrés, contaminantes y radiación ultravioleta (García y Pérez, 2003).

La inducción de la reacción de defensa de una manera específica ha sido relacionada con las interacciones del tipo raza-cultivar, donde el proceso de reconocimiento del patógeno por parte de la planta está determinado por genes correspondientes y presentes tanto en el patógeno como en la planta. Al respecto, una investigación iniciada en la década de 1940 en el cultivo de lino y la roya *Melampsora lini* dio origen a la hipótesis de gen por gen (Flor, 1971, citado por García y Pérez, 2003), en la cual se consideraba la existencia de genes en la planta que confieren resistencia a una raza específica de un patógeno. Por otro lado, la presencia o ausencia de genes de avirulencia (Avr) en el patógeno le confieren la habilidad para causar o impedir la enfermedad en un cultivar determinado (De Wit, 1997).

Se ha propuesto que los inductores específicos son proteínas codificadas por los genes Avr presentes en el patógeno, capaces de inducir la repuesta de defensa en cultivares que posean los correspondientes genes R de resistencia (Parker y Coleman, 1997). Tal reconocimiento tiene lugar cuando ocurre una interacción entre las proteínas codificadas por los genes R y los correspondientes productos de los genes Avr del patógeno. Esta interacción da origen a una cascada de señales y otras vías de transcripción, que finalmente llevan a la expresión de genes asociados a la defensa (Hammond y Jones 1996, citado por García y Pérez, 2003).

Diversos modelos han sido propuestos con la finalidad de explicar los mecanismos moleculares de reconocimiento basados en los sistemas gen por gen. Los primeros modelos consideraron la interacción entre los productos R con los Avr mediante un receptor transmembranario (codificado por el gen R de la planta) y un ligando (codificado por el gen Avr del patógeno) (Gabriel y Rolfe, 1990, citado por García y Pérez, 2003; Vivanco *et al.*, 2005). Con el aislamiento, clonación y caracterización molecular de varios genes R y genes Avr de diferentes especies de plantas y patógenos (Takken y Joosten, 2000), ha sido posible predecir la estructura,

localización y posibles mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la interacción entre las proteínas de los genes R y Avr (De Wit, 1997; Madriz, 2002; García y Pérez, 2003).

A la fecha se han caracterizado varios genes R y Avr de diferentes especies. La información obtenida es más consistente e indica que la activación de la defensa contra patógenos en plantas, particularmente en los sistemas raza-cultivar, está mediada por la interacción de proteínas sintetizadas por los genes Avr y R siguiendo la hipótesis gen por gen. Esta es la base del reconocimiento y tiene como consecuencia la activación de una cascada de señales que, en consecuencia inducen los mecanismos de defensa (Takken y Joosten, 2000; Raaijmakers *et al.*, 2006.). Sin embargo, los genes R no son responsables directos de la resistencia, pero sí tienen una función determinante durante el proceso de especificidad y reconocimiento, actuando como iniciadores de la respuesta de defensa (De Wit 1997; García y Pérez, 2003).

5.6.4. Respuesta defensiva de reacción hipersensible

En las interacciones raza-cultivar del tipo incompatible, muchas veces ocurre una alteración en el metabolismo de la planta que se manifiesta con la aparición de lesiones locales necróticas en el sitio donde ocurrió el proceso infeccioso, estas lesiones son el resultado de una muerte celular programada o reacción hipersensible (RH). Por otra parte, la reacción hipersensible se encuentra estrechamente relacionada con la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina, así como la producción y acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con la patogénesis o proteínas PR, que se asocian con el fenómeno de resistencia sistémica adquirida (RSA) (Ryals *et al.*, 1996; Ryu *et al.*, 2004).

A pesar de que la RH es un mecanismo sumamente efectivo que genera una reacción de resistencia casi absoluta, aún no existe consenso que defina si la RH es directamente responsable de la resistencia, al restringir de tejido vivo y nutrientes al patógeno, o si más bien, su acción está basada en la acumulación de compuestos dañinos que simultáneamente matan al patógeno y a las células hospedantes (Heath, 2000; García y Pérez, 2003). Sin embargo, cada vez existe más evidencia que señala como el proceso de RH ocurre mediante una necrosis controlada de forma similar a la apoptosis o muerte celular programada (Hogan y Kolter, 2002; Rudrappa *et al.*, 2007).

La respuesta de muerte celular programada (MCP) está mediada por una explosión oxidativa que libera agentes altamente oxidantes como el superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Levine *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 2006). La reacción hipersensible parece ocurrir como un programa suicida activo y organizado, y no como consecuencia de un colapso celular pasivo producido por el ataque del patógeno o por toxinas sintetizadas por el mismo (Gilchrist, 1998). La generación de la MCP está relacionada mediante señales con la activación y coordinación de los otros mecanismos de defensa. Se ha demostrado que el H_2O_2 tiene también una función de señal de difusión implicada en la inducción de otros mecanismos de defensa (Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2006).

5.6.5. Síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis

Las proteínas PR, son un grupo variable de metabolitos que se acumulan en las plantas después y durante el proceso infeccioso del patógeno. Las proteínas PR se identificaron inicialmente en tabaco durante la interacción con el virus del mosaico del tabaco. Estas se caracterizan por su bajo peso molecular, resistencia a las proteasas y por su localización extracelular, las cuales han sido identificadas tanto en especies vegetales dicotiledóneas como en monocotiledóneas. Algunas de las proteínas PR poseen actividades defensivas antimicrobiales específicas, tales como las PR-2 (β -1,3-glucanasas) y PR-3 (quitinasas). La alta expresión de las glucanasas y las quitinasas durante la patogénesis tiene una función importante en la defensa contra

patógenos que contienen β -1,3-glucano y quitina. A pesar de que las proteínas PR como las PR-2 y PR-3 poseen actividad antimicrobiana, aún se desconoce la función que tienen el resto de ellas durante las respuestas de defensa a patógenos y particularmente a patógenos virales (Madriz, 2002; García y Pérez, 2003; Vivanco *et al.*, 2005).

5.6.6. Respuesta de resistencia sistémica

La inoculación localizada de organismos patógenos virulentos y avirulentos capaces de producir lesiones necróticas puede resultar en la inducción local o sistémica de resistencia. En ambos procesos, la planta muestra resistencia local o sistémica a un ataque subsecuente del patógeno (Ryals *et al.*, 1996; Gozzo, 2003; Ryu *et al.*, 2004).

La resistencia sistémica adquirida (RSA) es una respuesta de defensa activa sistémica de amplio espectro que es asociada a una alta expresión de genes PR. En la mayoría de los casos, la RSA es igualmente efectiva contra hongos, bacterias, virus o nematodos (Ryals *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2004). Los primeros estudios para entender al proceso de RSA se realizaron en plantas de tabaco infectadas con virus (Ryals *et al.*, 1996; Gozzo, 2003; Ryu *et al.*, 2004).

La manifestación de RSA en la planta implica la existencia de algún sistema de señales capaces de transmitirse a través de los tejidos vegetales. Las investigaciones realizadas indican que el ácido salicílico (AS) es la molécula que ha mostrado mayores evidencias de estar estrechamente involucrada en las vías de RSA (Ryu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Rudrappa *et al.*, 2007). Ya que generalmente la inducción de RSA se correlaciona con incrementos en la acumulación de AS a nivel local y sistémico (Rudrappa *et al.*, 2007). El AS es un metabolito secundario del grupo de compuestos fenólicos, el cual se encuentra en un gran número de plantas, se caracteriza por presentar un anillo aromático que lleva un grupo hidroxilo y otro funcional. Cualidad que le permite a la planta transportarlo activamente largas distancias vía floema desde el punto inicial de síntesis hacia otras partes de la planta

como un mecanismo de respuesta defensiva ante el ataque de factores bióticos y abióticos (Gozzo, 2003; Yang *et al.*, 2004; Rudrappa *et al.*, 2007).

Otro tipo de resistencia sistémica se desarrolla a partir de la colonización de las raíces de la planta por acción de los microorganismos de la rizósfera, particularmente rizobacterias como *P. fluorescens*, *P. putida*, *Bacillus pumilus*, *Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., entre otras (Song *et al.*, 2007; Weller, 2007; Berg, 2009; De Werra *et al.*, 2009; Wissuwa *et al.*, 2009). Este tipo de resistencia es conocida como resistencia sistémica inducida (RSI) y se caracteriza por estar mediada por vías metabólicas sensibles al ácido jasmónico y al etileno y, ser independiente de la expresión de los genes PR y del ácido salicílico (Gozzo, 2003; Glick, 2005; Rudrappa *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007).

5.7. Importancia de los microorganismos benéficos en la agricultura

Los diversos tipos de microorganismos benéficos 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, descomposición de materia orgánica, entre otras. Tales actividades tienen como resultado un buen efecto nutricional, adecuado nivel hídrico, mejor estructura de los agregados del suelo y menor incidencia y severidad de enfermedades en las raíces (Díaz *et al.*, 2001; Bashan *et al.*, 2002; Pennisi, 2004; Fernández-Herrera *et al.*, 2007; Weller, 2007; Berg, 2009).

La flora y fauna microbiana juegan un papel fundamental en la descomposición de materia orgánica y, con ello promueven el mejoramiento de la fertilidad de los suelos. Los principales grupos de microorganismos que intervienen activamente en esta función son: bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios; cada uno de éstos requieren de un medio ambiente específico para su óptimo desarrollo (Bashan *et al.*, 2002; Fernández-Herrera *et al.*, 2007; Berg, 2009). Sus características

funcionales, la interacción entre ellos, así como su utilización han contribuido favorablemente y de manera importante en el desarrollo de la agricultura ecológica o también llamada agricultura orgánica. Actividad que se caracteriza por no contaminar ni degradar los recursos naturales, ya que aprovecha prácticas de conservación y mejoramiento de la fertilidad del suelo, protegiendo así los recursos naturales e impidiendo la contaminación ambiental al evitar usar productos de síntesis química. En su lugar promueve el aprovechamiento de alternativas de manejo orgánico y biológico como los microorganismos benéficos, cuyas cualidades estimulan el vigor y sanidad de los cultivos agrícolas al actuar como biofertilizantes o agentes de control biológico e impactan positivamente en el mejoramiento de la fertilidad del suelo (Diedhiou *et al.*, 2003; Gamalero *et al.*, 2004; Sugden *et al.*, 2004; Weller, 2007; Ryan *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2007).

La rizósfera es un hábitat altamente favorable para la presencia de diversos tipos de microorganismos como bacterias, hongos, algas, entre otros. Aunque, algunos géneros de estos microorganismos llegan a convertirse en enfermedades de significativa importancia agronómica. Otros son altamente benéficos tal y como sucede con aquellos que fijan nitrógeno atmosférico, los que actúan como control biológico, o los que promueven el crecimiento, tales como las rizobacterias y los hongos formadores de micorriza arbuscular (Vázquez *et al.*, 2000; Diedhiou *et al.*, 2003; Xavier y Germida, 2003; Pennisi, 2004; Bais *et al.*, 2006; Bever *et al.*, 2009).

5.7.1. Cualidades de las rizobacterias

Las principales actividades benéficas de rizobacterias PGPR (por sus siglas en inglés: plant growth promoting rhizobacteria) sobre el desarrollo de las plantas son: producción de antibióticos, solubilización de fósforo, fijación de nitrógeno atmosférico, síntesis de fitohormonas y producción de sustancias promotoras del crecimiento. Por lo tanto, si estas asociaciones se establecen en los cultivos agrícolas, los usos de fertilizantes y plaguicidas serían considerablemente menores (Vázquez *et al.*, 2000;

Díaz *et al.*, 2001; Bashan *et al.*, 2002; Gamalero *et al.*, 2004; Bhattacharjee *et al.*, 2008).

El creciente uso de las rizobacterias PGPR en los sistemas de producción agrícolas, se debe principalmente a su fácil forma de aplicación, ya que pueden ser inoculados sobre la semilla, follaje, raíz o directamente en el suelo, se multiplican en la rizósfera como respuesta a los exudados secretados por la misma, a la cual se unen y colonizan. Estas bacterias pueden beneficiar al hospedero al provocar la promoción del crecimiento vegetal y/o el control biológico de enfermedades. Tales cualidades son el resultado de su agresiva capacidad de colonización del sistema radicular (Bashan *et al.*, 2002; Xavier y Germida, 2003; Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Fernández-Herrera *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008; Santoyo *et al.*, 2010).

5.7.2. Rizobacterias PGPR como promotoras del crecimiento vegetal

Las rizobacterias denominadas PGPR pueden promover el crecimiento directa o indirectamente. La influencia directa incluye producción de factores de crecimiento (vitaminas y aminoácidos); fitohormonas como giberelinas, citocininas y auxinas como el ácido indolacético; la solubilización y liberación de fosfatos y micronutrientes; la fijación no simbiótica de nitrógeno y la estimulación de componentes de resistencia a enfermedades (Vázquez *et al.*, 2000; Bashan *et al.*, 2002; Gamalero *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2008).

La inducción del crecimiento de manera indirecta ocurre por medio de la alteración del ambiente y ecología de la raíz. Actúan como agentes de biocontrol liberando sustancias con actividad antibiótica que provocan la muerte de otras bacterias y hongos fitopatógenos. También compiten con agentes deletéreos y metabolizan productos tóxicos presentes en suelo o agua, a este proceso se le ha denominado biorremediación (Bashan *et al.*, 2002; Xavier y Germida, 2003; Berg, 2009; De Werra *et al.*, 2009).

5.7.3. Rizobacterias PGPR como agentes de control biológico

Una cualidad destacada que manifiestan algunas especies de rizobacterias es su capacidad de incrementar y producir metabolitos como salicilatos, ácido cianhídrico, antibióticos, enzimas extracelulares, fitoalexinas y sideróforos. Todos ellos se han relacionado como sustancias de control biológico para organismos perjudiciales a las plantas. Diferentes tipos de metabolitos como pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, piocianina, bacteriocinas y sideróforos, ya han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, el caso de sideróforos ha tomado un interés muy particular debido a la forma en la cual logran el biocontrol de organismos patogénicos. Diferentes tipos de sideróforos como piochelin, cepabactin, ornibactin, cepaciachelin, pyocyanin, pseudobactina, azotobactina, bacillibactina, entre otros, son sustancias extracelulares de bajo peso molecular capaces de convertir óxidos férricos a una forma asimilable para las raíces. Este proceso en sí consiste en capturar al Fe^{3+} y transportarlo ya transformado al sistema radical, lo cual evita que otros microorganismos asimilen el hierro disponible en el suelo, lo que impide que estos proliferen (Vázquez *et al.*, 2000; Bashan *et al.*, 2002; Scherwinski *et al.*, 2008; Berg, 2009; De Werra *et al.*, 2009; Santoyo *et al.*, 2010).

5.7.4. Géneros importantes de rizobacterias PGPR

Dentro del grupo de rizobacterias consideradas PGPR se incluyen géneros con la capacidad de promover el crecimiento y desarrollo vegetal, tales como: *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Clostridium*, *Metanobacterium*, *Agrobacterium*, *Klebsiella*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Acetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* (Vázquez *et al.*, 2000; Bashan *et al.*, 2002; Gamalero *et al.*, 2004; De Werra *et al.*, 2009).

Por otra parte, existen géneros cuyo potencial es muy importante para proteger a las plantas del ataque de patógenos del suelo, estos géneros son: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Enterobacter* y *Serratia* (Vázquez *et al.*, 2000; Bashan *et al.*,

2002; Gamalero *et al.*, 2004; De Werra *et al.*, 2009). Al respecto, Amorim y Melo (2002) reportaron que al evaluar el antagonismo de *Pseudomonas putida* biotipo A (C1-1B), *P. putida* biotipo B (Santa Bárbara), *P. fluorescens* (C2-8C y RA2), *Bacillus subtilis* (OG y RC2) y *Flavobacterium* sp. (CIS/NA) contra *Phytophthora parasitica* y *P. citrophthora*, todas las cepas rizobacterianas lograron inhibir el crecimiento del micelio, con lo que demostraron que estas bacterias son potencialmente útiles como agentes de control biológico.

5.7.5. Enfoque sistémico de la interacción planta-rizobacteria-patógeno

La interacción raíz-rizobacteria-patógeno (RRP) puede ser analizada como un sistema (Figura 3), el cual se caracteriza por la presencia de relaciones físico-biológicas, ocurridas entre el suelo como medio físico (compuesto de minerales, material orgánico, agua y aire en distintas proporciones) con la raíz y los microorganismos como la parte biológica de la interacción. Inicialmente la comunicación físico-biológica de la interacción RRP genera procesos cuya estructura y función se establece a partir de la síntesis de los exudados radicales (subproductos derivados de la fotosíntesis), los cuales atraen a las rizobacterias y patógenos, quienes a su vez los aprovechan con la finalidad de establecerse, reproducirse y efectuar sus actividades metabólicas, que inciden directa o indirectamente en la promoción de crecimiento de las plantas o generar procesos infecciosos que pueden culminar en la muerte de ésta (Berg, 2009).

La influencia directa sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas comprende la producción de factores de crecimiento (vitaminas y aminoácidos) y hormonas como giberelinas, citocininas y auxinas como el ácido indolacético, solubilización y liberación de fosfatos y micronutrientes, fijación no simbiótica de nitrógeno atmosférico y estimulación de componentes bioquímicos de resistencia a enfermedades (Berg, 2009; De Werra *et al.*, 2009). En contraste, la promoción del crecimiento de manera indirecta ocurre por medio de la alteración del ambiente y ecología de la raíz, al actuar como agentes de control biológico de bacterias y hongos fitopatógenos (Figura 3), mediante la liberación de metabolitos como salicilatos, ácido

cianhídrico, antibióticos, enzimas líticas (glucanasas y quitinasas), fitoalexinas y sideróforos (Berg, 2009; Santoyo *et al.*, 2010).

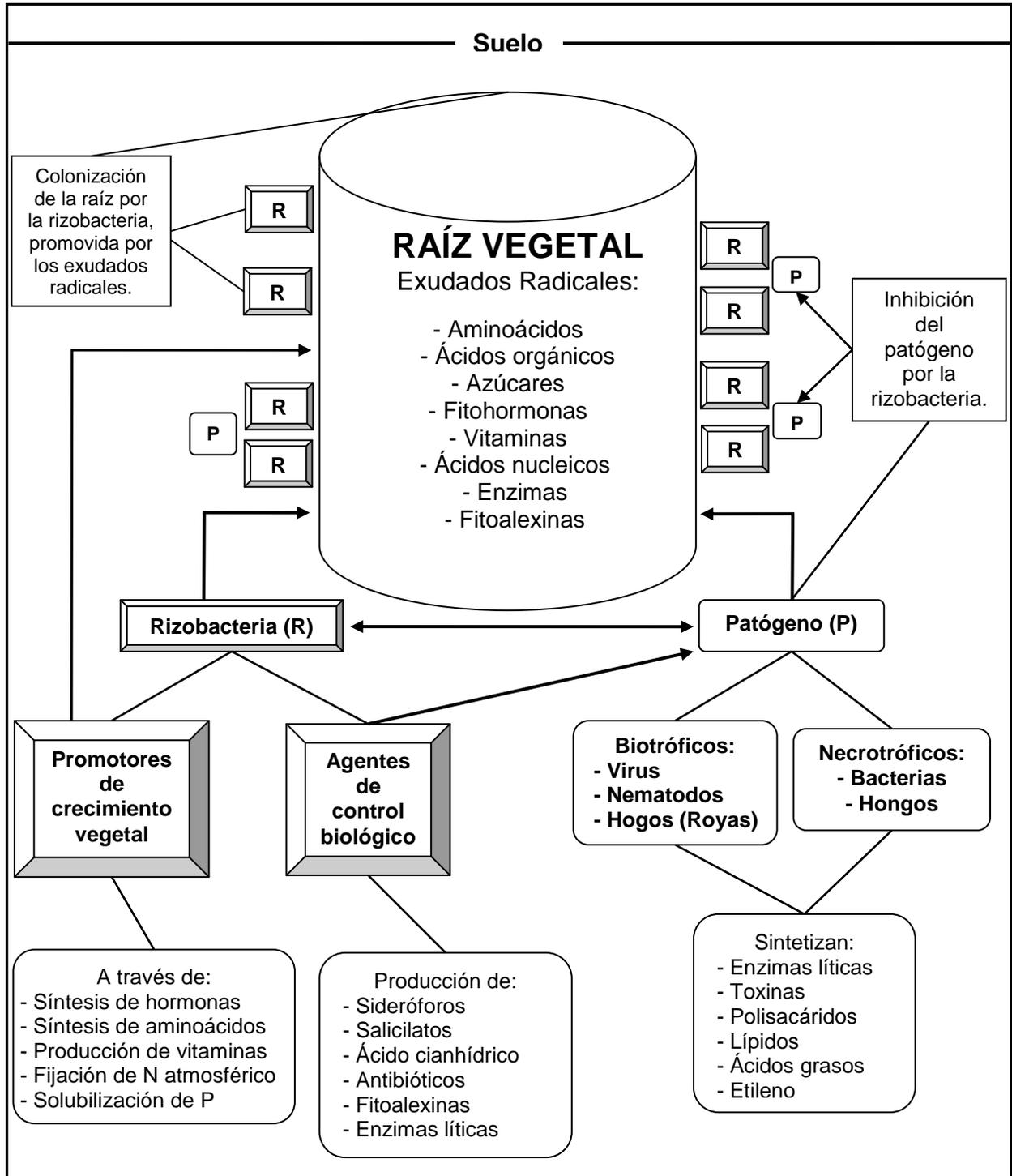


Figura 3. Interacción sistémica planta-rizobacteria-patógeno.

La base fisiológica y bioquímica de los procesos de resistencia generados por las plantas ante el ataque de patógenos, como hongos y bacterias; está relacionada con la biosíntesis de metabolitos secundarios implicados durante la etapa infecciosa. Diversos cambios bioquímicos ocurren en las plantas después de iniciada una infección, y algunos de estos cambios se han asociado con la expresión de un mecanismo de defensa, caracterizado por la síntesis de sustancias llamadas fitoalexinas (Vivanco *et al.*, 2005). Estas moléculas son sintetizadas en las células sanas adyacentes a las células dañadas y se acumulan tanto en tejidos necróticos resistentes como susceptibles, es decir, se producen restringidamente en un sitio alrededor del lugar donde ocurrió el daño o infección (García y Pérez, 2003).

La interacción RRP (Figura 3) se podría identificar como un sistema, en el cual intervienen otros subsistemas estrechamente relacionados por sus interacciones y actividades metabólicas, que promueven el establecimiento de una simbiosis mutualista de beneficio constante entre el suelo, la raíz y la rizobacteria, cualidad que a su vez limita o inhibe el establecimiento del patógeno. Este potencial representa una alternativa de producción en los sistemas agrícolas, ya que coadyuva en la disminución del uso de agroquímicos.

5.7.6. Hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA)

La palabra micorriza proviene del término griego mico que significa hongo y del vocablo latín *rhiza* que significa raíz. La mayoría de las plantas terrestres establecen en sus raíces asociaciones micorrízicas, siendo la del tipo arbuscular, la simbiosis más extendida sobre el planeta, no sólo por el número de plantas hospederas que son capaces de colonizar, sino también por su amplia distribución geográfica (Vázquez *et al.*, 2000; Pennisi, 2004; Kiers y Van Der Heijden, 2006; Bever *et al.*, 2009).

La asociación micorrízica arbuscular se encuentra en más de 90 % de las especies vegetales. Su abundancia e influencia en la nutrición y crecimiento de las plantas hospederas es de gran trascendencia fisiológica y ecológica para el buen

funcionamiento y estabilidad vegetal. Además, la simbiosis confiere mayor resistencia al estrés hídrico y a los patógenos del suelo, coadyuva en el incremento del volumen radical y solubilización de fósforo. Para garantizar el establecimiento de la simbiosis con la planta, los HMA requieren ser inoculados directamente al sistema radicular (Vázquez *et al.*, 2000; Hodge *et al.*, 2001; Pennisi, 2004; Kiers y Van Der Heijden, 2006; Vogelsang *et al.*, 2006; Bever *et al.*, 2009).

5.7.7. Clasificación, estructura y función de los HMA

Los HMA se han clasificado dentro del orden de los *Glomeromycota*, al cual pertenecen los subordenes Gigasporineae y *Glominae*, el primero esta constituido por la familia Gigasporaceae, en esta familia se sitúan los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* con 6 y 19 especies, respectivamente. El suborden Glominae, posee dos familias: 1. *Glomaceae*, formada por los géneros *Glomus* y *Sclerocystis* con 68 y 9 especies, respectivamente; y 2. *Acaulosporaceae*, constituida por los géneros *Acaulospora* y *Entrophospora* con 22 y 3 especies, respectivamente (Morton y Benny, 1990 citados por Díaz, 1998; Wang y Qiu, 2006; Bever *et al.*, 2009; Lambers *et al.*, 2009).

Los hongos micorrizógenos arbusculares se propagan a través de unas estructuras denominadas esporas, las cuales son resistentes a condiciones adversas, su principal función es garantizar la diseminación y preservación de la especie. Las esporas vivas en el suelo pueden incluso no funcionar como propágulos, ya que los diferentes componentes del suelo pueden mantener a las esporas en forma quiescente o pueden encontrarse en estado natural de dormancia, cualidad que les confiere la capacidad de tolerar períodos largos en condiciones adversas (Díaz, 1998; Hodge *et al.*, 2001; Pennisi, 2004; Lambers *et al.*, 2009).

Las estructuras características que el hongo micorrizógeno forma dentro de las raíces, son arbusculos y vesículas. Los arbusculos funcionan como sitios de intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta, estas estructuras son los puntos de máxima

interacción hospedante-simbionte. Por otra parte, las vesículas generalmente son de forma ovoide, llenas de lípidos, lo cual les confiere la característica de órganos de almacenamiento de energía cuando se forman las vesículas, las que suelen estar dentro o fuera de las células corticales de la raíz. Otra cualidad sobresaliente de los hongos micorrizógenos arbusculares, es su capacidad de generar una extensa red de hifas o micelio en el suelo, la cual se encuentra unida al sistema radical de la planta hospedante, dicha red confiere una mayor capacidad a las raíces para explorar y absorber nutrimentos del suelo como P, N, Zn, Ca, Cu, Mg, entre otros, los cuales posteriormente se traslocan dentro del tejido vegetal, promoviendo de esta forma el crecimiento de la planta (Pennisi, 2004; Vogelsang *et al.*, 2006; Wang y Qiu, 2006; Lambers *et al.*, 2009).

5.7.8. Efecto de los HMA en la nutrición mineral de las plantas

Los hongos micorrizógenos arbusculares desempeñan un papel determinante en la nutrición vegetal, ya que tienen la capacidad de regular y facilitar los flujos de nutrimentos del suelo a la planta. Estos aportes nutrimentales proporcionan energía al componente biótico del suelo, cuya actividad es crucial para la formación de las estructuras físicas y balances químicos de suelo, procesos que coadyuvan en el crecimiento y desarrollo de las raíces y de la planta en general, además de mejorar la fertilidad del suelo (Wang y Qiu, 2006; Uroz *et al.*, 2007; Berg, 2009).

Los HMA desarrollan un sistema de transferencia *in vivo* de dos vías, llevando nutrimentos minerales del suelo a la planta y compuestos orgánicos de la planta al suelo. Tal proceso de transferencia es posible a través de las estructuras miceliales o hifas, las cuales logran superar las zonas donde se han agotado los nutrimentos y agua, alcanzando lugares en donde las raíces por sí mismas no podrían llegar, de esta forma los HMA contribuyen al mejoramiento de la nutrición y por consiguiente, al crecimiento de la planta (González-Chávez y Ferrera-Cerrato, 2000; Gamalero *et al.*, 2004; Uroz *et al.*, 2007).

5.7.9. Influencia de la inoculación de PGPR y HMA en plantas de interés agrícola

El uso de microorganismos benéficos como las PGPR y los HMA con la finalidad de mejorar la disponibilidad de nutrientes y sanidad para las plantas, es una práctica que cada vez adquiere mayor interés e importancia en los sistemas de producción de cultivos como maíz, tomate, trigo, cítricos, café, papayo, entre otros. Hasta ahora, los beneficios y rendimientos obtenidos por la inoculación de este tipo de microorganismos han sido muy variables, pero prometedores. Su incorporación en los sistemas de producción pueden reducir considerablemente la utilización de agroquímicos, lo que coadyuva a la reducción del deterioro ecológico y permite mejorar la estructura y fertilidad del suelo (Vázquez *et al.*, 2000; Whipps, 2001; Xavier y Germida, 2003; Gamalero *et al.*, 2004; Sugden *et al.*, 2004; Fernández-Herrera *et al.*, 2007; Berg, 2009; Lambers *et al.*, 2009).

Al respecto, González-Chávez y Ferrera-Cerrato (2000) mencionan que la inoculación de *Glomus* sp., en plantas de naranjo agrio promovió el incremento del área foliar, peso seco y volumen radical en comparación con las plantas testigo. Estos autores resaltan la importancia de la simbiosis establecida, la cual repercute positivamente en la obtención de plantas saludables, en menor tiempo y con el desarrollo adecuado para ser injertadas. Robles y Barea (2004) al evaluar la inoculación dual de rizobacterias y *Glomus intraradices* en plantas de maíz, señalan que las plantas respondieron positivamente, y lograron incrementos en altura y producción de biomasa vegetal hasta en 6 % respecto a las plantas testigo. Resultados similares fueron indicados por Terry *et al.* (2002), al señalar que la inoculación combinada de *Azotobacter chroococcum* con *Glomus clarum*, promovieron un mejor desarrollo y rendimiento en los cultivos de tomate, lechuga y frijol, con manejo de producción organopónica, esta asociación microbiana fue hasta un 10 % mejor que el testigo.

El potencial sinérgico desarrollado entre las PGPR y los HMA, es debido a que ambos microorganismos se encuentran estrechamente asociados con las raíces de la planta. Al respecto Vázquez *et al.* (2000), en un estudio realizado en la rizósfera de plantas

de maíz, encontraron que la inoculación y posterior colonización de HMA (*Glomus deserticola*) en el sistema radical, promovió un incremento del 8 % en las poblaciones de *Azospirillum* spp. A su vez, la inoculación dual de estos microorganismos incrementó significativamente la actividad enzimática y el crecimiento del área foliar y raíces hasta en un 5 %.

En otra investigación realizada en plantas de tomate, el efecto de la inoculación dual de HMA y *Azospirillum brasilense* fue favorable, ya que ambos microorganismos promovieron incrementos de hasta 10 % en peso seco, área foliar y rendimiento. Esta investigación resalta la capacidad sinérgica desarrollada por ambos tipos de microorganismos, la cual se reflejó en el vigor de las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas (Velasco *et al.*, 2001).

6. Literatura citada

- Agustí, M. 2003. Citricultura. Segunda edición. Mundi-Prensa. Madrid, España. 416 p.
- Altieri, M. A. 2002. Agroecology: The science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 93(1-3): 1-24.
- Amorim, E. P. R. e I. S. Melo. 2002. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24(2): 565-568.
- Amorós C., M. 2003. Producción de Agrios. Tercera edición. Mundi-Prensa. Madrid, España. 345 p.
- Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy and J. M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 234-266.
- Barea, J. M., M. J. Pozo, R. Azcón y C. Azcón-Aguilar. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56(417): 1761-1778.
- Bashan, Y., J. P. Hernández, L. A. Leyva and M. Bacilio. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 35(5): 359-368.
- Berg, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84(1): 11-18.
- Bever, J. D., S. C. Richardson, B. M. Lawrence, J. Holmes and M. Watson. 2009. Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology Letters* 12(1): 13-21.
- Bhattacharjee, R. B., A. Singh and S. N. Mukhopadhyay. 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: Prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80(2): 199-209.
- Castro-Sowinski, S., Y. Herschkovitz, Y. Okon and E. Jurkevitch. 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 276(1): 1-11.
- Chiavenato, I. 1997. Teoría de sistemas In: Introducción a la Teoría General de la Administración. Cuarta edición. McGraw-Hill. Bogotá, Colombia. pp. 725-761.

- Choi, O., J. Kim, J. G. Kim, Y. Jeong, J. S. Moon, C. Seuk-Park and I. Hwang. 2008. Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. *Plant Physiology* 146(2): 657-668.
- Conway, G. R. 1985. Agroecosystem analysis. *Agricultural Administration* 20(1): 31-55.
- Conway, G. R. 1987. The properties of agroecosystems. *Agricultural Systems* 24(2): 95-117.
- Conway, G. R. and E. B. Barbier. 1990. *After the Green Revolution: Sustainable Agriculture for Development*. Earthscan Publications Ltd. London, England. pp. 162-193.
- Curti-Díaz, S. A., X. Loredó-Salazar, U. Díaz-Zorrilla, J. A. Sandoval R. y J. Hernández H. 2000. Tecnología para producir limón Persa. Libro Técnico No. 8. INIFAP-CIRGOC SAGAR. Campo Experimental Ixtacuaco. Veracruz, México. 144 p.
- De Werra, P., M. Péchy-Tarr, C. Keel and M. Maurhofer. 2009. Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Applied Environmental Microbiology* 75(12): 4162-4174.
- De Wit, P. J. G. M. 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: A key role for recognition. *Plant Science* 2(12): 452-458.
- Díaz Vargas, P. 1998. Biofertilización del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) con bacterias promotoras de crecimiento, micorriza arbuscular y vermicomposta. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 119 p.
- Díaz V., P., R. Ferrera-Cerrato, J. J. Almaraz-Suárez y G. Alcántar González. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra Latinoamericana* 19(4): 327-335.
- Diedhiou, P. M., J. Hallmann, E. C. Oerke and H. W. Dehne. 2003. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. *Mycorrhiza* 13(4): 199-204.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2009. Frutos cítricos frescos y elaborados. Estadísticas anuales. <http://.faostat.fao.org> (Consulta diciembre 2010).
- Fernández-Herrera, E., M. Acosta-Ramos, F. Ponce-González y V. Manuel-Pinto. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(1): 35-42.

- Gallardo L, F. 2002. Los agroecosistemas de la subprovincia llanura costera Veracruzana. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Veracruz, México. pp. 1-25.
- Gamalero, E., A. Trotta, N. Massa, A. Copetta, M. G. Martinotti and G. Berta. 2004. Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza* 14(3): 185-192.
- García Mateos, R. y R. Pérez Leal. 2003. Fitoalexinas: Mecanismos de defensa de las plantas. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 9(1): 5-10.
- Gilchrist, D. G. 1998. Programmed cell death in plant disease: The purpose and promise of cellular suicide. *Annual Review of Phytopathology* 36: 393-414.
- Glick, B. R. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters* 251(1): 1-7.
- Gliessman, S. R. 2002. Agroecología: Procesos Ecológicos en Agricultura Sostenible. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 359 p.
- González-Chávez, M. C. y R. Ferrera-Cerrato. 2000. Roca fosfórica y *Glomus* sp. en el crecimiento de naranjo agrio. *Terra Latinoamericana* 18(4): 361-367.
- Gozzo, F. 2003. Systemic acquired resistance in crop protection: From nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(16): 4487-4503.
- Granados S., D. y G. F. López R. 1996. Agroecología. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 420 p.
- Hart, R. D. 1985. Conceptos Básicos sobre Agroecosistemas. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. pp. 33-75.
- Heath, M. C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44(3): 321-334.
- Hernández X., E. 1977. El agroecosistema concepto central en el análisis de la enseñanza, la investigación y la educación agrícola en México. En: Hernández X., E. (ed.) *Agroecosistemas de México: Contribuciones a la Enseñanza, Investigación y Divulgación Agrícola*. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 559 p.
- Hernández X., E. 1987. Los pastizales Mexicanos. *Revista de Geografía Agrícola* 2: 445-450.

- Hodge, A., C. D. Campbell and A. H. Fitter. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413: 297-299.
- Hogan, D. A. and R. Kolter. 2002. *Pseudomonas candida* interactions: An ecological role for virulence factors. *Science* 296(5576): 2229-2232.
- Javier-Alva, J. y L. Mattos. 2006. Nuevo método para aislar *Phytophthora parasitica* Dastur de raicillas de limonero patrón Rugoso *Citrus jambhiri* Lush. bajo riego por aspersión. *Universalía* 11(1): 23-35.
- Jones, D. L., A. Hodge and Y. Kuzyakov. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* 163(3): 459-480.
- Jones, J. R. and J. B. Wallace. 1986. Social science in farming systems research. Methodological prospectus on agricultural development. *Weitview special studio in agriculturs science weitview Press-Boulder and London, USA*. 285 p.
- Kiers, E. T. and M. G. A. Van Der Heijden. 2006. Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: exploring hypotheses of evolutionary cooperation. *Ecology* 87(7): 1627-1636.
- Kloepper, J. W., C. M. Ryu and S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94(11): 1259-1266.
- Kuc, J. 1995. Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. *Annual Review Phytopathology* 33: 275-297.
- Lambers, H., C. Mougél, B. Jaillard and P. Hinsinger. 2009. Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: An evolutionary perspective. *Plant and Soil* 321(1-2): 83-115.
- Landeros-Sánchez, C., M. Castañeda-Chávez, R. F. Lango, J. C. Moreno-Seceña y G. M. Palomarez. 2007. Contaminación del Agua por nitrógeno causada por la agricultura en zonas cañeras de Veracruz, México. *Memoria del IX Simposio Internacional y IV Congreso Nacional de Agricultura Sostenible, Veracruz, México*. pp. 371.
- Levine, A., R. Tenhaken, R. Dixon and C. Lamb. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79(4): 583-593.
- Marten, G. G. 1988. Productivity, stability, sustainability, equitability and autonomy as properties for agroecosystem assessment. *Agricultural Systems* 26(4): 291-316.

- Martínez L, B. y F. I. Pugnaire. 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas* 18(2): 44-54.
- Okey, B. W. 1996. Systems approaches and properties, and agroecosystem health. *Journal of Environmental Management* 48(2): 187-199.
- Orozco-Cárdenas, M. L., J. Narvaez-Vásquez and C. A. Ryan. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemic and methyl jasmonate. *The Plant Cell* 13(1): 179-191.
- Parker, J. E. and M. J. Coleman. 1997. Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. *Trends in Biochemical Sciences* 22(8): 291-296.
- Pennisi, E. 2004. The secret life of fungi. *Science* 304(5677): 1620-1622.
- Peña J., H. M. 2003. Eslabonamientos productivos entre la industria y el sector primario, una propuesta de medición: El caso de la cadena naranja-jugo concentrado en México. *Claridades Agropecuarias* 119: 42-49.
- Puente G., A. 2002. La competitividad de la cadena productiva del limón mexicano. *Claridades Agropecuarias* 104: 3-33.
- Raaijmakers, J. M., I. De Bruijn and M. J. D. De Kock. 2006. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(7): 699-710.
- Reichardt, C. S. y T. D. Cook. 2005. Hacia una superación del enfrentamiento entre los métodos cuantitativos y cualitativos. En: Cook, T.D. y Reichardt, C. S. (eds). *Métodos Cualitativos y Cuantitativos en Investigación Evaluativa*. Cuarta edición. Ediciones Morata, Madrid, España. pp. 25-58.
- Reyes, I., L. Alvarez, H. El-Ayoubi y A. Valery. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro* 20(1): 37-48.
- Rives, N., Y. Acebo y A. Hernández. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Perspectivas de su uso en cuba. *Cultivos Tropicales* 28(2): 29-38.
- Robles, C. y J. M. Barea. 2004. Respuesta de la planta y del suelo a inoculación con *Glomus intraradices* y rizobacterias en maíz en cultivo intensivo. *Terra Latinoamericana* 22(1): 59-69.

- Robles G, P. L. 2008. Manual Técnico para la Detección del Huanglongbing de los Cítricos. Dirección General de Sanidad Vegetal, Senasica. SAGARPA, México. 40 p.
- Román, M. P., M. Cambra, J. Juárez, P. Moreno, N. Durán-Vila, F. A. O. Tanaka, E. Alves, E. W. Kitajima, P. T. Yamamoto, R. B. Bassanezi, D. C. Teixeira, W. C. Jesús Junior, A. J. Ayres, N. Gimenes-Fernandes, F. Rabenstein, L. F. Giroto and J. M. Bové. 2004. Sudden death of citrus in Brazil: A graft-transmissible bud union disease. *Plant Disease* 88(5): 453-467.
- Romero R., F. 2004. Manejo Integrado de Plagas: Las Bases, los Conceptos y su Comercialización. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México. 103 p.
- Rudrappa, T., W. J. Quinn, N. R. Stanley-Wall and H. P. Bais. 2007. A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* 226(2): 283-297.
- Ruiz-Rosado, O. 2006. Agroecología: una disciplina que tiende a la transdisciplina. *Interciencia* 31(2): 140-145.
- Ryals, J. A., U. H. Neuenschwander, M. G. Willits, A. Molina, H. Y. Steiner and M. D. Hunt. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1009-1819.
- Ryan, P. R., Y. Dessaux, L. S. Thomashow and D. M. Weller. 2009. Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant and Soil* 321(1-2): 363-383.
- Ryan, R. P., K. Germaine, A. Franks, D. J. Ryan and D. N. Dowling. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278(1): 1-9.
- Ryu, C. M., M. A. Farag, C. H. Hu, M. S. Reddy, J. W. Kloepper and P. W. Paré. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134: 1017-1026.
- Sánchez P., M. 2007. Las Endomicorrizas: Expresión Bioedáfica de Importancia en el Trópico. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 352 p.
- Santoyo, G., E. Valencia-Cantero, M. C. Orozco-Mosqueda, J. J. Peña-Cabriales y R. Farías-Rodríguez. 2010. Papel de los sideróforos en la actividad antagonista de *Pseudomonas fluorescens* zum80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana* 28(1): 53-60.

- Scherwinski, K., R. Grosch and G. Berg. 2008. Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on nontarget microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology* 64(1): 106-116.
- Schiere, J. B., J. Lyklema, J. Schakel and K. G. Rickert. 1999. Evolution of farming systems and system philosophy. *Systems Research and Behavioral Science* 16(4): 375-390.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2009. Anuario estadístico de la producción agrícola. Limón y Naranja. <http://www.limonmexicano.gob.mx/index.php?portal=limon>; <http://www.naranja.gob.mx/index.php?portal=naranja> (Consulta enero 2011).
- Song, M., X. Xu, Q. Hu, Y. Tian, H. Ouyang and C. Zhou. 2007. Interactions of plant species mediated plant competition for inorganic nitrogen with soil microorganisms in an alpine meadow. *Plant and Soil* 297(1-2): 127-137.
- Sugden, A., R. Stone and C. Ash. 2004. Ecology in the underworld. *Science* 304(5677): 1613.
- Takken, F. L. W. and M. H. A. J. Joosten. 2000. Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *European Journal of Plant Pathology* 106(8): 699-713.
- Terry, E., Z. Terán, R. Martínez-Viera y M. A. Pino. 2002. Biofertilizantes, una alternativa promisorio para la producción hortícola en organopónicos. *Cultivos Tropicales* 23(3): 43-46.
- Timmer, L. W., S. T. Garnsey y J. H. Graham. 2002. Plagas y enfermedades de los cítricos. Segunda edición. Mundi-Prensa. Madrid, España. 95 p.
- Torres, M. A., J. D. G. Jones and J. L. Dangl. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141(2): 373-378.
- Trébuil, G. 1990. Principles and steps of method of diagnosis on agrarian system: A case study from Sathing Phra area southern Thailand. In: G. Trébuil (ed.). *Farming Systems Research and Development in Thailand. Illustrated methodological considerations and recent advances*. Haad Yai: Prince of Songkla University. pp. 29-64.
- Uroz, S., C. Calvaruso, M. P. Turpault, J. C. Pierrat, C. Mustin and P. Frey-Klett. 2007. Effect of mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73(9): 3019-3027.

- Vázquez, M. M., S. César, R. Azcón and J. M. Barea. 2000. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on mycorrhizal population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology* 15(3): 261-272.
- Velasco V., J., R. Ferrera-Cerrato y J. J. Almaraz Suárez. 2001. Vermicomposta, micorríza arbuscular y *Azospirillum brasilense* en tomate de cascara. *Terra* 19(3): 241-248.
- Vivanco, J. M., E. Cosio, V. M. Loyola Vargas y H. E. Flores. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia* 341(2): 68-75.
- Vogelsang, K. M., H. L. Reynolds and J. D. Bever. 2006. Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytologist* 172(3): 554-562.
- Wang, B. and Y. L. Qiu. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16(5): 299-363.
- Wardle, D. A., R. D. Bardgett, J. N. Klironomos, H. Setälä, W. H. Van Der Putten and D. H. Wall. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304(5677): 1629-1633.
- Weller, D. M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* 97(2): 250-256.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52(1): 487-511.
- Wissuwa, M., M. Mazzola and C. Picard. 2009. Novel approaches in plant breeding for rhizosphere-related traits. *Plant and Soil* 321(1-2): 409-430.
- Xavier, L. J. C. and J. J. Germida. 2003. Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil Biology and Biochemistry* 35(3): 471-478.
- Yang, S., Q. Zhang, J. Guo, A. O. Charkowski, B. R. Glick, A. M. Ibekwe, D. A. Cooksey and C. H. Yang. 2007. Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Applied and Environmental Microbiology* 73(4): 1079-1088.
- Yang, Y., M. Qi and C. Mei. 2004. Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *The Plant Journal* 40(6): 909-919.

Zavaleta-Mejía, M. E. 2000. Alternativa de manejo de las enfermedades de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17(3): 201-207.

CAPÍTULO I
CAPACIDAD ANTAGÓNICA *IN VITRO* DE RIZOBACTERIAS CONTRA
***Phytophthora parasitica* AGENTE CAUSAL DE GOMOSIS EN CÍTRICOS**

RESUMEN

El aprovechamiento de agentes biológicos antagónicos como las rizobacterias, es una alternativa viable para el control de la gomosis ocasionada por *Phytophthora parasitica*. En este estudio se determinó la capacidad antagónica *in vitro* de siete cepas rizobacterianas del género *Pseudomonas* sobre el crecimiento de *P. parasitica* cepa CPT-12. Se realizaron pruebas de reacción bioquímica, las cuales permitieron la identificación de las cepas FCA-56 y FCA-60 como *Pseudomonas putida*, la cepa FCA-8 como *Pseudomonas fluorescens* y en el caso de las cepas FCA-9, FCA-10, FCA-35 y FCA-52, se determinó que pertenecen al género *Pseudomonas*. Se evaluaron cinco medios de cultivo para identificar el mejor para el desarrollo de las rizobacterias y el patógeno, resultando la combinación de los medios de cultivo B-King con maíz-agar como la mejor condición para la evaluación del antagonismo entre las rizobacterias y *P. parasitica*. La evaluación de la capacidad antagónica se estableció en un diseño experimental completamente al azar con seis repeticiones. Todas las cepas inhibieron el crecimiento de *P. parasitica*, destacando la respuesta de las cepas FCA-56 y FCA-8, en las cuales el patógeno sólo alcanzó un diámetro de 4.10 y 4.12 cm respectivamente, representando 56.84 y 56.63 % de inhibición del crecimiento micelial del patógeno.

Palabras clave: control biológico, antagonismo, rizobacterias, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Phytophthora parasitica*.

IN VITRO ANTAGONISM OF RHIZOBACTERIA AGAINST *Phytophthora parasitica*, CAUSAL AGENT OF GUMMOSIS IN CITRUS

ABSTRACT

The advantage of antagonistic biological agents like rhizobacteria, is a viable alternative for the control of gummosis caused by *Phytophthora parasitica*. In this study, *In vitro* antagonistic capacity was determined in seven rhizobacterial strains of the genus *Pseudomonas*, on the growth of *P. parasitica* strain CPT-12. Biochemical reaction tests allowed the identification of strains FCA-56 and FCA-60 as *Pseudomonas putida*, and strain FCA-8 as *Pseudomonas fluorescens*. It was also determined that strains FCA-9, FCA-10, FCA-35 and FCA-52 belong to the genus *Pseudomonas*. Five culture media were evaluated to identify what is the best for the development of rhizobacteria and the pathogen, and the combination of the media B-King and maize-agar provided the best conditions for the evaluation of the antagonism between the rhizobacteria and *P. parasitica*. Evaluation of antagonistic capacity was conducted within a completely randomized experimental design with six replicates. The seven strains inhibited the growth of *P. parasitica*, but the response to strains FCA-56 and FCA-8 was notable in these assays, the pathogen only reached diameters of 4.10 and 4.12 cm, respectively, representing 56.84 and 56.63 % inhibition of the mycelial growth of the pathogen.

Key words: biological control, antagonism, rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Phytophthora parasitica*.

1.1. Introducción

El cultivo de cítricos constituye la base de una agroindustria de suma importancia para la población y comercio en muchos países de clima tropical y subtropical (FAO, 2009). Por su condición de árboles perennes, los cítricos permanecen en campo durante varios años, por lo que están continuamente expuestos a numerosas plagas como bacterias, hongos, insectos, ácaros, nematodos, virus, viroides y fitoplasmas (Agustí, 2003).

El embate de estos patógenos puede ocasionar la aparición de enfermedades de importancia económica como la gomosis de los cítricos, causada por los oomicetos *Phytophthora parasitica* Breda de Haan y *Phytophthora citrophthora* R.E. Smith & E.H. Smith, siendo *P. parasitica* la especie que provoca daños severos al cultivo (Amorim y Melo, 2002; Javier-Alva y Mattos, 2006). La presencia de este patógeno se caracteriza por el oscurecimiento gradual de la corteza del árbol y posterior agrietamiento, acompañado de secreciones gomosas de coloración café, pudrición de raíz, presencia de follaje amarillento, ramas secas y caída severa de hojas y frutos (Agustí, 2003). Ocasiona un decaimiento generalizado del árbol que provoca su muerte de forma lenta, o incluso puede ocurrir en uno o dos meses cuando el avance de la enfermedad es severo (Javier-Alva y Mattos, 2006).

Generalmente, la prevención y protección de los cítricos contra el ataque de este patógeno se ha realizado mediante prácticas culturales y uso de agroquímicos de acción sistémica o de contacto. Aun cuando el control químico ha atenuado la gomosis, su uso desmedido ha generado problemas de contaminación ambiental y resistencia del patógeno a los fungicidas utilizados en su control. Tal situación ha provocado la búsqueda e implementación de alternativas ecológicamente viables y sustentables para su manejo (Amorim y Melo, 2002).

En la actualidad, el control biológico y la biotecnología agrícola promueven el uso de rizobacterias como una alternativa de manejo ecológico, rentable y capaz de controlar

patógenos. El creciente aprovechamiento en los sistemas de producción agrícola de las rizobacterias *Pseudomonas fluorescens* Migula y *Pseudomonas putida* Trevisan, se debe a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, promover la síntesis de hormonas (Rudrappa *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2009) y actuar como agentes antagónicos a través de la producción de metabolitos como sideróforos, enzimas líticas (glucanasas y quitinasas) y antibióticos (Kloepper *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2009). Además de estas cualidades, su forma de aplicación es sencilla, ya que pueden ser inoculados sobre semilla, follaje, raíz o directamente en el suelo (Páez *et al.*, 2005; Raaijmakers *et al.*, 2009).

Las rizobacterias y los patógenos requieren de un ambiente particular y adecuado para su óptimo crecimiento, cualidad que puede ser proporcionada a través de los componentes del medio de cultivo específico para cada microorganismo. El objetivo del estudio fue determinar la capacidad antagónica *in vitro* de siete cepas de rizobacterias del género *Pseudomonas* como inhibidoras del crecimiento y desarrollo de una cepa de *P. parasitica*. Se planteó como hipótesis que las siete cepas de *Pseudomonas* aisladas de *Citrus volkameriana* inhiben el crecimiento de *P. parasitica* *in vitro*.

1.2. Materiales y métodos

1.2.1. Procedencia y caracterización bioquímica de rizobacterias

Se utilizaron siete cepas rizobacterianas aisladas de la rizósfera del portainjerto *Citrus volkameriana* Tan. & Pasq, de acuerdo a la técnica propuesta por Holguin *et al.* (1996). Las cepas fueron: FCA-8, FCA-9, FCA-10, FCA-35, FCA-52, FCA-56 y FCA-60, proporcionadas por el Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus Xalapa, Universidad Veracruzana. Con la finalidad de establecer el género y especie de las cepas rizobacterianas, se llevó a cabo su caracterización bioquímica de acuerdo a las metodologías propuestas por Schaad *et al.* (2001) y Garrity *et al.* (2005), mediante las pruebas de fluorescencia, sacarosa, oxidasa,

putridión de papa, hipersensibilidad en tabaco, arginina, levana, gelatinasa, reducción de nitratos, pigmento no fluorescente verde, pigmento no fluorescente naranja, sorbitol, arabinosa, etanol, adonitol, crecimiento en medio YS 37 °C y en medio YS 4 °C. Al concluir la caracterización bioquímica, las cepas rizobacterianas se mantuvieron en medio de cultivo B-King (BK) (glicerol (IDQ[®]) 10 mL L⁻¹, peptona (BD-Bioxon[®]) 15 g L⁻¹, MgSO₄ (IDQ[®]) 1 mL L⁻¹, K₂HPO₄ (J.T. Baker[®]) 1.5 g L⁻¹, agar (Merck[®]) 15 g L⁻¹). Cada cepa se colocó por separado en condiciones asépticas mediante una asa de platino en cajas Petri (100 x 20 mm) con 25 mL de medio de cultivo BK, previamente esterilizado en autoclave durante 15 min a 120 °C (Garrity *et al.*, 2005). Para promover el crecimiento, actividad y conservación de las cepas se procedió a incubarlas en una estufa bacteriológica a 25 °C, condiciones en las que se mantuvieron hasta su utilización en la prueba de antagonismo.

1.2.2. Obtención y mantenimiento de *Phytophthora parasitica*

La cepa de *P. parasitica* (CPT-12) aislada de la corteza de limón Persa con síntomas de secreción gomosa, fue identificada y proporcionada por el Dr. Carlos Fredy Ortiz García coordinador del Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. El mantenimiento de la cepa CPT-12 se realizó en caja Petri (100 x 20 mm) con 25 mL del medio de cultivo V8 [jugo V8[®] (Campbell's) 300 mL L⁻¹, CaCO₃ (J.T. Baker[®]) 4 g L⁻¹, agar (Merck[®]) 15 g L⁻¹], esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 120 °C. El crecimiento micelial y conservación de la cepa se efectuó en estufa bacteriológica a 25 °C (Rezusta *et al.*, 2001), condición en la que se mantuvo hasta su utilización en la prueba de antagonismo.

1.2.3. Evaluación de medios de cultivo

Se elaboraron cinco medios de cultivo que favorecieran el crecimiento conjunto de ambos microorganismos. Los medios de cultivo fueron: B-King (BK), V8, maíz-agar (MA) [harina de maíz MASECA[®] 100 g L⁻¹, papa dextrosa agar (BD-Bioxon[®]) 15 g L⁻¹, agar 10 g L⁻¹], BK combinado con V8 (BK+V8) y BK combinado con MA (BK+MA). Los

medios de cultivo V8 y MA son aptos para el crecimiento de *Phytophthora* spp. (Amorim y Melo, 2002; Javier-Alva y Mattos, 2006) y el BK se recomienda para rizobacterias del género *Pseudomonas* en particular para *P. fluorescens* y *P. putida* (Kloepper *et al.*, 2004; Páez *et al.*, 2005).

Se establecieron cuatro cajas Petri por cepa y medio de cultivo, como se describió anteriormente. Para evaluar el crecimiento del patógeno, del cultivo original se tomó un disco de 5 mm de diámetro con presencia de micelio y se colocó en el centro de la caja por medio de un asa de platino. Para las rizobacterias se tomó una muestra de los cultivos previamente elaborados y se realizó un estriado desde el centro hacia uno de los lados de la caja. Las cajas se incubaron en estufa bacteriológica a 25 °C durante 96 h. Para la determinación del crecimiento de las cepas se consideró una escala con cuatro niveles: 1 = Sin crecimiento (0 cm), 2 = Crecimiento ligero (> 0 a 2 cm), 3 = Crecimiento moderado (> 2 a 5 cm) y 4 = Crecimiento abundante (> 5 a 8 cm).

1.2.4. Evaluación de la capacidad antagónica *in vitro*

Para evaluar el efecto antagónico individual de las siete cepas rizobacterianas sobre la cepa CPT-12 de *P. parasitica*, se estableció un diseño experimental completamente al azar con seis repeticiones, con una caja Petri como unidad experimental. En el medio de cultivo BK+MA, se sembró un disco de 5 mm de diámetro con presencia de micelio del patógeno colocado en el centro de cada caja Petri. Transcurridas 48 h. de incubación a 25 °C, se sembraron las cepas rizobacterianas a los lados derecho e izquierdo de la posición del hongo, mediante un estriado lineal de 2 cm de ancho por 9 cm de largo. Las cajas conteniendo ambos tipos de microorganismos se colocaron para su incubación en estufa bacteriológica a 25 °C durante ocho días. Al concluir el período de incubación se observó la lámina de crecimiento de las cepas *Pseudomonas* y de *P. parasitica*. La actividad antagónica se determinó con el diámetro micelial (cm) desarrollado por el patógeno desde el centro de la caja Petri

hacia la periferia. Se consideró como testigo el crecimiento individual de la cepa CPT-12 de *P. parasitica*.

Los datos obtenidos se sometieron al análisis de de varianza con posterior comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) (Rebolledo, 2002).

1.3. Resultados y discusión

1.3.1. Caracterización bioquímica de rizobacterias

De las siete cepas rizobacterianas caracterizadas mediante pruebas bioquímicas (Cuadro 1.1), dos correspondieron a *Pseudomonas putida*, una a *Pseudomonas fluorescens* y las cuatro restantes fueron del género *Pseudomonas*. Las cepas FCA-56 y FCA-60 dieron respuesta positiva en las pruebas fluorescencia, sacarosa, oxidasa, arabinosa, etanol y adonitol, pruebas consideradas específicas para la determinación de la especie *P. putida* (Schaad *et al.*, 2001; Garrity *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2009). La cepa FCA-8 correspondió a la especie *P. fluorescens*, con respuesta positiva a fluorescencia, sacarosa, oxidasa, arginina, reducción de nitratos, sorbitol, arabinosa, etanol, adonitol y crecimiento en medios YS 37 y 4 °C. Diferentes autores señalan a estas pruebas de reacción bioquímica como apropiadas para la caracterización de rizobacterias (Holguin *et al.*, 1996; Garrity *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2009).

La respuesta de las cepas FCA-9, FCA-10, FCA-35 y FCA-52 a las pruebas bioquímicas permitieron determinar su identidad dentro del género *Pseudomonas*, y las excluye como cepas de las especies *P. putida* o *P. fluorescens*, rizobacterias consideradas como promotoras del crecimiento vegetal (Okumoto *et al.*, 2001; Vivekananthan *et al.*, 2004; Rives *et al.*, 2007; Berg, 2009).

En la prueba de hipersensibilidad en tabaco (Cuadro 1.1), la respuesta resultó negativa para todas las cepas rizobacterianas, lo que permitió descartar la presencia

de alguna cepa patógena. Al respecto Rodríguez *et al.* (2008) mencionan que esta prueba efectuada en plantas de tabaco es utilizada para la identificación de microorganismos bacterianos potencialmente patogénicos para las plantas.

Cuadro 1.1. Caracterización bioquímica de siete cepas rizobacterianas aisladas de la rizósfera de *C. volkameriana*.

Prueba	Cepas rizobacterianas						
	FCA-8	FCA-9	FCA-10	FCA-35	FCA-52	FCA-56	FCA-60
Fluorescencia	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	-	+	+	+	+
PP	-	+	-	-	+	-	-
HT	-	-	-	-	-	-	-
Arginina	+	+	+	+	+	-	-
Levana	-	-	-	-	-	-	-
MYS37	+	+	+	+	+	-	-
MYS4	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinasa	-	-	-	-	-	-	-
RN	+	-	-	-	+	-	-
PNFV	-	+	+	-	+	-	-
PNFN	-	-	-	+	-	-	-
Sorbitol	+	+	-	-	+	-	-
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+
Adonitol	+	+	+	+	+	+	+

PP = pudrición de papa; HT = hipersensibilidad en tabaco; MYS37 = crecimiento en medio de cultivo YS 37°C; MYS4 = crecimiento en medio de cultivo YS 4°C; RN = reducción de nitratos; PNFV = pigmento no fluorescente verde; PNFN = pigmento no fluorescente naranja. Reacción positiva (+); Reacción negativa (-).

1.3.2. Evaluación de medios de cultivo

De los cinco medios de cultivo evaluados, los que promovieron crecimiento abundante (5 a 8 cm) en todas las cepas rizobacterianas fueron BK y BK+MA (Cuadro 1.2). Los medios de cultivo V8, MA y BK+MA, fueron los que lograron promover crecimiento abundante del micelio de la cepa CPT-12 (Cuadro 1.2). El crecimiento de cada microorganismo está determinado por los componentes químicos del medio de cultivo. La actividad metabólica involucrada en el crecimiento y desarrollo del microorganismo podrá ser activa o limitada, según el contenido del medio de cultivo, lo que repercute directamente en la proliferación del microorganismo (Okumoto *et al.*, 2001; Steddorn *et al.*, 2002).

Cuadro 1.2. Respuesta de crecimiento de cepas rizobacterianas y de *P. parasitica* en cinco medios de cultivo.

Cepas	Medios de cultivo para crecimiento de:				
	Rizobacteria	Hongo		Rizobacteria-Hongo	
	BK	V8	MA	BK+V8	BK+MA
Rizobacterias					
FCA-8	4	3	3	3	4
FCA-9	4	3	3	3	4
FCA-10	4	3	3	4	4
FCA-35	4	2	2	3	4
FCA-52	4	2	3	3	3
FCA-56	4	3	3	3	4
FCA-60	4	3	3	4	4
<i>Phytophthora parasitica</i>					
CPT-12	1	4	4	3	4

1 = Sin crecimiento (0 cm), 2 = Crecimiento ligero (> 0 a 2 cm), 3 = Crecimiento moderado (> 2 a 5 cm) y 4 = Crecimiento abundante (> 5 a 8 cm).

De las dos combinaciones de medios de cultivo realizadas, BK+MA promovió un mayor crecimiento de las rizobacterias y del patógeno, probablemente debido a que la

mezcla de los componentes que conforma cada medio de cultivo sean los requeridos por ambos tipos de microorganismos para su óptimo desarrollo.

1.3.3. Evaluación de la capacidad antagónica *in vitro*

Con base en el resultado anterior, se utilizó el medio de cultivo BK+MA para realizar la evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* de las siete cepas de *Pseudomonas* spp. sobre la cepa CPT-12 (Cuadro 1.3). Todas las cepas rizobacterianas presentaron actividad antagónica, ya que lograron restringir en mayor o menor medida el crecimiento micelial de la cepa CPT-12. Las cepas FCA-56 (*P. putida*) (Figura 1.1) y FCA-8 (*P. fluorescens*), fueron destacadas, ya que sólo permitieron que el micelio del patógeno alcanzara un diámetro de 4.10 y 4.12 cm respectivamente, lo que representó un 56.84 y 56.63 % de inhibición del crecimiento micelial (Cuadro 1.3). En contraste la cepa FCA-35 mostró la menor capacidad para inhibir al patógeno con 38.95 %.

Cuadro 1.3. Actividad antagónica *in vitro* de siete cepas de *Pseudomonas* spp. sobre la cepa CPT-12 de *P. parasitica* en el medio de cultivo BK+MA.

Cepas	Crecimiento micelial (cm)	Porcentaje de inhibición
<i>Phytophthora parasitica</i>		
CPT-12 (Testigo)	9.50 a*	00.00
Rizobacterias		
FCA-35	5.80 b	38.95
FCA-60	5.18 c	45.47
FCA-9	4.44 d	53.26
FCA-10	4.20 d	55.79
FCA-52	4.18 d	56.00
FCA-8	4.12 d	56.63
FCA-56	4.10 d	56.84

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

Distintos estudios señalan que la capacidad antagónica de las rizobacterias benéficas dependen de su potencial para sintetizar metabolitos como ácido cianhídrico, ácido salicílico, enzimas líticas como glucanasas y quitinasas, y sideróforos (Okumoto *et al.*, 2001; Amorim y Melo, 2002; Kloepper *et al.*, 2004; Rudrappa *et al.*, 2008; Berg, 2009). Estos factores generan condiciones desfavorables para el metabolismo y crecimiento de otro tipo de microorganismo, tal y como ocurrió con la cepa CPT-12 (Figura 1.1), la cual presentó una reducción de más de 50 % de su capacidad de crecimiento micelial al enfrentarse con las cepas FCA-8, FCA-9, FCA-10, FCA-52 y FCA-56.

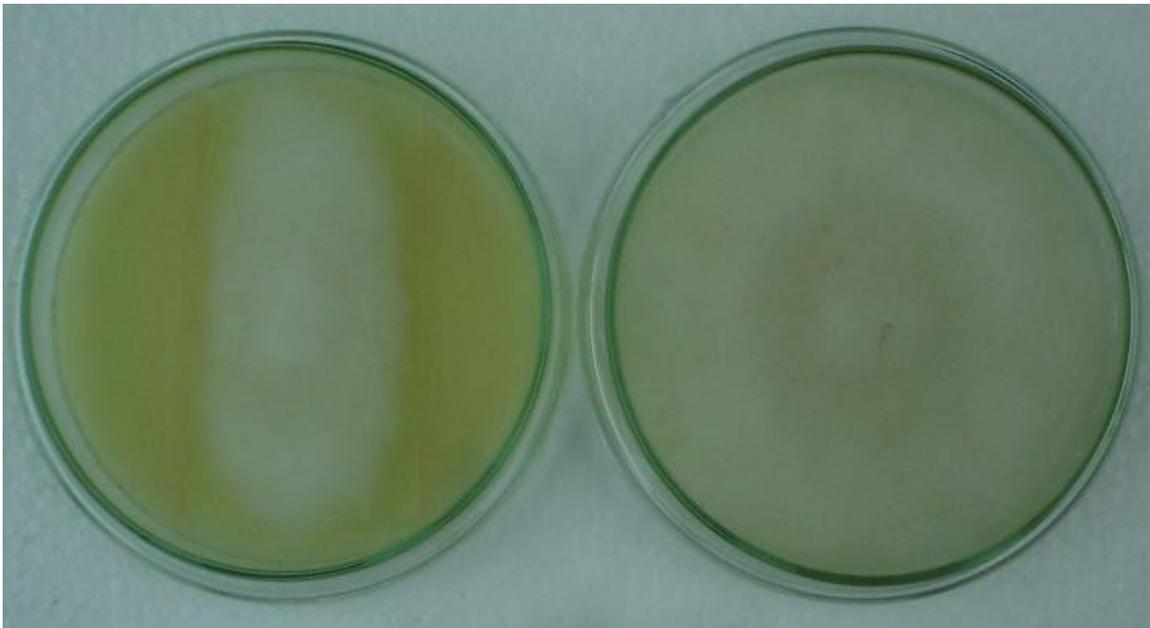


Figura 1.1. A la izquierda se muestra la restricción del crecimiento micelial de la cepa CPT-12 (*P. parasitica*) por la presencia de la cepa FCA-56 (*P. putida*) y a la derecha se observa el crecimiento pleno de CPT-12 *in vitro*.

De acuerdo con lo antes descrito, Lozoya *et al.* (2006), señalan que la supresión de enfermedades a través de agentes antagónicos está directamente relacionada con las interacciones ocurridas entre la planta, el patógeno, el agente de biocontrol y el ambiente. En investigaciones como ésta bajo condiciones controladas, se puede favorecer la actividad metabólica de las cepas rizobacterianas sobre *P. parasitica*. Por ello es importante realizar validaciones bajo condiciones de campo, ya que el control

biológico de enfermedades en los agroecosistemas suele ser menos efectivo y considerablemente variable, respecto a ensayos conducidos en condiciones controladas (Amorim y Melo, 2002).

1.4. Conclusiones

De acuerdo a las pruebas de reacción bioquímica, las siete cepas aisladas de la rizósfera de *C. volkammeriana* pertenecen al género *Pseudomonas*. Una se identificó como *P. fluorescens* (FCA-8) y dos como *P. putida* (FCA-56 y FCA-60).

El medio de cultivo que combinó los medios B-King y maíz-agar, reunió las mejores condiciones para el crecimiento conjunto de las rizobacterias y el patógeno.

Las siete cepas rizobacterianas presentaron actividad antagónica sobre *P. parasitica*, cualidad manifestada por la restricción del crecimiento micelial, destacando por su potencial antagonista las cepas FCA-56 (*P. putida*) y FCA-8 (*P. fluorescens*).

1.5. Literatura citada

- Agustí, M. 2003. Citricultura. Segunda edición. Mundi-Prensa. Madrid, España. 416 p.
- Amorim, E. P. R. e I. S. Melo. 2002. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. Revista Brasileira de Fruticultura 24(2): 565-568.
- Berg, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Applied Microbiology and Biotechnology 84(1): 11-18.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2009. Frutos cítricos frescos y elaborados. Estadísticas anuales. <http://.faostat.fao.org> (Consulta diciembre 2010).
- Garrity, G. M., A. J. Bell and T. Lilburn. 2005. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Second edition. Vol. 2. The Proteobacteria Part B. The Gammaproteobacteria. Springer-Verlag. New York, USA. pp. 323-377.

- Holguin, G., Y. Bashan y R. Ferrera-Cerrato. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos: III. Procedimientos para el aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos y rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas. *Terra* 14(2): 211-227.
- Javier-Alva, J. y L. Mattos. 2006. Nuevo método para aislar *Phytophthora parasitica* Dastur de raicillas de limonero patrón Rugoso *Citrus jambhiri* Lush. bajo riego por aspersión. *Universalía* 11(1): 23-35.
- Kloepper, J. W., C. M. Ryu and S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94(11): 1259-1266.
- Lozoya, S. H., M. H. Coyote-Palma, R. Ferrera-Cerrato y M. E. Lara-Hernández. 2006. Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Agrociencia* 40(4): 491-499.
- Okumoto, S., E. Bustamante y A. Gamboa. 2001. Actividad de cepas de bacterias quitinolíticas antagonistas a *Alternaria solani* *in vitro*. *Manejo Integrado de Plagas* 59: 58-62.
- Páez, M., N. P. Martínez and C. J. Bernal. 2005. Siderophore producing *Pseudomonas* as pathogenic *Rhizoctonia solani* and *Botrytis cinerea* antagonists. *Universitas Scientiarum* 10(1): 65-74.
- Raaijmakers, J. M., T. C. Paulitz, C. Steinberg, C. Alabouvette and Y. Moënne-Loccoz. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 321: 341-361.
- Rebolledo R., H. H. 2002. Manual SAS por computadora: análisis estadístico de datos experimentales. Editorial Trillas. México. 208 p.
- Rezusta, L. A., S. A. Sánchez y T. J. Gil. 2001. Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico. Asociación Española de Micología. *Revista Iberoamericana de Micología* 3: 1-17.
- Richardson, A. E., J. M. Barea, A. M. McNeill and C. Prigent-Combaret. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321(1-2): 305-339.
- Rives, N., Y. Acebo y A. Hernández. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en cuba. Cultivos Tropicales* 28(2): 29-38.
- Rodríguez, M., J. Matehus, A. Gerstl y M. A. Santana. 2008. Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (*Dioscorea alata* L.). *Interciencia* 33(7): 532-536.

- Rudrappa, T., M. L. Biedrzycki and H. P. Bais. 2008. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 64(2): 153-166.
- Ryan, P. R., Y. Dessaux, L. S. Thomashow and D. M. Weller. 2009. Rhizosphere engineering and Management for sustainable agriculture. *Plant and Soil* 321(1-2): 363-383.
- Schaad, N. W., J. B. Jones and W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. The American Phytopathology Society. Third edition. St. Paul, Minnesota, USA. 373 p.
- Steddorn, K., O. Becker and J. A. Menge. 2002. Repetitive Applications of the biocontrol agent *Pseudomonas putida* 06909-rif/nal and effects on populations of *Phytophthora parasitica* in citrus orchards. *Phytopathology* 92(8): 850-856.
- Vivekananthan, R., M. Ravi, A. Ramanathan and R. Samiyappan. 2004. Lytic enzymes induced by *Pseudomonas fluorescens* and other biocontrol organisms mediate defense against the anthracnose pathogen in mango. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(3): 235-244.

CAPÍTULO II
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE RIZOBACTERIAS DEL GÉNERO
Pseudomonas* AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE *Citrus volkameriana

RESUMEN

Debido a la imprecisión de las técnicas de reacción bioquímica utilizadas para la identificación de microorganismos bacterianos, éstas han sido sustituidas o complementadas con pruebas moleculares como la secuenciación, la cual por su precisión en la manipulación del ADN facilita la identificación taxonómica de bacterias. En este estudio se realizó la identificación de tres cepas rizobacterianas promotoras del crecimiento vegetal pertenecientes al género *Pseudomonas*. Se realizó la extracción de ADN total de las cepas previamente identificadas con pruebas bioquímicas como *Pseudomonas fluorescens* (FCA-8) y *Pseudomonas putida* (FCA-56 y FCA-60). La concentración de ADN total obtenido de cada cepa fue 10 µg mL⁻¹. Al utilizar PCR con primers específicos (invitrogen[®]) para el género *Pseudomonas* se obtuvo para las tres cepas la amplificación de un fragmento de ADNr de 750 pb. Los fragmentos generaron secuencias consenso de 315, 365 y 370 nucleótidos para FCA-8, FCA-56 y FCA-60 respectivamente. Para determinar el porcentaje de homología y establecer la identificación de las cepas rizobacterianas, las secuencias consenso se sometieron al análisis comparativo con las secuencias depositadas en el Genbank (NCBI), se obtuvo para las tres cepas una correspondencia del 100 % de similitud con la especie *P. putida*. Por lo que, el análisis molecular corroboró que las cepas FCA-56 y FCA-60 pertenecen a la especie *P. putida*; sin embargo, la cepa FCA-8 identificada bioquímicamente como *P. fluorescens* resultó corresponder a la especie *P. putida*. La técnica molecular de PCR y secuenciación en comparación con los métodos tradicionales de identificación microbiológica, ofrecen precisión, sensibilidad y confiabilidad en la manipulación del ADN, agilizando el proceso de diagnóstico e identificación de microorganismos.

Palabras clave: *Pseudomonas putida*, rizobacterias, PCR, ADNr 16S.

**MOLECULAR IDENTIFICATION OF RHIZOBACTERIA OF THE GENUS
Pseudomonas ISOLATED FROM THE RHIZOSPHERE OF *Citrus volkameriana***

ABSTRACT

Since biochemical techniques are not reliable to identify bacterial organisms, they have been replaced or supplemented with molecular techniques such as sequencing, because facilitates the taxonomic identification of bacteria, due to its precision in the manipulation of DNA. In this study, three plant growth-promoting rhizobacteria strains belonging to the genus *Pseudomonas* were identified. Total DNA was extracted from strains previously identified by biochemical tests as *Pseudomonas fluorescens* (FCA-8) and *Pseudomonas putida* (FCA-56 and FCA-60). The concentration of total DNA obtained from each strain was 10 g mL⁻¹. PCR, using specific primers for the genus *Pseudomonas*, amplified a 750 bp fragment of rDNA for each of the three strains. Consensus sequences generated fragments of 315, 365 and 370 nucleotides for FCA-8, FCA-56 and FCA-60, respectively. To determine the percentage of homology, and establish the identification of rhizobacterial strains, consensus sequences were subjected to comparative analysis with sequences deposited in Genbank (NCBI). A 100 % similarity was obtained with the species *P. putida* for all three strains, confirming that strains FCA-8, FCA-56 and FCA-60 belong to the species *P. putida*, even though the FCA-8 strain had previously been biochemically identified as *P. fluorescens*. Compared to traditional methods of microbiological identification, molecular techniques such as PCR and sequencing provide precision, sensitivity and reliability of DNA manipulation, and can expedite the accurate diagnosis and identification of microorganisms.

Key words: *Pseudomonas putida*, rhizobacteria, PCR, 16S rDNA.

2.1. Introducción

La presencia de microorganismos benéficos que habitan en la rizósfera, resulta de vital importancia para las plantas, ya que son capaces de estimular el crecimiento y desarrollo vegetal, así como ofrecer un sistema de bioprotección contra algunas enfermedades. Además contribuyen a mejorar las características físicas y químicas del suelo. Entre los microorganismos más importantes encontramos a las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Richardson *et al.*, 2009).

El término rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, también conocidas por sus siglas en inglés como PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), fue propuesto para describir a las bacterias que habitan la rizósfera de las plantas con la cualidad para fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fósforo, promover la síntesis de hormonas (Kloepper *et al.*, 2004) y actuar como agentes antagónicos a través de la producción de metabolitos como sideróforos, salicilatos, antibióticos y enzimas líticas como glucanasas y quitinasa (Richardson *et al.*, 2009). Estas cualidades inciden directa e indirectamente en las plantas, contribuyendo en la mejora de su estado nutricional y sanidad.

Actualmente un amplio número de géneros bacterianos están considerados dentro de las PGPR, tales como: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Azotobacter* y *Serratia*, entre otros. El género *Pseudomonas* fue descrito por primera vez en 1894 por W. Migula, literalmente significa “falsa unidad” del griego *pseudo* (falso) y *monas* (una unidad). Este género engloba microorganismos saprófitos de vida libre en suelos, materia orgánica en descomposición, ecosistemas acuáticos y asociados a plantas y animales; en el caso de las plantas pueden estar presentes como agentes benéficos y patógenos (Gravel *et al.*, 2007).

Diferentes especies de *Pseudomonas*, particularmente *P. putida* Trevisan y *P. fluorescens* Migula (Gravel *et al.*, 2007), se encuentran entre las más estudiadas,

debido a su cualidad para fijar nitrógeno atmosférico, degradar compuestos aromáticos, producir reguladores del crecimiento vegetal y otros metabolitos con efecto antagónico como sideróforos, antibióticos, entre otros (Richardson *et al.*, 2009).

Tradicionalmente para la identificación y caracterización de cepas bacterianas del género *Pseudomonas* se han utilizado técnicas microbiológicas de reacción bioquímica. Sin embargo, debido a la variabilidad de respuestas obtenidas en este tipo de pruebas y la diversidad de especies agrupadas en *Pseudomonas*, se han implementado técnicas de biología molecular para la caracterización del ADNr 16S microbiano (Mirza *et al.*, 2006; Gravel *et al.*, 2007), las cuales actualmente son consideradas complementarias a las pruebas de reacción bioquímica. La implementación de ambas técnicas permiten validar en forma efectiva y precisa la identificación y caracterización microbiana (Hernández *et al.*, 2010).

El material genético del cromosoma bacteriano ADN ribosomal 16S es considerado un marcador molecular apropiado para la identificación, ya que su estructura y función han permanecido constantes a nivel de especie, género y familia (Oberhardt *et al.*, 2008). Resultando una herramienta útil en la clasificación, taxonomía y filogenia bacteriana. Al respecto, se ha propuesto que las bacterias cuyo ADNr 16S tenga un 97 % o más de secuencias idénticas pertenecerán a la misma especie (Natalini y Scortichini, 2007; Tambong *et al.*, 2009).

Considerando los antecedentes expuesto, el objetivo del presente estudio fue identificar molecularmente tres cepas rizobacterianas del género *Pseudomonas*, aisladas de la rizósfera de *C. volkameriana*. La hipótesis planteada fue que la identificación molecular confirma de manera confiable, los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, que las rizobacterias aisladas de la rizósfera de *C. volkameriana* corresponden a las especies *P. fluorescens* y *P. putida*.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Procedencia y cultivo de las cepas *Pseudomonas*

Se utilizaron tres cepas bacterianas del género *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *C. volkameriana* Tan. & Pasq. Las cepas de estudio fueron: FCA-8, FCA-56 y FCA-60, las cuales con base a técnicas microbiológicas de identificación bioquímica (Capítulo I) se determinaron como pertenecientes a las especies *P. fluorescens* (FCA-8) y *P. putida* (FCA-56 y FCA-60).

Las cepas rizobacterianas se propagaron en medio de cultivo B-King (BK) [(glicerol (IDQ[®]) 10 mL L⁻¹, peptona (BD-Bioxon[®]) 15 g L⁻¹, MgSO₄ (IDQ[®]) 1 mL L⁻¹, K₂HPO₄ (J.T. Baker[®]) 1.5 g L⁻¹, agar (Merck[®]) 15 g L⁻¹]. En condiciones asépticas cada cepa se colocó por separado mediante una asa de platino en cajas Petri de vidrio (100 x 20 mm), las cuales contenían 25 mL de medio de cultivo BK, previamente esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 120 °C (Garrity *et al.*, 2005). Para promover el crecimiento, actividad y conservación de las cepas se procedió a incubarlas a 25 °C, condiciones en las que se mantuvieron hasta su utilización en la pruebas de identificación molecular.

2.2.2. Extracción y cuantificación del ADN de las cepas *Pseudomonas*

La extracción del ADN bacteriano se llevó a cabo de acuerdo al método propuesto por Cheng y Jiang (2006). Posteriormente se observó el grado de integridad del ADN obtenido en cada cepa, mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % con buffer TBE 0.5X (0.1 M de TrisBase (Promega[®]), 0.1 M de ácido bórico (Merck[®]) y 0.5 M de EDTA (Química Meyer[®]), pH 8) en una cámara horizontal CONSORT a 90 V durante 1 hora. El gel de agarosa fue teñido en 100 mL de solución TBE 0.5X con 2 µL de bromuro de etidio (Promega[®] 10 mg mL⁻¹) durante 20 minutos. La visualización del gel se realizó con luz ultra violeta en un equipo transiluminador CONSORT[®]. Las bandas

de ADN separadas por electroforesis se registraron con el sistema de fotodocumentación Axiovision Zoom Browser EX (Cannon[®]).

La cuantificación del ADN obtenido se realizó considerando que una unidad de absorbancia (A) a 260 nm es igual a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ADN de doble cadena (Rickwood y Hames, 1990). Las lecturas de absorbancia se efectuaron en un espectrofotómetro (PERKIN-ELMER Lambda 40[®]).

2.2.3. Amplificación del gen ADN ribosomal 16S de las cepas *Pseudomonas*

Para la amplificación del gen ADNr 16S se utilizó la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con los primers (invitrogen[®]): Primer Universal Bact Forward 5' -GAT CCT GGC TCA GGA TGA AC- 3' y Primer Universal Bact Reverse 5' -GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC- 3' (Tambong *et al.*, 2009). La condición de la PCR consistió en la preparación de un volumen de reacción de 25 μL conformado por 25 mM dNTPs (Promega[®]), Tampón taq 5 X (Promega[®]), 25 mM de MgCl_2 (Promega[®]), Taq ADN polimerasa 5 U μL^{-1} (Promega[®]), 15 pM de cada uno de los primers y 40 ng de ADN genómico de las cepas bacterianas. Esta mezcla de reacción se depositó en microtubos Eppendorf[®] de 0.2 mL, los cuales se colocaron en un termociclador (Mastercycler Personal Eppendorf[®]) con el siguiente programa de ciclos térmicos: una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, alineamiento a 55 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Los amplificados obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.6 % con buffer TBE 1X en una cámara horizontal CONSORT a 90 V durante 1 hora. El gel se tiñó en 100 mL de solución TBE 0.5X con 2 μL de bromuro de etidio durante 20 minutos. La visualización de los productos amplificados se realizó con luz ultravioleta en un equipo transiluminador CONSORT[®]. Las bandas de ADN reveladas se registraron con el sistema de fotodocumentación Axiovision Zoom Browser EX.

2.2.4. Análisis de la secuenciación del gen ADNr 16S de las cepas *Pseudomonas*

Con la finalidad de realizar un adecuado análisis de la secuenciación del gen ADNr 16S, se procedió a realizar la purificación de los productos obtenidos de la amplificación del gen de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001). Al concluir el proceso de purificación, los productos de la amplificación del gen 16S fueron enviados para el proceso de secuenciación automatizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en Chapingo, Estado de México. Las secuencias obtenidas fueron editadas mediante los programas BioEdit 6.0 y FinchTV. Las secuencias del gen 16S ribosomal de las 3 cepas *Pseudomonas*, fueron comparadas empleando el algoritmo Blast vía Internet con las secuencias de especies bacterianas agrupadas en el mismo género, registradas en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Naz y Bano, 2010).

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Extracción y cuantificación del ADN de las cepas *Pseudomonas*

La calidad y cantidad de ADN obtenido representan condiciones indispensables y determinantes para garantizar una correcta amplificación de la secuencia del gen mediante la técnica de PCR (Scarpellini *et al.*, 2004). En este trabajo el método de extracción de ADN propuesto por Cheng y Jiang (2006), permitió la obtención de ADN en las tres cepas de *Pseudomonas*. En el Cuadro 2.1 se muestra la cantidad de ADN genómico extraído en cada cepa rizobacteriana.

El material genético obtenido se consideró de adecuada integridad y concentración para el proceso de amplificación, tal y como se observa en el gel de agarosa al 0.8 % (Figura 2.1), en el cual se pueden apreciar bandas de ADN genómico integro de origen bacterial.

Cuadro 2.1. Cuantificación por espectrofotometría del ADN genómico extraído de las cepas *Pseudomonas*.

Cepa	Absorbancia	Cantidad de ADN
Rizobacteriana	260 nm	$\mu\text{g mL}^{-1}$
FCA-8	0.202	10.1
FCA-56	0.200	10.0
FCA-60	0.213	10.6

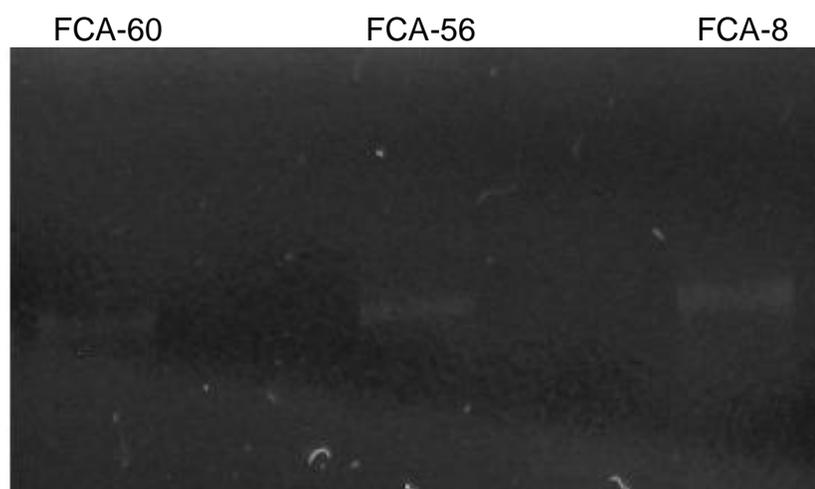


Figura 2.1. Extracción total de ADN genómico de las tres cepas rizobacterianas.

Algunos trabajos mencionan que el método de extracción incide directamente en la cantidad y calidad del ADN bacteriano, lo cual repercute en el proceso de amplificación del gen 16S, comúnmente empleado para la identificación de microorganismos bacterianos (Cheng y Jiang 2006; Tambong *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2010). Por lo tanto, es importante efectuar una adecuada selección del método de extracción del ADN genómico, con la finalidad de lograr la clonación y secuenciación de éste gen de manera exitosa. Lo anterior favorecerá una identificación filogenética confiable que permite contrastar la identidad y similitud entre géneros y especies conocidas, mediante el uso de las secuencias depositadas en bases de datos acreditadas como el Genbank.

2.3.2. Amplificación del gen ADN ribosomal 16S de las cepas *Pseudomonas*

Como resultado de la amplificación del gen 16S ribosomal utilizando los primers universales propuestos por Tambong *et al.* (2009) para la identificación de bacterias del género *Pseudomonas*, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 750 pb en las tres cepas rizobacterianas, tal y como se observa en la Figura 2.2. Aun cuando los productos amplificados presentan impurezas, los fragmentos de interés muestran buena intensidad e integridad.

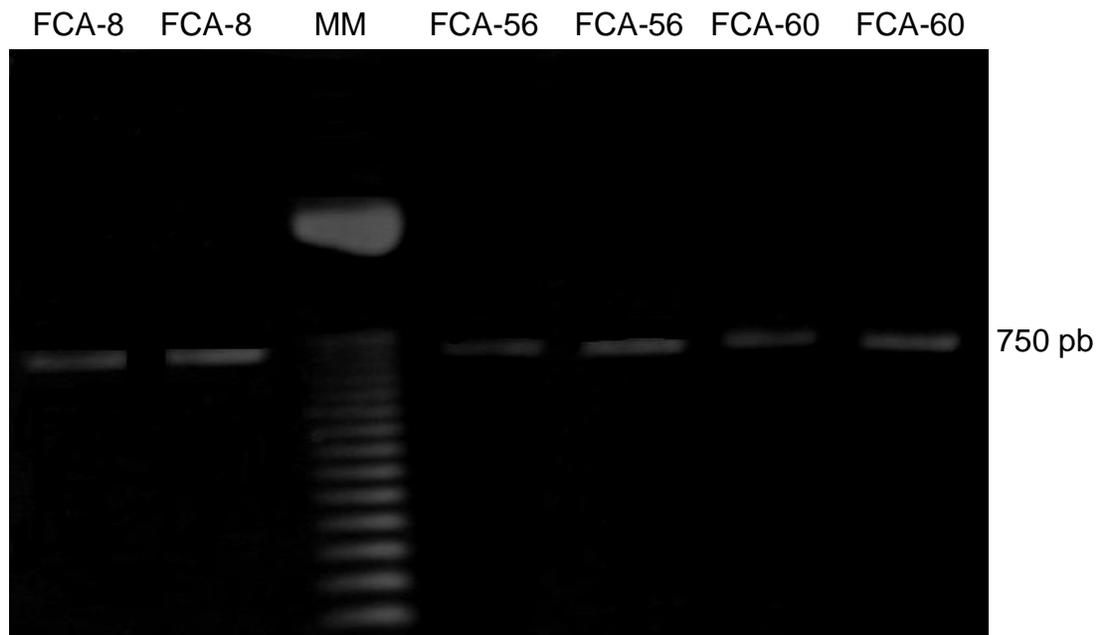


Figura 2.2. Visualización de los fragmentos amplificados de 750 pb del gen 16S ribosomal extraído de las tres cepas rizobacterianas del género *Pseudomonas*. MM = marcador molecular de 50 pb.

El peso molecular (750 pb) de los fragmentos obtenidos en las cepas previamente identificadas como *P. fluorescens* (FCA-8) y *P. putida* (FCA-56 y FCA-60), confirma que estas cepas rizobacterianas pertenecen al género *Pseudomonas* (Natalini y Scortichini, 2007; Tambong *et al.*, 2009). La identificación a nivel de especie se confirmará con el análisis comparativo entre las secuencias de estas cepas, con las

secuencias de especies bacterianas agrupadas en el mismo género, particularmente con las depositadas en la base de datos del GenBank. Algunos reportes como el de Hernández *et al.* (2010) al identificar molecularmente diferentes cepas bacterianas, mencionan que al comparar las secuencias de los fragmento obtenidos de alrededor de 650 a 800 pb, estas fueron coincidentes para el género *Pseudomonas*.

El uso de primers universales específicos para la identificación de un tipo particular de microorganismo como las bacterias, es determinante en el proceso de amplificación del gen 16S ribosomal (Naz y Bano, 2010), por lo cual, deben ser seleccionados correctamente ya que la función de los primers es complementar las regiones conservadas en el comienzo del gen, específicamente en la región de 540 pb o al final de la secuencia completa sobre la región de 1500 pb, por lo que la secuencia de la región localizada en 700 a 800 pb resulta ser la más utilizada para la comparación taxonómica entre especies (Tambong *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2009).

Tegova *et al.* (2004) mencionan que un primer o iniciador deberá comprender una longitud de 16 a 25 bases, de lo contrario, si el iniciador es corto pierde especificidad y si éste es largo se verá afectada la amplificación del fragmento. Con base en lo anterior, los primers considerados para este estudio, propuestos por Tambong *et al.* (2009), cumplen con las especificaciones recomendadas al presentar 20 y 21 bases respectivamente.

Comparando las técnicas tradicionales para la identificación de microorganismos con las técnicas moleculares como PCR, esta última sobresale por el ahorro de tiempo y seguridad en la identificación debido a su mayor sensibilidad, cualidades que han promovido el creciente uso de las metodologías basadas en la manipulación del ADN principalmente en el diagnóstico e identificación de microorganismos (Mirza *et al.*, 2006; Naz y Bano, 2010). Aun cuando PCR representa la mejor opción por su precisión, la necesidad de equipo especializado, reactivos y personal calificado, constituyen un obstáculo para su incorporación rutinaria en trabajos de investigación y

diagnóstico, en comparación con los métodos tradicionales en donde la inversión y especialización es considerablemente menor.

2.3.3. Análisis de la secuenciación del gen ADNr 16S de las cepas *Pseudomonas*

El proceso de purificación de los productos amplificados, previo a la secuenciación, facilitó la obtención de las secuencias del gen 16S ribosomal en las tres cepas rizobacterianas. Como se muestra en el Cuadro 2.2 las secuencias no presentan imprecisiones, lo que permitió realizar el análisis filogenético comparativo con las secuencias de especies bacterianas agrupadas en el mismo género, registradas en la base de datos del GenBank.

La cantidad de nucleótidos obtenidos en las secuencias consenso (Cuadro 2.2) es resultado del proceso de edición, el cual se realizó con la finalidad de seleccionar las regiones que presentaban uniformidad a través de toda la secuencia obtenida en cada cepa (Tegova *et al.*, 2004; Tambong *et al.*, 2009). Esta selección permitió efectuar un análisis comparativo para determinar el porcentaje de homología molecular entre las secuencias de las cepas FCA-8, FCA-56 y FCA-60, con las secuencias depositadas en el Genbank, para la identificación de género y especie (Naz y Bano, 2010).

El número de registros encontrados con 100 % de similitud fue variable en cada cepa, debido a la cantidad de nucleótidos editados en cada secuencia consenso, sin embargo de acuerdo con las secuencias registradas en el Genbank, las tres cepas rizobacterianas correspondieron a la especie *P. putida* (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.2. Secuencias del gen 16S ribosomal obtenidas en las tres cepas rizobacterianas del género *Pseudomonas*.

Cepa rizobacteriana	Secuencia consenso	Número de nucleótidos
FCA-8	GGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAA CTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA GTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA TCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC GGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGC AGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGA CAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCG GAATTACTGGGCGT	315
FCA-56	GCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTG CACCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGA GTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCCGGTAACGTCAA ACAGCAAGGTATTAGCTTACTGCCCTTCCTCCCA ACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCA CACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCC ATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAG GAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTG ATCATCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCT TGGTGAGCCATTACCCACCAACTAGCTAATCCG ACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGG	365
FCA-60	CGCGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGC TTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACA GAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCCGGTAACGTCA AACAGCAAGGTATTAGCTTACTGCCCTTCCTCC CAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTT CACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGC CCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGT AGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGAC TGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGC CTTGGTGAGCCATTACCCACCAACTAGCTAATC CGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCC	370

Cuadro 2.3. Identificación molecular del gen 16S ribosomal obtenido en las tres cepas rizobacterianas.

Cepa rizobacteriana	Identificación molecular	Secuencias registradas en Genbank	Porcentaje de similitud
FCA-8	<i>Pseudomonas putida</i>	9	100
FCA-56	<i>Pseudomonas putida</i>	11	100
FCA-60	<i>Pseudomonas putida</i>	13	100

El análisis molecular corroboró que las cepas FCA-8, FCA-56 y FCA-60 pertenecen al género *Pseudomonas*, resultado que concuerda con el análisis bioquímico (Cuadro 2.4.), respecto a la determinación de especie ambos métodos de identificación coincidieron con la especie *P. putida* para las cepas FCA-56 y FCA-60. Sin embargo para la cepa FCA-8 la determinación de especie presentó divergencia entre ambos métodos, obteniendo la especie *P. fluorescens* con el análisis bioquímico (Capítulo I) y *P. putida* con el análisis molecular, el cual arrojó 100 % de similitud con las secuencias depositadas en el Genbank.

Cuadro 2.4. Comparación entre la identificación bioquímica (Capítulo I) y molecular efectuada en las cepas rizobacterianas.

Cepa rizobacteriana	Identificación bioquímica	Identificación molecular
FCA-8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
FCA-56	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
FCA-60	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>

Hernández *et al.* (2010) mencionan que la implementación de pruebas bioquímicas son útiles en la identificación y caracterización de microorganismos como las rizobacterias, sin embargo, debido a la variabilidad de los resultados al realizar este tipo de pruebas, es recomendable realizar ensayos complementarios como los

moleculares. Estos facilitan la identificación de género y especie de la bacteria de manera precisa y directa, ya que analizan el material genético del microorganismo, particularmente el gen 16S ribosomal considerado un marcador molecular apropiado para la identificación de bacterias, debido a que su estructura y función permanecen constantes a nivel de especie, género y familia (Oberhardt *et al.*, 2008). Por lo tanto, resulta una herramienta útil en la clasificación, taxonomía y filogenia bacteriana.

La identificación de microorganismos mediante metodologías moleculares es relativamente reciente (Pérez *et al.*, 2009), sin embargo su aplicación y aprovechamiento va en aumento debido a que las investigaciones en microbiología requieren de resultados confiables, eficientes y rápidos, cualidades que se obtienen mediante la manipulación del material genético. En las bacterias el gen 16S ribosomal representa la forma más efectiva para su identificación por medio de PCR y posterior secuenciación, circunstancia que ha promovido el aprovechamiento de metodologías moleculares, las cuales son utilizadas cada vez más, lo cual podría ocasionar que los costos se reduzcan hasta ser más rentables.

2.4. Conclusiones

El método de extracción de ADN bacteriano utilizado en este estudio permitió obtener la concentración y calidad adecuada para efectuar el proceso de amplificación del gen 16S ribosomal de las tres cepas rizobacterianas.

Los primers específicos para *Pseudomonas* utilizados en el proceso de amplificación del gen 16S revelaron un fragmento de 750 pb en las tres cepas rizobacterianas, el cual se utilizó para la identificación taxonómica de las cepas.

Las secuencias consenso de 315, 365 y 370 nucleótidos obtenidas en las cepas FCA-8, FCA-56 y FCA-60 respectivamente, permitieron determinar el porcentaje de homología molecular con las secuencias depositadas en la base de datos del

Genbank para las tres cepas, con una correspondencia del 100 % de similitud con la especie *Pseudomonas putida*.

La técnica molecular de PCR y secuenciación en comparación con los métodos tradicionales de identificación microbiológica, ofrecen precisión, sensibilidad y confiabilidad en la manipulación del ADN, agilizando el proceso de diagnóstico e identificación de microorganismos.

2.5. Literatura citada

Cheng, H. R. and N. Jiang. 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters* 28(1): 55-59.

Garrity, G. M., A. J. Bell and T. Lilburn. 2005. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Second edition. Vol. 2. The Proteobacteria Part B. The Gammaproteobacteria. Springer-Verlag. New York, USA. pp. 323-377.

Gravel, V., H. Antoun, J. Russell and T. Weddell. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry* 39(8): 1968-1977.

Hernández R, A., D. León P., N. Rives R., A. Díaz O., M. Almaguer Ch. y Y. Acebo G. 2010. Identificación de aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* fluorescentes con actividad antagonica ante *Curvularia* spp. *Revista Protección Vegetal* 25(3): 181-189.

Kloepper, J. W., C. M. Ryu and S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94(11): 1259-1266.

Mirza, M. S., S. Mehnaz, P. Normand, C. Prigent-Combaret, Y. Moëgne-Loccoz, R. Bally and K. A. Malik. 2006. Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biology and Fertility of Soils* 43(2): 163-170.

Natalini, E. and M. Scortichini. 2007. Variability of the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer in *Pseudomonas avellanae* strains. *FEMS Microbiology Letters* 271(2): 274-280.

Naz, I. and A. Bano. 2010. Biochemical, molecular characterization and growth promoting effects of phosphate solubilizing *Pseudomonas* sp. isolated from weeds grown in salt range of Pakistan. *Plant and Soil* 334(1-2): 199-207.

- Oberhardt, M. A., J. Puchalka, K. E. Fryer, V. A. P. Martins Dos Santos and J. A. Papin. 2008. Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 190(8): 2790-2803.
- Pérez, A., J. Rojas Sierra y H. Valen. 2009. Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 1(2): 286-301.
- Richardson, A. E., J. M. Barea, A. M. McNeill and C. Prigent-Combaret. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321(1-2): 305-339.
- Rickwood, D. and B. D. Hames. 1990. *Gel electrophoresis of nucleic acids: A practical approach*. Oxford University Press. New York. pp. 65-66.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Isolation of DNA fragments from polyacrylamide gels by the crush and soak method. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp. 551- 554.
- Scarpellini, M., L. Franzetti and A. Galli. 2004. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiology Letters* 236(2): 257-260.
- Tambong, J. T., R. Xu and 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(8): 2630-2640.
- Tegova, R., A. Tover, K. Tarassova, M. Tark and M. Kivisaar. 2004. Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* 186(9): 2735-2744.

CAPÍTULO III
BIOFERTILIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS Y HONGOS MICORRIZÓGENOS
ARBUSCULARES PARA MEJORAR EL VIGOR Y SANIDAD DE PORTAINJERTOS
DE CÍTRICOS FRENTE A *Phytophthora parasitica*

RESUMEN

La biofertilización de plantas con inoculantes rizobacterianos y hongos micorrizógenos arbusculares, potencialmente promueve el crecimiento y sanidad vegetal, y reduce el uso de agroquímicos. Se evaluó en vivero el efecto de la biofertilización individual y combinada de tres cepas rizobacterianas y un consorcio de hongos micorrizógenos arbusculares sobre el crecimiento de los portainjertos *Citrus volkameriana* y lima Rangpur, e injerto de limón Persa, y su efecto antagónico frente a *Phytophthora parasitica*. Las plantas se inocularon de forma individual y combinada con las cepas rizobacterianas FCA-8, FCA-56 y FCA-60 de *P. putida* y el consorcio micorrizógeno MTZ-1. Se aplicó fertilizante químico (18-46-00 N-P-K) a todas las plantas 30 días después de la inoculación, 5 g en el testigo y 2.5 g en los tratamientos con biofertilización. Se estableció un diseño experimental en parcelas divididas con cinco repeticiones. La biofertilización de las plantas promovió el crecimiento de *C. volkameriana*, lima Rangpur e injerto limón Persa. Además en ambos portainjertos impactó favorablemente el contenido de nutrientes en hojas de limón Persa. La presencia de poblaciones rizobacterianas y micorrízicas en los tratamientos de biofertilización combinada demuestra un sinergismo positivo en la colonización de raíces. La biofertilización presentó capacidad antagónica frente a *P. parasitica*, al inhibir su proceso infeccioso en las plantas de cítricos en invernadero. Los resultados obtenidos indican las potencialidades de las tres cepas de *P. putida* y el consorcio micorrizógeno MTZ-1 en la promoción del crecimiento vegetal, asimilación de nutrientes y antagonismo a *P. parasitica*.

Palabras clave: *Pseudomonas putida*, *Phytophthora parasitica*, colonización micorrízica, antagonismo.

**BIOFERTILIZATION OF RHIZOBACTERIA AND ARBUSCULAR MYCORRHIZAL
FUNGI TO IMPROVE CITRUS PLANT VIGOR AND HEALTH AGAINST
*Phytophthora parasitica***

ABSTRACT

The biofertilization of plants with rhizobacteria and vesicular arbuscular mycorrhizae (VAM), potentially promotes plant growth and health, and reduce the use of agrochemicals. The effect of individual and combined biofertilization with three strains of rhizobacteria and a consortium of VAM was evaluated under nursery conditions on the growth of rootstocks of *Citrus volkameriana* and Rangpur lime and grafts of Tahiti lime. Their antagonistic effect against *Phytophthora parasitica* was also assessed. Plants were inoculated with the rhizobacteria strains FCA-8, FCA-56 and FCA-60 of *P. putida*, individually and in combination with the mycorrhizal consortium MTZ-1. Chemical fertilizers (18-46-00 N-P-K) were applied to all the plants 30 days after inoculation; 5 g in the control and 2.5 g in the treatments with biofertilization. A split-plot experimental design with five replications per treatment was established. Biofertilization positively promoted the growth of *C. Volkameriana*, Rangpur lime and graft of Tahiti lime. In addition in both rootstocks, there was also a positive impact on the nutrient content in the leaves of Tahiti lime. The presence of rhizobacterial and mycorrhizal populations in the combined biofertilization treatments demonstrated a positive synergism in the colonization of roots. Biofertilization conferred an antagonistic capacity against *P. parasitica*, by inhibiting its infection process in greenhouse citrus plants. The results demonstrate the potential of the three strains of *P. putida* and the MTZ-1 mycorrhizal consortium in terms of promoting plant growth, assimilation of nutrients and antagonism against *P. parasitica*.

Key words: *Pseudomonas putida*, *Phytophthora parasitica*, mycorrhizal colonization, antagonism.

3.1. Introducción

El cultivo de cítricos es de gran importancia para la población y el comercio en países de clima tropical y subtropical, esto debido a la cantidad de empleos que genera durante su proceso productivo, así como por las divisas obtenidas por la industrialización y comercialización de fruta fresca o procesada (Agustí, 2003; FAO, 2009). En México la producción de cítricos se realiza en 23 estados, situación que lo ubica como el quinto productor a nivel mundial (SIAP, 2009).

Por ser árboles perennes, los cítricos permanecen en campo durante años, por lo que están expuestos a numerosas plagas como bacterias, hongos, insectos, ácaros, nematodos, virus, viroides y fitoplasmas (Agustí, 2003). El embate de estas plagas pueden provocar daños directos e indirectos, ser vectores o puntos de entrada de enfermedades. Una enfermedad de importancia económica es la gomosis de los cítricos, ocasionada por los oomicetos *Phytophthora parasitica* Breda de Haan y *Phytophthora citrophthora* R.E. Smith & E.H. Smith, siendo *P. parasitica* la especie que causa daños severos al cultivo (Amorim y Melo, 2002; Javier-Alva y Mattos, 2006). Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de secreciones gomosas de coloración café, ocasiona un decaimiento generalizado del árbol, que puede ser lento o rápido, provocando finalmente la muerte de éste (Agustí, 2003; Javier-Alva y Mattos, 2006).

La agricultura moderna se ha caracterizado por el uso desmedido de fertilizantes inorgánicos y agroquímicos para lograr incremento de volúmenes de producción y el control de plagas y enfermedades. Este esquema de producción ha generado serios problemas de contaminación ambiental, salud pública y reducción de la fertilidad del suelo (Leach y Mumford, 2008; Berg, 2009). Ante tal problema es necesario implementar estrategias de producción sustentables, que reduzcan los daños a la salud y coadyuven en la conservación del suelo y agua, componentes importantes para el equilibrio y óptimo funcionamiento de los agroecosistemas (Barea *et al.*, 2005; Rives *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2008).

Actualmente la biotecnología agrícola promueve alternativas de producción viables y rentables como la biofertilización, la cual impacta de forma favorable el rendimiento de los cultivos, sin dañar el ambiente ni la salud humana, a la vez que coadyuva en la recuperación y mejoramiento de la fertilidad del suelo (Rives *et al.*, 2007; Van Loon, 2007; Lambers *et al.*, 2009). El creciente interés por la biofertilización en los sistemas de producción agrícola, se basa en el uso de microorganismos benéficos vivos como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y los hongos formadores de micorriza arbuscular. Estos organismos son capaces de estimular el crecimiento, desarrollo y sanidad de la planta y mejoran la fertilidad del suelo (Van Loon, 2007; Song *et al.*, 2007; Lambers *et al.*, 2009).

Un amplio número de géneros bacterianos están considerados dentro de la clasificación de rizobacterias, tales como: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Serratia*, entre otros. El género *Pseudomonas* engloba microorganismos saprófitos de vida libre en suelos, materia orgánica en descomposición, ecosistemas acuáticos y asociados a plantas y animales (Gravel *et al.*, 2007; Berg, 2009). Las especies benéficas más importantes del género *Pseudomonas* son *P. putida* Trevisan y *P. fluorescens* Migula (Gravel *et al.*, 2007), las cuales tienen como característica fijar nitrógeno atmosférico, degradar compuestos aromáticos, promover la síntesis de reguladores del crecimiento vegetal y otros metabolitos con efecto antagónico como sideróforos, enzimas líticas (glucanasas y quitinasas) y antibióticos (Richardson *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2009). Estas han sido ampliamente estudiadas por las interacciones positivas en el crecimiento, desarrollo y sanidad de cultivos como maíz, trigo, tomate, lechuga, arroz, cítricos, entre otros (Rives *et al.*, 2007; Bhattacharjee *et al.*, 2008; Santoyo *et al.*, 2010).

Entre los hongos micorrízicos arbusculares destacan los géneros *Gigaspora*, *Glomus*, *Acaulospora* y *Sclerocystis*, debido a que establecen asociación simbiótica con más del 90 % de las especies vegetales. Esta simbiosis influye en la nutrición y crecimiento de las plantas, lo que confiere mayor tolerancia al estrés hídrico y resistencia a patógenos del suelo, además promueve el incremento del volumen

radical e interviene en la solubilización y absorción de fósforo (Vogelsang *et al.*, 2006; Bever *et al.*, 2009; Rigamonte *et al.*, 2010). El potencial de los hongos micorrizógenos arbusculares ha sido evaluado en diferentes cultivos de importancia agrícola como maíz, trigo, caña de azúcar, tomate, cebolla, café, pastos y cítricos (Wang y Qiu, 2006; Lambers *et al.*, 2009; Rigamonte *et al.*, 2010).

El proceso de biofertilización mediante el aprovechamiento de rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares, representa para los esquemas de producción agrícola un potencial viable que promueve y mejora el crecimiento y sanidad de las plantas, cualidades que pueden reducir el uso de agroquímicos. De acuerdo con lo señalado, el objetivo del presente estudio fue evaluar en vivero el efecto de la inoculación individual y combinada de tres cepas rizobacterianas y un consorcio de hongos micorrizógenos arbusculares sobre el crecimiento y nutrición de *Citrus volkameriana* y lima Rangpur injertados con limón persa, y su efecto antagónico frente a *Phytophthora parasítica*. La hipótesis planteada fue que la inoculación combinada con rizobacterias y el consorcio de hongos micorrizógenos arbusculares mejora el crecimiento de las plantas y confiere a *C. volkameriana* y lima Rangpur tolerancia al ataque de *P. parasítica*.

3.2. Materiales y métodos

La presente investigación se llevó a cabo en Martínez de la Torre, Veracruz, México, con ubicación geográfica a los 20° 04' de latitud norte y 97° 04' de longitud oeste, y una altitud de 151 m.s.n.m. En particular en el vivero "San Manuel", que está certificado para la producción de plantas de cítricos.

3.2.1. Propagación y obtención de los inóculos rizobacterianos y consorcio micorrizógeno

Se utilizaron las cepas rizobacterianas FCA-8, FCA-56 y FCA-60 de la especie *P. putida* Trevisan, las cuales se propagaron en medio de cultivo B-King (BK) [(glicerol

(IDQ[®]) 10 mL L⁻¹, peptona (BD-Bioxon[®]) 15 g L⁻¹, MgSO₄ (IDQ[®]) 1 mL L⁻¹, K₂HPO₄ (J.T. Baker[®]) 1.5 g L⁻¹]. En condiciones asépticas, cada cepa se depositó por triplicado y de forma individual en matraces Erlenmeyer de vidrio de 250 mL, los cuales contenían 150 mL de medio de cultivo BK, previamente esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 120 °C (Garrity *et al.*, 2005). Para promover el crecimiento de las cepas se procedió a incubarlas a 25 °C por 96 h. de acuerdo a la técnica propuesta por Díaz *et al.* (2001). Se empleó el consorcio micorrizógeno MTZ-1, integrado por propágulos infectivos de *Glomus mosseae*, *Glomus etunicatum*, *Glomus aggregatum*, *Glomus sp.*, *Gigaspora albida*, *Acaulospora morrowiae* y *Acaulospora scrobiculata*. La propagación del consorcio micorrizógeno se realizó en una mezcla esterilizada 2:1 (v/v) de suelo y arena de río, de acuerdo al proceso descrito por Zulueta *et al.* (2010). Las cepas rizobacterianas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Química y el consorcio micorrizógeno por el Laboratorio de Organismos Benéficos, ambos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana, Campus Xalapa.

3.2.2. Material vegetal utilizado

Los portainjertos cítricos *C. volkameriana* Tan & Pasq y lima Rangpur (*Citrus x limonia* Osbeck) fueron seleccionados por sus respuestas diferentes a *P. parasitica*. Al respecto, Curti-Díaz *et al.* (2000) indican que *C. volkameriana* presenta un nivel aceptable de tolerancia en comparación con lima Rangpur el cual se considera susceptible. El injerto utilizado fue limón Persa (*Citrus latifolia* Tan.).

Las plantas de ambos portainjertos y el injerto limón Persa fueron proporcionados por el Ing. Julio González Contreras responsable técnico del vivero “San Manuel”. Cuando las plantas de ambos portainjertos presentaron tres pares de hojas verdaderas en el almácigo, se llevó a cabo el trasplante a bolsas de polietileno negro de 3.0 kg de capacidad, a las cuales se les colocó suelo de vega de río (franco-arcilloso) previamente desinfectado con BUNEMA[®] 55 GE (Buckman) 20 mL L⁻¹, producto utilizado en el proceso productivo del vivero.

3.2.3. Diseño experimental

Con base a los portainjertos y tratamientos evaluados, para determinar la respuesta en crecimiento de las plantas a la biofertilización individual y combinada, se estableció un diseño experimental en parcelas divididas, en el cual las parcelas grandes estuvieron representadas por *C. volkameriana* y lima Rangpur, y las subparcelas conformadas por diez tratamientos con cinco repeticiones y una planta como unidad experimental por tratamiento.

3.2.4. Biofertilización de los portainjertos *C. volkameriana* y lima Rangpur

Al realizar el trasplante los portainjertos fueron biofertilizados en el sistema radical, para el caso de las cepas rizobacterianas, esta actividad se realizó por separado mediante inmersión del sistema radical de las plantas en 500 mL de suspensión bacteriana durante 20 minutos, cuya concentración fue 10^9 células mL⁻¹ de medio de cultivo BK, ajustada con solución salina fisiológica estéril por medio de un espectrofotómetro digital (Thermo-Spectronic Genesys 20[®]) de acuerdo con la escala de McFarland (Rives *et al.*, 2009). La inoculación del consorcio MTZ-1 consistió en impregnar las raíces por completo con 10 g de inoculo por planta.

Se biofertilizaron las plantas de forma individual y combinada, según los tratamientos evaluados: 1. Testigo (manejo del vivero), 2. FCA-8, 3. FCA-56, 4. FCA-60, 5. Consorcio MTZ-1, 6. Mix (mezcla de las tres cepas rizobacterianas), 7. Mix + MTZ-1, 8. FCA-8 + MTZ-1, 9. FCA-56 + MTZ-1 y 10. FCA-60 + MTZ-1.

Todas las plantas fueron fertilizadas 30 días después del trasplante con la fórmula química 18-46-00 (N-P-K). En el testigo se aplicaron 5 g por planta y los tratamientos con inoculación individual y combinada se utilizaron 2.5 g por planta. La fertilización se realizó de acuerdo al proceso técnico-productivo desarrollado por el vivero. La colocación del injerto de limón Persa de yema tipo enchapado lateral (Russián y Oropeza, 2008) se efectuó 120 días después del trasplante.

3.2.4.1. Variables de estudio

Para los portainjertos *C. volkameriana* y lima Rangpur se cuantificó: altura de tallo, diámetro de la base del tallo, longitud y volumen de raíz, biomasa fresca y seca de planta, colonización bacteriana (UFC g⁻¹ de raíz, en medio de cultivo BK) según la metodología propuesta por Bashan *et al.* (1996) y porcentaje de colonización micorrízica total (hifas, arbusculos y vesículas), de acuerdo a la técnica de clareo y tinción de raíces (Phillips y Hayman, 1970) y lectura en microscopio óptico compuesto (Nikon®), según lo descrito por Biermann y Linderman (1981). Para el injerto limón Persa se evaluó: altura, diámetro de la base del injerto, área foliar, biomasa fresca y seca de planta, y contenido foliar de N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mn de acuerdo a la metodología descrita por Maldonado *et al.* (2008), sólo para las determinaciones nutrimentales se utilizó una muestra compuesta por cinco plantas por tratamiento, por lo que no contó con repeticiones. Todas las variables fueron cuantificadas hasta que las plantas cumplieron 12 meses de edad, tiempo de estancia definido por el sistema técnico-productivo del vivero.

Exepto en los resultados del análisis foliar, los datos obtenidos se sometieron al análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) mediante el programa SAS para Windows (Rebolledo, 2002).

3.2.5. Evaluación de la actividad antagónica de las cepas rizobacterianas y el consorcio micorrizógeno frente a *P. parasitica* en invernadero

Con la finalidad de evaluar la capacidad antagónica de las rizobacterias y el consorcio micorrizógeno contra *P. parasitica*. De los portainjertos *C. volkameriana* y lima Rangpur con 12 meses de edad, se tomaron cinco plantas por tratamiento y se trasladaron a un invernadero ubicado en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana, Campus Xalapa, sitio en donde se realizó la prueba de patogenicidad. El patógeno empleado fue la cepa CPT-12 de *P. parasitica*, proporcionada por el Dr. Carlos Fredy Ortiz García, coordinador del Laboratorio de

Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. La cepa CPT-12 se propagó en cajas Petri (100 x 20 mm) con 25 mL del medio de cultivo V8 [jugo V8[®] (Campbell's) 300 mL L⁻¹, CaCO₃ (J.T. Baker[®]) 4 g L⁻¹, agar (Merck[®]) 15 g L⁻¹], esterilizado en autoclave 15 minutos a 120 °C. Para promover el crecimiento micelial y la actividad de la cepa, las cajas se incubaron en estufa bacteriológica a 25 °C durante 96 h (Rezusta *et al.*, 2001).

Para inducir la infección de *P. parasitica* sobre las plantas, se procedió a desinfectar la zona de inoculación del patógeno, con alcohol al 70 % y agua destilada estéril; con una aguja de disección previamente desinfectada se efectuó una lesión en la corteza de 0.5 cm de diámetro, 5 cm arriba de la base del tallo. Sobre la lesión se colocó un disco uniforme de 0.5 cm de diámetro de medio de cultivo V8 con presencia de micelio del patógeno, se cubrió con algodón húmedo y cinta microporo. Se regaron las plantas con agua del grifo hasta saturar el suelo de la maceta y se cubrieron individualmente con bolsas de polietileno transparente (60 x 90 cm) a manera de cámara húmeda. Transcurridos 30 días se retiró la cámara húmeda para observar el tamaño de lesión y la presencia de síntomas ocasionados por la infección del patógeno (Rondón *et al.*, 1993).

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Crecimiento de *C. volkameriana* y lima Rangpur promovido por la biofertilización con rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares

El análisis de varianza de parcelas divididas presentó diferencias significativas, en las variables volumen de raíz (P=0.0063), biomasa fresca de planta (P=0.0008) y biomasa seca de planta (P=0.0073), con una interacción significativa (P=0.0073) portainjerto*bloque en el caso de biomasa fresca de planta, que al no ser tan relevante, permite revisar los efectos principales; sólo en portainjerto fue marginalmente significativo (P=0.0696), sin embargo no presentó diferencias en la separación de medias por Tukey.

En el caso de volumen de raíz, los portainjertos fueron significativos ($P=0.0113$), y también fueron separados por Tukey (Cuadro 3.1). Para biomasa seca de planta hubo una significancia marginal ($P=0.0507$) en la interacción portainjerto*tratamiento, aunque portainjerto como parcela mayor no presentó diferencias. Por tanto, al hacer el análisis posterior, de los tratamientos en cada una de las dos variedades de portainjerto, no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos para lima Rangpur ($P=0.3948$), pero si hubo diferencias entre tratamientos ($P=0.0171$) en *C. volkameriana*, que al separar mediante Tukey donde el testigo fue igual a todos los tratamientos, y donde sólo fue mayor el tratamiento Mix (mezcla de las tres cepas rizobacterianas) al tratamiento MTZ-1 (Cuadro 3.2).

Pérez y Casas (2005) al evaluar el efecto de la interacción entre vitroplantas de caña de azúcar y cuatro cepas autóctonas de rizobacterias *Azospirillum brasilense*, mencionan que todas las cepas dieron una respuesta estimuladora significativa sobre las variables de crecimiento peso fresco y seco del tallo y la raíz. De acuerdo con los resultados, concluyen que los microorganismos benéficos que habitan la rizósfera pueden ser aislados e inoculados en los cultivos, tal y como ocurre con las rizobacterias, las cuales pueden ser capaces de tener un papel activo como promotores del crecimiento. En otro estudio, realizado por Nihorimbere *et al.* (2010) señalan que *Bacillus subtilis*, considerada una rizobacteria, en condiciones de campo mejoró significativamente el crecimiento y rendimiento de plantas de tomate, y confirió altos niveles de protección contra *Fusarium semitectum*. Los resultados indican el potencial de *B. subtilis* como promotor del crecimiento vegetal y agente antagónico a *F. semitectum*, como alternativa para sustituir el control químico de enfermedades. Por su parte, Rives *et al.* (2007) mencionan la importancia de utilizar cepas nativas rizobacterianas, las cuales al ser introducidas en condiciones similares a las que fueron aisladas, éstas podrán tener una mejor actividad benéfica sobre las plantas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el crecimiento de *C. volkameriana* y lima Rangpur (Cuadros 3.1 y 3.2), actualmente son varios los estudios que informan la respuesta a la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias sobre

la sanidad, crecimiento, desarrollo y rendimiento de diferentes especies de plantas (Barea *et al.*, 2005; Berg, 2009; Santoyo *et al.*, 2010). Al respecto, Rives *et al.* (2009) mencionan que el aprovechamiento de agentes benéficos como las rizobacterias favorecen significativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas, tal y como lo demuestran al evaluar el efecto de 10 cepas autóctonas de *P. putida* en el cultivo de arroz, las cuales promovieron el crecimiento y desarrollo, con diferencias significativas en masa fresca y seca aérea y longitud de raíz.

Santillana (2006) al evaluar el efecto de tres cepas nativas de *Pseudomonas* sp. en plantas de frijol y maíz, reporta diferencias significativas respecto al testigo, en las variables materia seca de la parte aérea y de la raíz. Lo cual no sucedió en este estudio, aunque es importante aclarar que el testigo tuvo el doble de fertilizante que los tratamientos, por lo que al no encontrar un efecto significativo, significa que los tratamientos de biofertilización sustituyeron el 50 % de los fertilizantes químicos. Con base a los resultados obtenidos, se hace necesario continuar con el aislamiento y selección de rizobacterias de *Pseudomonas* nativas, con potencial eficiente para promover el crecimiento en diferentes plantas de interés agrícola, así mismo indica la importancia de evaluar éste tipo de microorganismos a nivel de campo.

Cuadro 3.1. Promedios de las variables de crecimiento de *C. volkameriana* y lima Rangpur biofertilizados con rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares, para las parcelas grandes.

	Altura de tallo (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Longitud de raíz (cm)	Volumen de raíz (cm ³)	Biomasa fresca de planta (g)	Biomasa seca de planta (g)
<i>C. volkameriana</i>	35.24 a	9.34	26.91 a	36.76 a	50.86	17.45
lima Rangpur	34.66 b	9.28	25.13 b	30.16 b	44.48	16.28

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

Cuadro 3.2. Biofertilización con rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares sobre el crecimiento de *C. volkameriana* y lima Rangpur.

Tratamientos	Altura de tallo (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Longitud de raíz (cm)	Volumen de raíz (cm ³)	Biomasa fresca de planta (g)	Biomasa seca de planta (g)
<i>C. volkameriana</i>						
Testigo	34.50	9.43	25.74	35.60	42.52	15.61ab
FCA-8	34.04	9.21	29.12	36.00	54.95	16.99 ab
FCA-56	35.26	9.41	28.28	35.60	55.18	18.40 ab
FCA-60	34.46	9.55	24.30	38.80	54.97	19.12 ab
MTZ-1	35.46	8.62	26.26	34.00	49.66	14.16 b
Mix	34.30	9.46	26.10	42.00	56.33	19.63 a
Mix+MTZ-1	35.08	9.35	27.92	36.60	49.17	16.94 ab
FCA-8+MTZ-1	34.78	9.45	25.34	37.20	49.29	17.79 ab
FCA-56+MTZ-1	33.96	8.94	29.66	36.60	47.17	18.66 ab
FCA-60+MTZ-1	34.82	9.36	26.40	35.60	49.38	17.25 ab
lima Rangpur						
Testigo	32.22 b	8.79	23.40	29.20	42.11	15.22
FCA-8	36.58 a	9.71	29.12	33.20	48.73	17.94
FCA-56	35.70 ab	9.47	25.70	33.00	47.17	17.40
FCA-60	35.36 ab	9.59	23.82	27.40	42.45	16.45
MTZ-1	35.92 ab	9.49	24.10	32.40	45.41	17.10
Mix	36.26 a	9.18	25.72	29.00	43.29	15.90
Mix+MTZ-1	35.34 ab	9.28	23.36	30.60	45.02	15.87
FCA-8+MTZ-1	34.62 ab	9.50	24.76	26.00	41.48	15.39
FCA-56+MTZ-1	35.74 ab	8.94	25.66	30.00	43.17	15.76
FCA-60+MTZ-1	34.68 ab	9.45	25.80	30.80	45.94	15.79

Mix= mezcla de las tres cepas rizobacterianas.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

3.3.2. Crecimiento de limón Persa promovido por la biofertilización con rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares

El análisis de varianza de parcelas divididas presentó diferencias significativas, para el modelo general ($P=0.0004$) y para la interacción portainjerto*tratamientos ($P=0.0316$). El análisis posterior de separación de medias por Tukey mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en las cinco variables de estudio. En el Cuadro 3.3 se muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la biofertilización individual y combinada sobre el crecimiento de limón Persa injertado en los portainjertos *C. volkameriana* y lima Rangpur, se encontraron diferencias significativas entre portainjertos ($P=0.0001$) en las variables altura de tallo, diámetro de tallo, área foliar, biomasa fresca y seca de planta, con superioridad de *C. volkameriana* sobre lima Rangpur.

El análisis de varianza posterior de tratamientos dentro de cada portainjerto mostró diferencias significativas ($P=0.0121$) para portainjerto *C. volkameriana*. Para los tratamientos se encontraron diferencias significativas en la variable biomasa seca de planta ($P=0.0184$). Al separar las medias por Tukey para biomasa seca de planta de limón Persa injertado sobre *C. volkameriana*, se encontró superioridad del tratamiento FCA-60, sobre los tratamientos MTZ-1 y FCA-56+MTZ-1 (Cuadro 3.4). La respuesta obtenida de limón Persa injertado en lima Rangpur no presentó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en ninguna de las variables de estudio (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.3. Promedios de las variables de crecimiento de limón Persa injertado sobre *C. volkameriana* y lima Rangpur biofertilizados con rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares, para las parcelas grandes.

Portainjerto	Altura de tallo (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Área foliar (cm ²)	Biomasa fresca de planta (g)	Biomasa seca de planta (g)
<i>C. volkameriana</i>	53.76 a	7.40 a	988.03 a	48.46 a	16.02 a
lima Rangpur	49.46 b	6.65 b	890.88 b	40.94 b	13.85 b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

Cuadro 3.4. Efecto de la biofertilización de rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares sobre el crecimiento del injerto limón Persa.

Tratamientos	Altura de tallo (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Área foliar (cm ²)	Biomasa fresca de planta (g)	Biomasa seca de planta (g)
<i>C. volkameriana</i> -limón Persa					
Testigo	49.56	6.97	935.38	46.47	15.97 ab
FCA-8	55.64	7.29	989.38	46.38	15.67 ab
FCA-56	53.24	7.16	883.48	43.79	14.96 ab
FCA-60	61.92	7.93	1213.38	61.15	20.92 a
MTZ-1	49.28	6.76	921.58	43.61	13.33 b
Mix	57.34	7.98	1111.34	52.93	17.72 ab
Mix+MTZ-1	47.72	7.36	1024.83	52.83	16.06 ab
FCA-8+MTZ-1	51.60	7.74	955.94	46.86	15.97 ab
FCA-56+MTZ-1	57.66	7.30	910.43	44.60	14.44 b
FCA-60+MTZ-1	53.68	7.48	934.54	45.98	15.21 ab
lima Rangpur-limón Persa					
Testigo	50.02	6.48	803.57	37.52	13.35
FCA-8	53.80	6.57	923.49	40.14	13.52
FCA-56	48.72	6.97	911.28	43.66	15.13
FCA-60	44.12	6.70	923.70	42.25	14.81
MTZ-1	52.62	6.76	952.23	45.13	15.34
Mix	49.48	6.77	812.82	40.92	12.84
Mix+MTZ-1	52.36	6.51	930.58	40.92	13.43
FCA-8+MTZ-1	46.76	6.52	859.49	38.87	13.40
FCA-56+MTZ-1	47.32	6.60	881.30	39.37	12.94
FCA-60+MTZ-1	49.40	6.63	910.20	40.56	13.76

Mix= mezcla de las tres cepas rizobacterianas.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

El aprovechamiento de biofertilizantes como rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares ha demostrado ser una alternativa potencial para mejorar el crecimiento y desarrollo de plantas en general, y de frutales en particular como los cítricos (Alarcón *et al.*, 2003; Berg, 2009). Al respecto, Rives *et al.* (2009) al evaluar el

potencial de cepas autóctonas de *P. putida* en el cultivo de arroz, reportan diferencias significativas en masa fresca y seca aérea. Tal y como sucedió en este estudio donde la cepa *P. putida* FCA-60 nativa de la rizósfera de *C. volkameriana* mostró diferencias significativas entre las biofertilizaciones evaluadas para las variables biomasa seca de planta del injerto limón Persa, las cuales sólo presentaron el 50 % de fertilización química (formula 18-46-00 N-P-K). Resultados similares reporta Santillana (2006) al evaluar el efecto de tres cepas nativas de *Pseudomonas* sp. en plantas de frijol y maíz, las cuales mostraron diferencias significativas en las variables materia seca de la parte aérea y de la raíz, respecto al testigo.

Aun cuando las biofertilizaciones combinadas de rizobacterias con hongos micorrizógenos, evaluadas en este estudio no destacaron considerablemente, diversos informes señalan la importancia de utilizar inoculaciones donde se asocien rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares, ya que las cualidades que cada tipo de microorganismo confiere a la planta de manera individual se podría potencializar en determinada etapa fenológica de la misma, cuando ambos tipos se combinan e interactúan en la rizósfera, produciendo un sinergismo positivo que impactaría en la mejora del crecimiento, desarrollo, rendimiento y sanidad de las plantas (Bever *et al.*, 2009; Lambers *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2009).

3.3.2.1. Contenido de nutrientes en hojas de limón Persa

El contenido nutrimental en la hoja de limón Persa fue afectada positivamente por la biofertilización con rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares, en el Cuadro 3.4 se muestran los contenidos de macronutrientes y micronutrientes cuantificados en los tratamientos evaluados.

En *C. volkameriana* con limón Persa el tratamiento MTZ-1 presentó los contenidos más altos de N (3.10 %) y P (0.24 %) superando los contenidos del testigo en 1.31 y 26.32 % respectivamente (Cuadro 3.4). El contenido de K fue mayor con la biofertilización combinada de la cepa FCA-56 con MTZ-1, tratamiento que mostró un

11.52 % más que el contenido obtenido con el testigo. En la determinación de microelementos los tratamientos con biofertilización individual y combinada presentaron los contenidos más altos. En Ca el tratamiento Mix (mezcla de las tres cepas rizobacterianas) presentó 57.74 % más que el testigo. Para Mg la mejor respuesta fue con los tratamiento FCA-8, Mix y FCA-56+MTZ-1 con 7.14 % respectivamente más que el testigo. El mayor contenido de Fe se presentó en el tratamiento FCA-56+MTZ-1, el cual destacó de manera considerable al obtener 89.14 % más que el testigo. Para los elementos Cu y Zn el mejor tratamiento fue la cepa FCA-56 al con 60.71 y 26.32 % respectivamente más que el testigo. El contenido de Mn fue mayor con FCA-8 al presentar 5.15 % más que el testigo.

Para lima Rangpur con limón Persa la biofertilización mejoró la asimilación de los macro y microelementos (Cuadro 3.4). En cuanto a los macroelementos, el contenido de N fue mayor con FCA-56, con 6.14 % arriba del testigo. La concentración de P fue mayor con los tratamiento Mix+MTZ-1 y FCA-8+MTZ-1, los cuales presentaron un incremento similar de 21.05 % respecto al testigo. El mayor contenido de K (1.96 %) fue con FCA-8, al mostrar un incremento respecto al testigo de 18.79 %. Para los microelementos (Cuadro 3.4), en Ca el mayor contenido se obtuvo con la combinación FCA-56+MTZ-1 la cual presentó un incremento del 104.65 % sobre el contenido del testigo. El mayor contenido de Mg fue para los tratamientos FCA-60 y Mix, los cuales mostraron un incremento similar del 15.15 % más que el testigo. Para Fe, la combinación de FCA-56+MTZ-1 mostró el mayor contenido, con un incremento del 77.27 % en comparación con el testigo. En Cu y Zn, el tratamiento FCA-8+MTZ-1 presentó el mayor contenido, superior al testigo en 33.33 y 9.52 %, respectivamente. En cuanto al contenido de Mn, el testigo presentó el mayor contenido.

Debido a las cualidades de las rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares, para fijar nitrógeno atmosférico, solubizar fósforo, producir reguladores del crecimiento vegetal y otros metabolitos que favorecen el vigor y sanidad de las plantas, estos microorganismos han sido ampliamente aprovechados para mejorar la nutrición de los cultivos y coadyuvar a reducir el uso de fertilizantes, ya que su

actividad influye sobre la rizósfera de las plantas, lo que mejora la absorción de macro y microelementos (Ryan *et al.*, 2009; Rigamonte *et al.*, 2010).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, en éste estudio la incorporación de rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares en el sistema radical de las plantas de *C. volkameriana* y lima Rangpur, estimularon la absorción de macro y microelementos en hojas del injerto limón Persa, suministrados a través de la fertilización química, la cual fue 50 % menor que la cantidad utilizada en las plantas testigo, de acuerdo al manejo técnico productivo implementado en el vivero “San Manuel”.

El creciente interés por los microorganismos benéficos en general y en particular por las rizobacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, entre otros. Para su incorporación en los sistemas de producción agrícolas, se debe principalmente a su fácil forma de aplicación, ya que pueden ser inoculados sobre la semilla, follaje, raíz o directamente en el suelo, sitios a través de los cuales una vez establecidos en la rizósfera de las plantas, estos se multiplican como respuesta a los exudados radicales secretados por la misma. Lo que provoca promoción del crecimiento vegetal y/o el control biológico de enfermedades de las plantas. Tales cualidades son el resultado de su agresiva capacidad de colonización del sistema radicular (Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Fernández-Herrera *et al.*, 2007; Santoyo *et al.*, 2010).

Cuadro 3.5. Influencia de la biofertilización de rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares en la composición nutrimental de la hoja de limón Persa .

Tratamientos	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
	-----%-----					-----mg kg ⁻¹ -----			
<i>C. volkameriana</i> -limón Persa									
Testigo	3.06	0.19	1.65	3.10	0.28	175	28	19	97
FCA-8	3.08	0.19	1.47	4.56	0.30	200	18	22	102
FCA-56	2.86	0.20	1.68	3.31	0.25	212	45	24	55
FCA-60	2.77	0.20	1.74	3.21	0.27	159	28	22	44
MTZ-1	3.10	0.24	1.71	3.06	0.29	205	30	23	48
Mix	2.83	0.21	1.78	4.89	0.30	210	32	21	43
Mix+MTZ-1	2.95	0.21	1.59	3.18	0.25	188	15	19	44
FCA-8+MTZ-1	2.97	0.21	1.71	3.40	0.29	231	23	23	66
FCA-56+MTZ-1	2.95	0.23	1.84	4.22	0.30	331	35	17	53
FCA-60+MTZ-1	3.07	0.21	1.78	3.11	0.26	205	24	21	59
lima Rangpur-limón Persa									
Testigo	2.93	0.19	1.65	2.15	0.33	132	30	21	70
FCA-8	2.94	0.18	1.96	2.61	0.25	120	30	16	43
FCA-56	3.11	0.19	1.95	2.86	0.29	143	37	19	42
FCA-60	2.99	0.20	1.90	3.77	0.38	140	33	22	38
MTZ-1	3.04	0.22	1.69	3.15	0.32	123	31	21	38
Mix	2.81	0.22	1.83	3.00	0.38	140	12	21	38
Mix+MTZ-1	2.99	0.23	1.51	2.86	0.32	200	21	23	43
FCA-8+MTZ-1	2.97	0.23	1.81	2.88	0.22	186	40	23	43
FCA-56+MTZ-1	2.77	0.21	1.47	4.40	0.30	234	27	21	43
FCA-60+MTZ-1	2.83	0.22	1.86	3.34	0.26	170	21	18	44

Mix= mezcla de las tres cepas rizobacterianas

Valores obtenidos de una muestra compuesta por cinco plantas por tratamiento.

3.3.3. Determinación de poblaciones rizobacterianas y colonización micorrízica

Al analizar las poblaciones rizobacterianas obtenidas de las biofertilizaciones individuales y combinadas, en el análisis de varianza de parcelas divididas, se encontraron diferencias significativas para tratamientos ($P=0.0001$). Al separar las medias de los tratamientos por Tukey, se presentaron diferencias significativas. Para *C. volkameriana* el tratamiento Mix (mezcla de las tres cepas rizobacterianas) más el consorcio MTZ-1, mostró la mayor población con 77.4×10^7 UFC g^{-1} de raíz. En lima Rangpur el tratamiento Mix presentó la mayor población con 78.4×10^7 UFC g^{-1} de raíz. En ambos portainjertos las diferencias significativas fueron entre las biofertilizaciones con rizobacterias, en lo individual como combinadas, respecto a los tratamientos testigo y MTZ-1 (Figura 3.1).

Las poblaciones rizobacterianas obtenidas en los tratamientos que implicaron la combinación de rizobacterias con el consorcio micorrizógeno, son un indicativo de que no existió una relación antagónica entre ambos microorganismos. Por el contrario, ambos tipos son capaces de complementarse y ser más efectivos cuando interactúan en la rizósfera de las plantas, interacción que puede ser selectiva y dependiente de acuerdo a la especie tanto de la bacteria como del hongo implicado (Terry y Leyva, 2006; Rigamonte *et al.*, 2010).

Las pocas poblaciones bacterianas cuantificadas en los tratamientos testigo y MTZ-1 (Figura 3.1), éstas no correspondieron a la especie en estudio *P. putida*. La presencia de tales poblaciones bacterianas no identificadas, posiblemente fue ocasionada por contaminación a través del agua de riego y prácticas culturales aplicadas a las plantas a lo largo del proceso productivo en vivero.

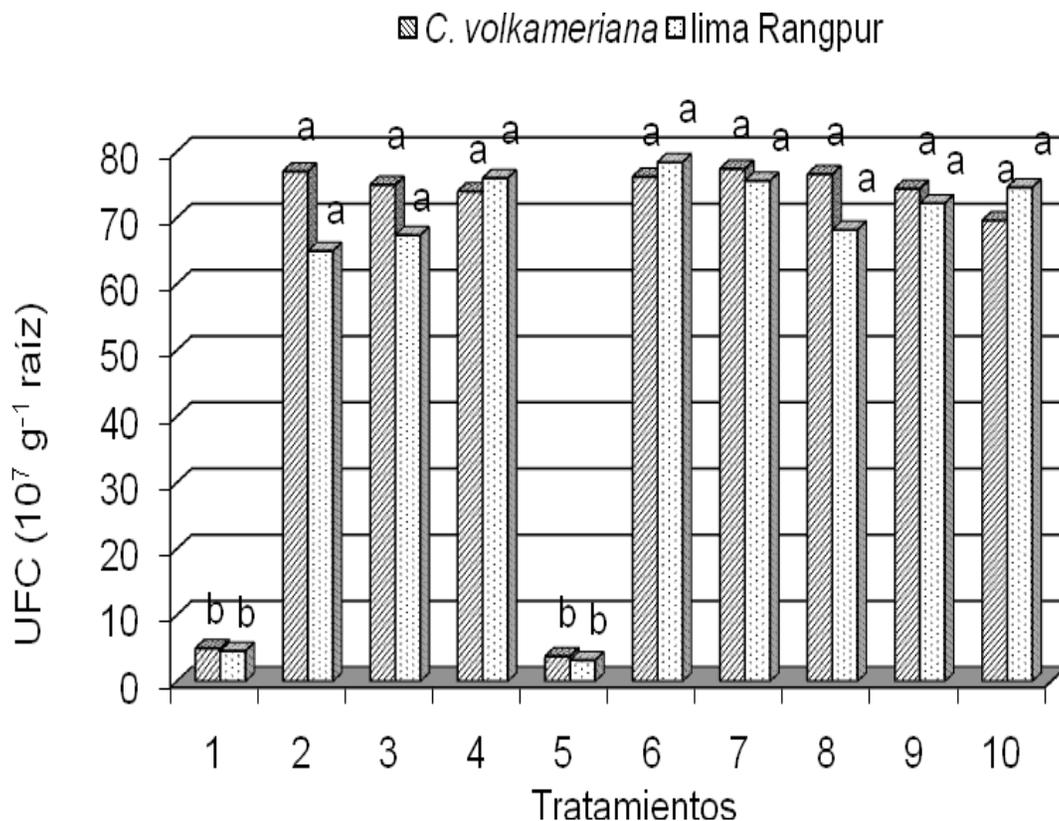


Figura 3.1. Poblaciones rizobacterianas de *Pseudomonas putida* cuantificadas en la rizósfera de *C. volkameriana* y lima Rangpur. 1)= Testigo, 2)= FCA-8, 3)= FCA-56, 4)= FCA-60, 5)= Consorcio MTZ-1, 6)= Mix (mezcla de las tres cepas rizobacterianas), 7)= Mix+MTZ-1, 8)= FCA-8+MTZ-1, 9)= FCA-56+MTZ-1 y 10)= FCA-60+MTZ-1. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

Por otra parte, el potencial benéfico de los hongos micorrizógenos arbusculares en las plantas está influenciado por su capacidad infectiva para colonizar el sistema radicular y establecer así una simbiosis mutualista con su hospedero. De acuerdo con esto, de los tratamientos evaluados que implicaron inoculación individual y combinada con el consorcio MTZ-1, los resultados del análisis de varianza para parcelas divididas mostró diferencias significativas para portainjerto ($P=0.0013$) y tratamientos ($P=0.0001$). Al separar las medias de los tratamientos por Tukey, éstas mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). En *C. volkameriana* se presentó la mayor colonización micorrízica total con 97.67 % con el tratamiento de inoculación individual MTZ-1. En contraste para lima Rangpur el mejor tratamiento fue la asociación ocurrida

entre Mix (mezcla de las tres cepas rizobacterianas) con MTZ-1, al obtener 63.80 % de colonización micorrízica total. En las plantas testigo y los tratamientos que implicaron la inoculación individual de rizobacterias y Mix no se encontró colonización micorrízica (Figura 3.2).

Fue notable cómo lima Rangpur mostró menores porcentajes de colonización en comparación con *C. volkameriana* (Figura 3.2), éste comportamiento puede relacionarse a la competencia que se da con las rizobacterias por espacio y exudados radicales, sin embargo la coexistencia de ambos microorganismos en el sistema radical de las plantas fue posible. De acuerdo con lo anterior, Berg (2009) menciona que entre las comunidades bacterianas y hongos micorrízicos arbusculares existe un sinergismo positivo, en donde en ocasiones alguno de los dos puede dominar la colonización de la rizósfera debido a su capacidad invasiva y efectiva para el rápido establecimiento de la relación simbiótica mutualista (Lambers *et al.*, 2009; Rigamonte *et al.*, 2010).

Contrario a la respuesta de lima Rangpur, *C. volkameriana* demostró mayor capacidad simbiótica con el consorcio MTZ-1 (Figura 3.2). De acuerdo con Tapia *et al.* (2010), esto depende de la habilidad infectiva y efectividad del hongo. El proceso infectivo se refiere a la capacidad del hongo para penetrar e invadir la raíz intensamente y explorar el suelo, así como su habilidad de persistir en el sistema productivo. Mientras que la efectividad del hongo se demuestra cuando mejora el desarrollo del hospedante, ya sea en forma directa o indirecta. Indirectamente al proteger contra patógenos del suelo y condiciones de estrés, así como incrementar la agregación y estabilidad del suelo, cualidades que promueven el desarrollo de hifas. La forma directa ocurre al mejorar la absorción de nutrientes como fósforo, zinc y cobre. Además de las habilidades del hongo, los factores ambientales y la especie vegetal, juegan un papel determinante para el establecimiento eficiente de la simbiosis (Berg, 2009; Bever *et al.*, 2009).

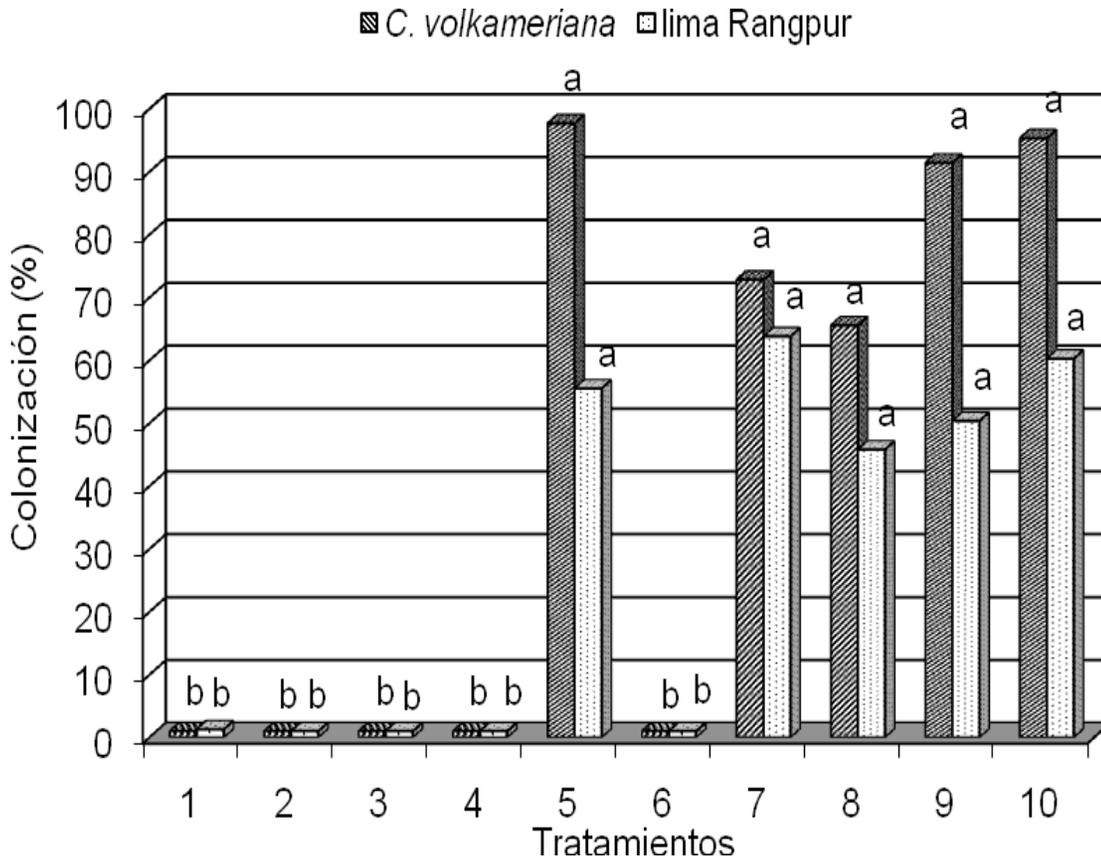


Figura 3.2. Colonización rizosférica del consorcio micorrizógeno MTZ-1 en *C. volkammeriana* y lima Rangpur. 1)= Testigo, 2)= FCA-8, 3)= FCA-56, 4)= FCA-60, 5)= Consorcio MTZ-1, 6)= Mix (mezcla de las tres cepas rizobacterianas), 7)= Mix+MTZ-1, 8)= FCA-8+MTZ-1, 9)= FCA-56+MTZ-1 y 10)= FCA-60+MTZ-1. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

3.3.4. Evaluación de la actividad antagónica de las cepas rizobacterianas y el consorcio micorrizógeno frente a *P. parasitica* en invernadero

Al evaluar el antagonismo *in vivo* de rizobacterias y hongos micorrizógenos arbusculares frente a la cepa CPT-12 de *P. parasitica*, se encontró que los tratamientos que confirieron actividad antagónica en *C. volkammeriana* fueron la biofertilización individual y combinada, en los cuales las plantas no fueron afectadas, en comparación con el testigo en el cual ocurrió la pérdida de una planta. Por su

parte, lima Rangpur fue más afectado por el patógeno al presentar un total de cuatro plantas eliminadas de las cuales dos correspondieron al testigo y una en los tratamientos FCA-56 y FCA-8 con MTZ-1.

En las plantas que toleraron la infección de *P. parasitica*, el tamaño de la lesión no presentó cambios de consideración, sólo se observó hundimiento de la corteza donde se colocó el patógeno (Figura 3.3). Por lo cual, el efecto antagónico que se pone de manifiesto entre los antagonistas rizobacterianos y el consorcio micorrizógeno frente a *P. parasitica*, podría estar relacionado con la producción de metabolitos de naturaleza antibiótica, como ácido salicílico, enzimas líticas, sideróforos, entre otros (Berg, 2009; Rives *et al.*, 2009; Lambers *et al.*, 2009). Estos factores generan condiciones desfavorables para el metabolismo y crecimiento de otro tipo de microorganismo, tal y como ocurrió con la cepa CPT-12.



Figura 3.3. Daño ocasionado por *P. parasitica* sobre la corteza de *C. volkameriana* biofertilizado con rizobacterias y el consorcio micorrizógeno.

3.4. Conclusiones

Se demostró que la biofertilización individual y combinada de las tres cepas rizobacterianas de *P. putida* y el consorcio micorrizógeno MTZ-1, estimulan positivamente el crecimiento de las plantas de *C. volkameriana*, lima Rangpur y limón Persa en vivero.

Las cepas de *P. putida* y el consorcio micorrizógeno en lo individual y combinados mejoraron el contenido nutrimental de hojas de limón Persa. Destacaron la cepa FCA-56 y el consorcio MTZ-1 para los contenidos de N y P asimilado por las plantas. Las tres cepas rizobacterianas favorecieron mayor absorción de macro y micronutrientes suministrados por fertilización química reducida a la mitad.

Las cepas de *P. putida* mostraron una mayor capacidad de colonización en la rizósfera de *C. volkameriana* y lima Rangpur en lo individual y combinadas con el consorcio micorrizógeno, éste último mostró mejor simbiosis micorrízica con *C. volkameriana* en lo individual y asociado con las cepas FCA-56 y FCA-60.

La biofertilización individual y combinada de las cepas rizobacterianas y el consorcio micorrizógeno asociados a la rizósfera de *C. volkameriana* y lima Rangpur mostraron capacidad antagónica frente a *P. parasitica in vivo*.

3.5. Literatura citada

- Agustí, M. 2003. Citricultura. Segunda edición. Mundi-Prensa. Madrid, España. 416 p.
- Alarcón, A., M. C. González-Chávez y R. Ferrera-Cerrato. 2003. Crecimiento y fisiología de Citrus volkamerina Tan. & Pasq. en simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares. Terra Latinoamericana 21(4): 503-511.
- Amorim, E. P. R. e I. S. Melo. 2002. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. Revista Brasileira de Fruticultura 24(2): 565-568.

- Barea, J. M., M. J. Pozo, R. Azcón and C. Azcón-Aguilar. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56(417): 1761-1778.
- Bashan, Y., G. Holguín y R. Ferrera-Cerrato. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra* 14(2): 159-192.
- Berg, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84(1): 11-18.
- Bever, J. D., S. C. Richardson, B. M. Lawrence, J. Holmes and M. Watson. 2009. Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology Letters* 12(1): 13-21.
- Bhattacharjee, R. B., A. Sing and S. N. Mukhopadhyay. 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertilizer for non-legumes: Prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80(2): 199-209.
- Biermann, B. J. and R. G. Linderman. 1981. Quantifying vesicular arbuscular mycorrhizae. A proposed method towards standardization. *New Phytologist* 87(1): 63-67.
- Castro-Sowinski, S., Y. Herschkovitz, Y. Okon and E. Jurkevitch. 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 276(1): 1-11.
- Curti-Díaz, S. A., X. Loredó-Salazar, U. Díaz-Zorrilla, J. A. Sandoval R. y J. Hernández H. 2000. Tecnología para producir limón Persa. Libro Técnico No. 8. INIFAP-CIRGOC SAGAR. Campo Experimental Ixtacuaco. Veracruz, México. 144 p.
- Díaz V., P., R. Ferrera-Cerrato, J. J. Almaraz-Suárez y G. Alcántar González. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra Latinoamericana* 19(4): 327-335.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2009. Frutos cítricos frescos y elaborados. Estadísticas anuales. <http://.faostat.fao.org> (Consulta diciembre 2010).
- Fernández-Herrera, E., M. Acosta-Ramos, F. Ponce-González y V. Manuel-Pinto. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(1): 35-42.
- Garrity, G. M., A. J. Bell and T. Lilburn. 2005. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Second edition. Vol. 2. The Proteobacteria Part B. The Gammaproteobacteria. Springer-Verlag. New York, USA. pp. 323-377.

- Gravel, V., H. Antoun, J. Russell and T. Weddell. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry* 39(8): 1968-1977.
- Javier-Alva, J. y L. Mattos. 2006. Nuevo método para aislar *Phytophthora parasitica* Dastur de raicillas de limonero patrón Rugoso *Citrus jambhiri* Lush. bajo riego por aspersión. *Universalía* 11(1): 23-35.
- Lambers, H., C. Mougél, B. Jaillard and P. Hinsinger. 2009. Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: An evolutionary perspective. *Plant and Soil* 321(1-2): 83-115.
- Leach, A. W. and J. D. Mumford. 2008. Pesticide environmental accounting: A method for assessing the external costs of individual pesticide applications. *Environmental Pollution* 151(1): 139-47.
- Nihorimbere, V., M. Ongena, H. Cawoy, Y. Brostaux, P. Kakana, E. Jourdan and P. Thonart. 2010. Beneficial effects of *Bacillus subtilis* on field-grown tomato in Burundi: Reduction of local *Fusarium* disease and growth promotion. *African Journal of Microbiology Research* 4(11): 1135-1142.
- Pérez, J. y M. Casas. 2005. Estudio de la interacción Plata-*Azospirillum* en el cultivo caña de azúcar (*Saccharum* sp.). *Cultivos Tropicales* 26(4): 13-19.
- Phillips, J. M. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Journal Transactions of the British Mycological Society* 55(1): 158-161.
- Rebolledo R., H. H. 2002. Manual SAS por computadora: Análisis estadístico de datos experimentales. Editorial Trillas. México. 208 p.
- Rezusta, L. A., S. A. Sánchez y T. J. Gil. 2001. Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico. Asociación Española de Micología. *Revista Iberoamericana de Micología* 3: 1-17.
- Richardson, A. E., J. M. Barea, A. M. McNeill and C. Prigent-Combaret. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321(1-2): 305-339.
- Rigamonte, T. A., V. S. Pylro and G. F. Duarte. 2010. The role of mycorrhization helper bacteria in the establishment and action of ectomycorrhizae associations. *Brazilian Journal of Microbiology* 41(4): 832-840.

- Rives, N., Y. Acebo y A. Hernández. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.), perspectivas de su uso en cuba. *Cultivos Tropicales* 28(2): 29-38.
- Rives, N., Y. Acebo, M. Almaguer, J. C. García y A. Hernández. 2009. Actividad antagonica frente a *Pyricularia grisea* (Sacc.) y fitoestimulación en el cultivo del arroz de cepas autóctonas de *Pseudomonas putida* (Trev.). *Revista de Protección Vegetal* 24(2): 106-116.
- Rondón, A., G. Hung, F. Reyes y R. Solorzano. 1993. Reacción de patrones cítricos a *Phytophthora nicotianae* B. De Haan. Var. *Parasitica* (Dastur) Waterh, en condiciones de umbráculo. *Agronomía Tropical* 43(3-4): 117-125.
- Russián, T. y J. Oropeza. 2008. Evaluación en vivero de tres patrones para el desarrollo de la naranja 'criolla' en el sector macanillas-curimagua. *Agronomía Tropical* 58(4): 345-350.
- Ryan, P. R., Y. Dessaux, L. S. Thomashow and D. M. Weller. 2009. Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant and Soil* 321(1-2): 363-383.
- Ryan, R. P., K. Germaine, A. Franks, D. J. Ryan and D. N. Dowling. 2008. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278(1): 1-9.
- Santoyo, G., E. Valencia-Cantero, M. C. Orozco-Mosqueda, J. J. Peña-Cabriales y R. Farías-Rodríguez. 2010. Papel de los sideróforos en la actividad antagonica de *Pseudomonas fluorescens* zum80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana* 28(1): 53-60.
- Santillana Villanueva, N. 2006. Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecología Aplicada* 5(1-2): 87-91.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2009. Anuario estadístico de la producción agrícola. Limón y Naranja. <http://www.limonmexicano.gob.mx/index.php?portal=limon>; <http://www.naranja.gob.mx/index.php?portal=naranja> (Consulta enero 2011).
- Song, M., X. Xu, Q. Hu, Y. Tian, H. Ouyang and C. Zhou. 2007. Interactions of plant species mediated plant competition for inorganic nitrogen with soil microorganisms in an alpine meadow. *Plant and Soil* 297(1-2): 127-137.

- Tapia-Goné, J. J., R. Ferrera-Cerrato, L. Varela-Fregoso, J. C. Rodríguez-Ortiz, J. C. Soria-Colunga, M. A. Tiscareño-Iracheta, C. Loredó-Osti, J. Alcalá-Jáuregui y C. Villar-Morales. 2010. Infectividad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares nativos de suelos salinos en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*). *Revista Mexicana de Micología* 31: 69-74.
- Terry A., E. y A. Leyva G. 2006. Evaluación agrobiológica de la inoculación micorrizas-rizobacterias en tomate. *Agronomía Costarricense* 30(1): 65-73.
- Van Loon, L. C. 2007. Plant responses to plant growth promoting bacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119(3): 243-254.
- Vogelsang, K. M., H. L. Reynolds and J. D. Bever. 2006. Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytologist* 172(3): 554-562.
- Wang, B. and Y. L. Qiu. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16(5): 299-363.
- Zulueta Rodríguez, R., L. Varela, S. Aguilar Espinosa, D. Trejo Aguilar y L. Lara Capistrán. 2010. Estatus micorrízico de *Jacaratia mexicana* y hongos formadores de micorriza arbuscular presentes en selvas bajas caducifolias del Golfo de México. *Revista Mexicana de Micología* 31: 37-44.

CONCLUSIONES GENERALES

Las siete cepas rizobacterianas del género *Pseudomonas* spp. presentaron actividad antagónica sobre *P. parasitica in vitro*, cualidad manifestada por la restricción del crecimiento micelial, destacando por su potencial antagonista las cepas FCA-8 y FCA-56 de la especie *P. putida*.

Secuencias consenso de 315, 365 y 370 nucleótidos obtenidas en las cepas FCA-8, FCA-56 y FCA-60 respectivamente, permitieron determinar el porcentaje de homología molecular con las secuencias depositadas en la base de datos del Genbank para las tres cepas, con una correspondencia del 100 % de similitud con la especie *Pseudomonas putida*.

La técnica molecular de PCR y secuenciación en comparación con los métodos tradicionales de identificación microbiológica, ofrecen precisión, sensibilidad y confiabilidad en la manipulación del ADN, para el proceso de diagnóstico e identificación de microorganismos.

La biofertilización individual y combinada de las cepas rizobacterianas FCA-8, FCA-56 y FCA-60 de *P. putida* y el consorcio micorrizógeno MTZ-1 estimulan positivamente el crecimiento de las plantas de *C. volkameriana*, lima Rangpur y limón Persa en el esquema técnico-productivo del vivero certificado "San Manuel". Las tres cepas de *P. putida* y el consorcio micorrizógeno en lo individual y combinados promovieron el mayor contenido nutrimental en hojas de limón Persa. Actividad metabólica que se puso de manifiesto al estimular una mejor absorción de macro y micronutrientes suministrados a través de la fertilización química utilizada por el vivero.

Las cepas de *P. putida* mostraron una alta capacidad de colonización en la rizósfera de *C. volkameriana* y lima Rangpur, en lo individual y combinadas con el consorcio micorrizógeno, éste último mostró mejor simbiosis micorrízica con *C. volkameriana* en lo individual y asociado con las cepas FCA-56 y FCA-60. Así mismo, la biofertilización

individual y combinada de las cepas rizobacterianas y el consorcio micorrizógeno mostraron capacidad antagónica frente a *P. parasitica in vivo*.

La asociación de microorganismos benéficos como las rizobacterias *P. putida* y hongos micorrizógenos arbusculares, representan una alternativa viable para la promoción del crecimiento vegetal, absorción de nutrientes y control biológico de *P. parasitica* en plantas de cítricos.