



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

INOCULACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL EN PEPINO (*Cucumis sativus* L.)

ELVIA PEREZ ROSALES

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2012

La presente tesis titulada: **Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en pepino (*Cucumis sativus* L.)** realizada por la alumna Elvia Perez Rosales bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Juan José Almaraz Suarez

DIRECTOR DE TESIS



Dr. Onécimo Grimaldo Juárez

ASESOR



Dr. Alejandro Alarcón

ASESOR



Dr. Oscar Antonio Arana Coronado

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril de 2012

INOCULACIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL EN PEPINO (*Cucumis sativus* L.)

RESUMEN

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) estimulan el crecimiento y rendimiento de algunos cultivos a través de mecanismos como: síntesis de fitohormonas, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos y control de fitopatógenos. El objetivo central de este trabajo fue evaluar la respuesta de pepino (*Cucumis sativus* L.) a la inoculación con RPCV. Para cumplir con este objetivo se realizaron cinco experimentos. El primero consistió en determinar el efecto de la inoculación de cuatro cepas de rizobacterias: *Pseudomonas tolaasi* (P61), *P. tolaasi* (A46), *Bacillus pumilus* (R44) y *Microbacterium paraoxydans* (P21) en el crecimiento de plántulas de pepino. El tratamiento donde se coinocularon las cepas A46+R44 tuvo la mayor altura de plántula (32.33 cm) y área foliar (237 cm²), mientras que los tratamientos R44 y P21+P61 obtuvieron los valores más altos de longitud de raíz con 11.23 y 9.93 cm, respectivamente. El segundo experimento se llevó a cabo para evaluar la respuesta del rendimiento de pepino a la inoculación con rizobacterias bajo un sistema de fertirriego. Los tratamientos utilizados fueron tres cepas (A46, P61 y R44) y un testigo sin inoculación en combinación con tres dosis de fertilizante. Las plantas que fueron inoculadas con la cepa **P. tolaasii** (A46) con una dosis de fertilizante del 100% fueron las que obtuvieron el mayor crecimiento y rendimiento en comparación con el testigo. A dosis cero de fertilizante la inoculación incrementó el rendimiento, pero al aumentar la dosis de fertilizante a 50% la respuesta en el rendimiento de las plantas a la inoculación disminuyó, y al 100% de fertilizante la inoculación no aumentó el rendimiento en tratamientos como P61 y R44, no obstante el tratamiento A46 mostró solo un pequeño incremento. El objetivo del tercer experimento fue evaluar el efecto de la inoculación con una cepa de RPCV en la calidad de fruto de pepino bajo tres regímenes de fertilización (100%, 50% y 0%). La inoculación favoreció los sólidos solubles totales y aumentó ligeramente la acidez del fruto, además las plantas inoculadas presentaron frutos con mayor cantidad de fósforo en comparación con el testigo. El cuarto experimento consistió en evaluar la capacidad antagonista de cuatro cepas de rizobacterias contra *Fusarium oxysporum* y *Alternaria* sp. Las dos cepas de **P. tolaasii** (A46 y P61) inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* (36.5 y 20 % respectivamente) y *Alternaria* sp. (53.8 y 55.4 %, respectivamente) mientras que las otras dos cepas bacterianas no tuvieron efecto sobre el crecimiento de los hongos. El objetivo del último trabajo fue realizar un análisis económico-financiero de la producción de pepino en invernadero basado en fertilización mineral y biofertilizantes. Para lo cual se llevó a cabo un análisis financiero de la producción de pepino con base a un 100% de fertilización mineral, los costos fueron los representativos para el Valle de Mexicali. El ingreso total neto para la producción de pepino basado en fertilizante mineral+biofertilizante fue 25% más alto que el tratamiento de fertilización mineral, indicando que la inoculación de rizobacterias, desde un punto de vista económico es rentable.

Palabras clave: Trasplante, hortalizas, calidad de fruto, antagonismo, análisis económico-financiero.

INOCULATION WITH PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA IN CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.)

ABSTRACT

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) stimulate growth and yield of some crops through several mechanisms such as synthesis of phytohormones, nitrogen fixation, solubilization of phosphates, siderophore production and control of plant pathogens. The main objective of this study was to evaluate the response of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to inoculation with PGPR. Five experiments were conducted in Mexicali, Baja California; the first one was carried out in order to determine the effect of four strains of rhizobacteria (*Pseudomonas tolaasi* (P61), *P. tolaasi* (A46), *Bacillus pumilus* (R44) and *Microbacterium paraoxydans* (P21)) on cucumber seedling growth. Treatment with strains A46+R44 had the highest seedling height (32.33 cm) and the biggest leaf area (237 cm²), while the treatments R44 and P21+P61 had higher values of root length with 11.23 and 9.93 cm, respectively compared with the control. The second experiment was conducted to evaluate yield response of cucumber to inoculation with PGPR under a fertigation system. The treatments consisted in three rhizobacteria strains (A46, P61 and R44) and a control without inoculation, all of them with three doses of fertilizer (0, 50 and 100 % of full fertilization rate). Plants inoculated with *P. tolaasii* (A46) under a fertilizer dose of 100%, had the highest growth and yield. At level of zero fertilizer inoculation increased plant yield, but when the fertilization increased at 50% of the full rate plant yield response to inoculation decreased, and at 100% of full fertilizer rate yield response to inoculation with strains P61 and R44 was not significant, except with A46 which showed only a light effect. The objective of the third experiment was to evaluate the effect of inoculation with a strain of PGPR on fruit quality of cucumber at three fertilization regimes (0, 50 and 100% of full rate) under a fertigation system. Inoculation significantly increased total soluble solids and had slightly effect on fruit acidity, also fruits of inoculated plants showed greater levels of phosphorus compared with the control. The objective of the fourth experiment was to evaluate the antagonistic capacity of four strains of PGPR against *Fusarium oxysporum* and *Alternaria* sp. Both strains of *P. tolaasii* (A46 and P61) inhibited mycelial growth of *F. oxysporum* (36.5 and 20% respectively) and *Alternaria* sp. (53.8 and 55.4% respectively) while the other two bacterial strains had no effect on fungal growth. The aim of the last work was to conduct a financial and economic analysis of the production of greenhouse cucumber based on mineral fertilizers and combinations of biofertilizers+fertilizers. The financial analysis of cucumber production was based on a 100% mineral fertilization and estimated costs were representative of the Mexicali Valley. The total net income for the production of cucumber based on mineral fertilization+biofertilizer was 25% higher than mineral fertilizer, indicating that the inoculation of rhizobacteria at 100% of the fertilization rate is economically profitable.

Keywords: Transplanting, vegetables, fruit quality, antagonism, economic and financial analysis.

No te preocupes tanto por lo que no tienes,
ocúpate por engrandecer lo que tienes.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Colegio de Posgraduados por haberme permitido cumplir una meta más en mi vida y ser parte de su comunidad.

Al Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California por haberme permitido realizar parte de mi investigación, en esta institución.

Al Dr. Juan José Almaráz Suarez, por haberme incursionado a los microorganismos del suelo, por su conocimiento, su paciencia y apoyo en la realización de este trabajo y principalmente por enseñarme una forma más de salvar al mundo.

Al Dr. Onécimo Grimaldo Juárez, por su asesoría en la elaboración de esta tesis, por su enseñanza en el invernadero, por su comprensión y apoyo en todo momento y en especial por hacer mi estancia en Mexicali más agradable.

Al Dr. Alejandro Alarcón, por la revisión y sugerencias en la realización de esta tesis y por sus enseñanzas en clase y laboratorio.

Al Dr. Oscar Antonio Arana Coronado, por su contribución en la elaboración de este trabajo y observaciones aportada, además de haberme apoyado en la realización de uno de los objetivos de mi tesis, que para mí un fue reto en mi vida.

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato, por permitirme ser parte del área de microbiología del suelo y por enseñarme a querer a los microorganismos.

Al Dr. Daniel Gonzáles Mendoza, por facilidades otorgadas para la utilización del laboratorio de Biotecnología Agrícola del ICA, y por todos los consejos que me brindó al realizar este trabajo.

A la Dra. Lourdes Cervantes Díaz, por haberme ayudado a la realización de uno de los capítulos de esta tesis, y por su instrucción en el manejo de hongos patógenos.

A la M. en C. María Encarnación Lara Hernández, por su apoyo brindado en el laboratorio de Microbiología del suelo.

A dos personas que me dieron la oportunidad de conocerlas y hacerme su amiga, Cristina Heredia y Yesica Gonzáles, gracias por haberme apoyado en las situaciones alegres, y difíciles en mi vida.

A mis compañeros de laboratorio, por hacerme tan amenos los momentos de trabajo: Claudia, Alejandra, Blanca, Yadira, Esther, Judith, Esmeralda, Miguel Ángel y Mario.

A los señores del laboratorio de microbiología del suelo, por su apoyo brindado en mi estancia: Manuel, Fernando, Mundo y Lorenzo.

A los nuevos amigos que conocí en Mexicali: Karina, Emmanuel, Aura, Juan, Martin, David, Estela y Blanca.

Al señor Armando, por haberme ayudado y enseñado muchas cosas sobre cuidados de plantas en el invernadero, por los muestreos a los que asistió y por su ayuda en la obtención de datos.

A María José, Lourdes y Sandra, por brindarme su amistad incondicional en toda mi vida.

DEDICATORIA

A Dios, por iluminar siempre mi camino y no dejarme sola en todo momento.

A mi Madre, por apoyarme en cada decisión que he tomado, por ser la persona más fuerte que conozco y sobre todo por enseñarme que en esta vida uno tiene que luchar por lo que más quiere.

Al ser más hermoso de mi vida, mi hermana Ely, por darme tu apoyo y en especial por enseñarme que en la vida hay muchos obstáculos, pero si se quiere uno puede pasar por ellos sin problemas, además por ser la hermana que cualquiera quisiera tener.

A mi hermano Alejandro, por ser una guía en mi camino, tanto profesionalmente como personalmente, además por darme la fuerza que yo necesitó.

A Vanessa y Alexandra, por ser la nueva alegría de mi familia, por ser unos angelitos a los cuales quiero mucho.

A Virginia, por su apoyo y consejos, en algunos momentos de mi vida.

A toda mi familia, por ser un apoyo incondicional en cualquier travesía de mi vida.

Este y todos los logros que realice serán dedicados a ustedes.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
Agradecimientos	IV
Dedicatoria	VI
Índice general	i
Índice de cuadros	iii
Índice de figuras	v
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Objetivos e hipótesis	3
Capítulo 3. Revisión de literatura	5
3.1. Rizosfera.....	5
3.2. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	6
3.2.1. Fijación de nitrógeno por RPCV.....	7
3.2.2. Bacterias solubilizadoras de fosfatos.....	9
3.3. Producción de fitohormonas por RPCV.....	11
3.3.1. Bacterias productoras de auxinas.....	11
3.3.2. Bacterias productoras de giberelinas.....	14
3.3.3. Bacterias productoras de citocininas.....	17
3.4. Bacterias productoras de antibiosis.....	18
3.5. El cultivo de pepino.....	19
3.5.1. Requerimientos ambientales.....	20
3.6. Justificación.....	21
3.7. Literatura citada.....	22
Capítulo 4. Efecto de cuatro cepas de rizobacterias en el crecimiento y nutrición de plántulas de pepino	27
4.1. Resumen.....	27
4.2. Abstract.....	28
4.3. Introducción.....	29
4.4. Material y métodos.....	30
4.5. Resultados y discusión.....	32
4.6. Conclusiones.....	34
4.7. Literatura citada.....	38
Capítulo 5. Inoculación de rizobacterias en la producción de pepino bajo un sistema de fertirriego en invernadero	41
5.1. Resumen.....	41
5.2. Abstract.....	42
5.3. Introducción.....	43
5.4. Material y métodos.....	44
5.5. Resultados y discusión.....	49
5.6. Conclusiones.....	59
5.7. Literatura citada.....	60

Capítulo 6. Efecto de la inoculación con <i>Pseudomonas tolaasii</i> y la fertilización en la calidad de fruto de pepino (<i>Cucumis sativus</i>).....	63
6.1. Resumen.....	63
6.2. Abstract.....	64
6.3. Introducción.....	65
6.4. Material y métodos.....	66
6.5. Resultados y discusión.....	68
6.6. Conclusiones.....	71
6.7. Literatura citada.....	72
Capítulo 7. Capacidad antibiótica de cuatro cepas de rizobacterias hacia hongos fitopatógenos.....	74
7.1. Resumen.....	74
7.2. Abstract.....	75
7.3. Introducción.....	76
7.4. Material y métodos.....	77
7.5. Resultados y discusión.....	78
7.6. Conclusiones.....	82
7.7. Literatura citada.....	83
Capítulo 8. Análisis económico-financiero comparativo de la producción de pepino mediante el uso de biofertilizante y fertilización mineral.....	85
8.1. Resumen.....	85
8.2. Abstract.....	86
8.3. Introducción.....	87
8.4. Material y métodos.....	88
8.5. Resultados y discusión.....	92
8.6. Conclusiones.....	101
8.7. Literatura citada.....	102
Capitulo 9. Conclusiones generales.....	103

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 3.1. Estados de la República Mexicana con mayor producción de pepino de acuerdo a las estadísticas de SIAP.	20
Cuadro 4.1. Efectos de la inoculación de cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en las respuestas de crecimiento de plántulas de pepino (<i>Cucumis sativus</i> cv. Alcazar) 30 días después de la siembra.	34
Cuadro 5.1. Análisis químico del suelo utilizado en el experimento	45
Cuadro 5.2. Dosis de fertilizante utilizando durante el experimento	47
Cuadro 5.3. Efectos de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en área foliar, altura, contenido de clorofila (SPAD), y fosfatos y nitratos en peciolo de pepino (<i>Cucumis sativus</i> cv. Alcazar) a 55 días después del trasplante.	56
Cuadro 5. 4. Efecto de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en el rendimiento de frutos de pepino (<i>Cucumis sativus</i> cv. Alcazar).	57
Cuadro 6.1. Dosis de fertilizante utilizando durante el experimento	67
Cuadro 6.2. Efectos de la inoculación de RPCV en pH, sólidos solubles totales (SST), acidez titulable (AT) y relación SST/AT de frutos de pepino (<i>Cucumis sativus</i> cv. Alcazar).	69
Cuadro 6.3. Efectos de la inoculación con RPCV en la concentración de ortofosfatos y nitratos en frutos de pepino (<i>Cucumis sativus</i> cv. Alcazar).	70
Cuadro 7.1. Inhibición del crecimiento del micelio de <i>Fusarium oxisporum</i> y <i>Alternaria</i> sp. <i>in vitro</i> causada por cuatro cepas de rizobacterias, después de siete días.	79
Cuadro 8.1. Dosis de fertilizante utilizando durante el experimento	90
Cuadro 8.2. Análisis químico del suelo	91
Cuadro 8.3. Efecto de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal y fertilización en el rendimiento de frutos de pepino (<i>Cucumis sativus</i> cv. Alcazar).	93
Cuadro 8.4. Costos de inversión inicial para la construcción de un invernadero (1000 m ²)	94
Cuadro 8.5. Costos variables para la producción de pepino en una superficie de 1000 m ²	95
Cuadro 8.6. Costos totales de la producción de pepino en una superficie de 1000 m ²	96

Cuadro 8.7.	Ingresos brutos obtenidos de pepino	97
Cuadro 8.8.	Ingreso neto obtenido para producción de pepino (1000 m ²)	97
Cuadro 8.9.	Comparación económica de la producción de pepino con dos sistemas basados con fertilización (biofertilizante y fertilizante mineral) a tres dosis de fertilizante (1000 m ²).	99
Cuadro 8.10.	Evaluación económica de los proyectos.	100

Índice de figuras

	Página
Figura 3.1. Rutas de la biosíntesis del ácido indol-3-acético, descritas en bacterias. Diagrama modificado de Jankiewicz y Acosta-Zamudio (2003).	13
Figura 3.2. Ruta la biosíntesis de giberelinas en <i>Azospirillum</i> sp. basado en lo que ocurre en plantas vasculares y hongos (Bottini <i>et al.</i> , 2004).	16
Figura 4.1. Efecto de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en la concentración de NO_3^- y K^+ en tallos de plántulas de pepino.	35
Figura 4.2. Efecto de la inoculación de cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en la concentración de fósforo en tallos de plántulas de pepino.	36
Figura 5.1. Población de microorganismos en el suelo del invernadero antes del establecimiento del experimento.	50
Figura 5.2. Población bacteriana presente en la rizosfera de plántulas de pepino en almacigo a los 25 días después de la siembra.	51
Figura 5.3. Altura de plántulas de pepino (A y B) en almacigo con la inoculación de tres cepas de rizobacterias a los 25 días después de la siembra.	52
Figura 5.4. Población de bacterias presentes en la rizosfera de pepino a los 40 días después del transplante (etapa de floración). A) Bacterias totales, B) Bacterias solubilizadoras de fosfato.	54
Figura 5.5. Efectos de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en el rendimiento de pepino (<i>Cucumis sativus</i> cv. Alcazar).	59
Figura 7.1. Ensayo <i>in vitro</i> de la inhibición del crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> . A) <i>Pseudomonas tolaasii</i> (A46); B) <i>Pseudomonas tolaasii</i> (P61); C) <i>Microbacterium paraoxydans</i> (P21) y D) <i>Bacillus pumilus</i> (R44); E) Testigo (crecimiento del hongo sin bacteria).	80
Figura 7.2. Ensayo <i>in vitro</i> de la inhibición de micelio de <i>Alternaria</i> sp. A) <i>Pseudomonas tolaasii</i> (A46); B) <i>Pseudomonas tolaasii</i> (P61); C) <i>Microbacterium paraoxydans</i> (P21) y D) <i>Bacillus pumilus</i> (R44); E) Testigo (crecimiento del hongo sin bacteria).	81

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los fertilizantes son componentes esenciales en la agricultura moderna, ya que proporcionan los nutrientes que las plantas necesitan, sin embargo, el uso excesivo de éstos causan daños en el ambiente (Adesemoye *et al.*, 2010). Un ejemplo de lo anterior es la “zona muerta” del Golfo de México, donde el exceso de fertilizantes es lixiviado y llevado a la desembocadura del río Mississippi causando una área sin vida (Adesemoye *et al.*, 2009). Los fertilizantes en la actualidad son energéticamente costosos y su producción requiere el uso de combustibles fósiles que contribuyen a la emisión de gases de efecto invernadero (Mia *et al.*, 2010). Además el uso excesivo de éstos contribuye al deterioro de la calidad del suelo, siendo esto claramente insostenible (Kang *et al.*, 2009), por lo que se tienen que buscar alternativas para tener una agricultura más sustentable que incrementen el aprovechamiento de los fertilizantes, ya que en la actualidad la mayor parte se lixivia (aproximadamente 40% del nitrógeno, entre 50% y 60% del fósforo y 40% potasio), situación que constituye un problema agronómico, económico y ambiental no resuelto en los sistemas de cultivos tradicionales (Suniaga *et al.*, 2008).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) pueden mejorar la capacidad de absorción de nutrientes, favorecer la germinación de semillas (Gül *et al.*, 2008), estimular el crecimiento y el rendimiento de cultivos como pimiento y tomate (Mena-Violante y Olalde-Portugal, 2007) y mejorar la calidad de fruto en su apariencia (tamaño, forma, color, brillo), textura (firmeza, frescura), sabor, y valor nutritivo (Aghili *et al.*, 2009). Además, las RPCV son importantes en el reciclaje de nutrientes, en la descomposición de materia orgánica y en la estructura del suelo (Shen *et al.*, 2008). En la actualidad la diversidad RPCV ha sido alterada por el aumento de la fertilización química y por el uso intensivo de la tierra (Shen *et al.*, 2010).

El cultivo de pepino es uno de los más importantes a nivel mundial (Eifediyi y Remison, 2010); por ejemplo, en México es uno de los más rentables con un valor promedio de la producción de 1331.6 millones de pesos; no obstante, este cultivo demanda alta cantidad de fertilizantes (Mohammadi y Omid, 2010). Son muy pocos los estudios enfocados a la utilización de RPCV en este tipo de cultivos (Han *et al.*, 2006). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la inoculación de RPCV en pepino, manejado en un sistema protegido en el Valle de Mexicali con diferentes niveles de fertilización química, así mismo realizar la evaluación económica-financiera de la producción de pepino basado en fertilización mineral y en la inoculación con rizobacterias.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la respuesta de pepino (*Cucumis sativus* L.) a la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la inoculación de rizobacterias en la calidad de plántulas de pepino.
- Evaluar la respuesta de pepino (*Cucumis sativus* L.) a la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en un sistema de fertirriego bajo invernadero.
- Evaluar el efecto de la inoculación con rizobacterias en la calidad de los frutos de pepino (*Cucumis sativus* L.).
- Evaluar la capacidad antagónica de cuatro cepas de rizobacterias contra *Fusarium oxysporum* y *Alternaria* sp. en pruebas de cultivo dual en condiciones *in vitro*.
- Realizar un análisis económico-financiero de la producción de pepino en invernadero basado en fertilización mineral y aplicación de biofertilizantes.

HIPÓTESIS GENERAL

- La inoculación de rizobacterias promotoras de vegetal aumentará el crecimiento y rendimiento de pepino (*Cucumis sativus* L.).

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- La inoculación de rizobacterias mejora la calidad de plántulas en relación a su crecimiento y nutrición mineral.
- Las dosis de fertilización mineral en *Cucumis sativus* L. pueden reducirse con el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal sin detrimento del rendimiento.
- La inoculación de rizobacterias mejora la calidad de fruto en pepino (*Cucumis sativus*).
- Las cepas de de rizobacterias usadas en el presente estudio tienen actividad antagonista contra *Fusarium oxysporum* y *Alternaria* sp.
- Los beneficios económicos-financieros serán mayores al usar rizobacterias promotoras del crecimiento en *Cucumis sativus* en comparación con el uso de la fertilización química.

CAPÍTULO 3

REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Rizosfera

El suelo es uno de los recursos más utilizados en la agricultura para satisfacer las necesidades de alimento de la población; además de su gran complejidad y debido a su estructura, función y a la forma en que sus componentes biológicos y minerales se organizan, el suelo presenta diferentes regiones funcionales (Rodríguez, 2007). Una de estas regiones está dada por el área de influencia de la raíz conocida como rizosfera que a menudo se divide en dos áreas: la más interior localizada en la superficie de las raíces (rizoplano) y la rizosfera exterior que corresponde al suelo adyacente (Alexander, 1994), las cuales constituyen de 2% al 3% del volumen total del suelo (Badalucco y Nannipieri, 2007).

La rizosfera está conformada por el sistema radical desarrollado en el suelo, la capa del suelo en contacto con ella y la zona de influencia, donde los productos liberados por la raíz y la dinámica biológica y ecológica de los microorganismos dan como resultado un microambiente (Lugtenberg y Kamilova, 2009) la mayoría de estos productos de la raíz son compuestos orgánicos y constituyentes normales de las plantas derivados de la fotosíntesis y otros procesos biológicos. Los compuestos orgánicos e inorgánicos exudados por las raíces estimulan o inhiben el desarrollo y la actividad de los microorganismos, particularmente bacterias y hongos (Dobbelaere *et al.*, 2003; Uren, 2007).

Los procesos que se llevan a cabo en esta zona incluyen la transformación de los nutrientes, ya que la actividad de los microorganismos facilita el ciclaje y la entrada de nutrientes a las plantas (Dobbelaere *et al.*, 2003; Egamberdiyeva, 2005; Jorquera *et al.*, 2008); es en la

rizosfera donde se llevan acabo la mayoría de las transformaciones biológicas (Jorquera *et al.*, 2008).

3.2. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

El uso irracional de agroquímicos y prácticas agrícolas no adecuadas (Velasco *et al.*, 2001) ha sido una de las causas del deterioro ambiental (Dobbelaere *et al.*, 2003). Los fertilizantes aplicados a los cultivos no son aprovechados en su totalidad por éstos; por ejemplo, se estima que de los fertilizantes que son aplicados al suelo, aproximadamente 40% del nitrógeno, 50% a 60% del fósforo y 40% potasio no son tomados por las plantas, por lo que éstos pueden perderse por lixiviación o arrastrarse junto con las partículas de suelo, situación que constituye un problema agronómico, económico y ambiental no resuelto en la agricultura (Suniaga *et al.*, 2008). Para tratar de subsanar este problema, se requiere de tecnologías enfocadas hacia una agricultura sustentable, como es el uso biofertilizantes (Mena-Violante y Olalde-Portugal, 2007), dentro de los cuales la utilización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) es una opción viable (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Las RPCV benefician a la planta a través de diferentes mecanismos, por ejemplo la fijación de N₂, la producción de fitohormonas y la liberación de sideróforos (del griego “transportador de hierro”), la solubilización de fosfato, o la síntesis de enzimas que alteran los niveles de fitohormonas y control de fitopatógenos (Brimecombe *et al.*, 2007).

Los géneros de bacterias que realizan este tipo de funciones son representados por *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Holguin *et al.*, 2003; Glick *et al.*, 2007).

En algunos estudios el efecto de la inoculación con RPCV ha sido positivo; por ejemplo, en lechuga la inoculación de este tipo de bacterias incrementó hasta 76% la germinación, además de promover el desarrollo y el crecimiento de las plantas, debido posiblemente a una mejor absorción de elementos esenciales como N y P (Díaz *et al.*, 2001). Por otra parte, Dobbelaere *et al.* (2003) mencionan que las RPCV estimulan el crecimiento facilitando la entrada de N, P, K así como microelementos en la planta.

Las RPCV protegen a las raíces de patógenos por medio de la producción de compuestos antibióticos y enzimas que inducen la resistencia sistémica. La inoculación de este tipo de microorganismos puede prevenir diversas enfermedades como la causada por *Phytophthora infestans* (Kokalis-Burelle *et al.*, 2002). Así mismo, se ha observado que las RPCV pueden ayudar a las plantas cuando se encuentran bajo un estrés inducido por sequía, salinidad o cuando las concentraciones de nutrientes son bajas o altas, debido a que incrementan el desarrollo radical, a través de la producción de fitohormonas como auxinas y citocininas causando efectos positivos en las plantas (Yang *et al.*, 2009). Otras cepas de bacterias (*Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens*) pueden liberar compuestos orgánicos volátiles como 3-hydroxy-2-butanona (acetoína) y 2,3-butanodiol, los cuales promueven el crecimiento e inducen el sistema de resistencia de las plantas (Ryu *et al.*, 2004).

3.2.1. Fijación de nitrógeno por RPCV

La atmósfera está constituida en un 78% de nitrógeno molecular, un gas inerte que no está disponible para las plantas (Peña y Reyes, 2007). La principal fuente de este elemento para las plantas es la materia orgánica del suelo (MOS), la cual es oxidada por los microorganismos para liberar el nitrógeno en forma inorgánica. En suelos con poca cantidad de MOS, este proceso no

proporciona a los cultivos cantidades suficientes de nitrógeno inorgánico, por lo que la fijación de nitrógeno (FBN) adquiere gran importancia como fuente de nitrógeno adicional (Chotte *et al.*, 2002). La FBN es llevada a cabo por microorganismos que tienen la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4^+), mismo que puede ser utilizado por las plantas, contribuyendo a mejorar la productividad de los cultivos; cualquier deficiencia en los compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos del suelo estimula la fijación microbiana de N_2 (Mantilla-Paredes *et al.*, 2009). Es así que los microorganismos que fijan nitrógeno son muy importantes para la sustentabilidad del suelo.

El contenido de nitrógeno en las plantas depende de la disponibilidad del elemento en el suelo y de la cantidad de N aplicado; cuando este elemento es escaso, el crecimiento se retarda (Velasco *et al.*, 2001). Por lo que, es necesario buscar alternativas para enfrentar la escasez de este elemento; una de ellas es el uso de RPCV que fijan N_2 ya que éstas interactúan con las plantas de dos maneras: promueven un aumento en la movilización de los nutrientes y además fijan nitrógeno (Díaz *et al.*, 2001).

La FBN es realizada a través de la enzima nitrogenasa por microorganismos que se encuentran libres en su hábitat natural, y aquellos que establecen simbiosis con leguminosas o con algunas especies forestales (Dobbelaere *et al.*, 2003); por ejemplo, la simbiosis de rizobios con leguminosas, puede llegar a fijar hasta 200 kg N ha^{-1} al año (Supanjani *et al.*, 2006).

Chebotar *et al.* (2001) mencionan que la interacción planta-microorganismo puede mejorar el rendimiento de la planta hasta un 20%. Aun cuando se conoce un gran número de bacterias de vida libre o asociativas que fijan N_2 , sólo algunas destacan por su potencial como biofertilizantes o como promotoras del crecimiento; entre los géneros más conocidos están

Azotobacter, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* (Díaz *et al.*, 2001) y en el caso de los microorganismos simbióticos los más estudiados son los rizobios (Chebotar *et al.*, 2001).

La mayoría de los estudios realizados con la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno han sido en cereales y pastos, donde se han encontrado diversas respuestas: incremento en el peso seco, floración y aparición más temprana de espigas, incremento en el número de espigas y granos por espiga, plantas más altas, incremento en el tamaño de la hoja y mayor germinación (Egamberdiyeva, 2005). Velasco *et al.*(2001) encontraron que al inocular *Azospirillum brasilense* en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) se incrementó el contenido de nitrógeno en planta de 2% a 3%, y en fruto alrededor de 3%, así mismo aumentó el área foliar y la tasa fotosintética en comparación con el testigo.

3.2.2. Bacterias solubilizadoras de fosfatos

El fósforo (P) es uno de los nutrientes más importantes y necesarios para las plantas (Dobbelaere *et al.*, 2003). Sin embargo, parte de este elemento que es aplicado como fertilizante reacciona con el calcio, el hierro y el aluminio del suelo, quedando inmovilizado como sales insolubles, sin poder ser utilizado por la planta (Hariprasad y Niranjana, 2009; Jorquera *et al.*, 2008). Por este motivo, es necesaria la búsqueda de microorganismos que incrementen la solubilización del fósforo del suelo y mejoren el desarrollo radical permitiendo mayor absorción de nutrientes por las raíces de las plantas.

La solubilización natural del fósforo mineral es un fenómeno que realizan microorganismos del suelo (Pérez *et al.*, 2007), los cuales llegan a solubilizar componentes de fósforo inorgánico, fósforo tricálcico, fósforo dicálcico, hidroxapatita y roca fosfórica (Farzana *et al.*, 2007). Las bacterias solubilizan fosfato al producir ácidos orgánicos como ácido cítrico,

láctico, succínico y glucónico (la acidificación libera los fosfatos y cationes de Ca^{++} , Fe^{++} y Al^{++} al suelo) (Hariprasad y Niranjana, 2009). También se puede solubilizar el fosfato por medio de la enzima fitasa que presentan algunos microorganismos (Jha *et al.*, 2009). Otra forma de llevar a cabo la solubilización del fósforo orgánico a inorgánico, es por medio de la enzima fosfatasa la cual hidroliza los enlaces orgánicos fosfatados liberando aniones fosfato a la solución del suelo de donde los microorganismos y las raíces de las plantas se nutren (Pérez *et al.*, 2007).

Los géneros bacterianos capaces de solubilizar fosfato son *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* y *Flavobacterium* (Díaz *et al.*, 2001). El estudio de estos microorganismos en laboratorio se lleva a cabo en medio de cultivo específico, cuya base lo constituyen compuestos fosfatados insolubles tales como fosfato tricalcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] y fitato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_{18}\text{P}_6\text{O}_{24}\cdot 12\text{Na}\cdot \text{H}_2\text{O}$), en los que crecerán los microorganismos que son capaces de asimilar estos compuestos. Una forma de conocer la capacidad de solubilizar el fosfato es por medio de la medición del halo que forman las colonias bacterianas al ser sembradas en medios específicos que contienen fosfato insoluble y que al ir creciendo, éstas van aumentando el tamaño del halo que forman a su alrededor, así mismo el pH del medio en el que son sembradas las bacterias disminuye indicando la producción de ácidos, la cual es una acción considerada como responsable de solubilizar el fosfato (Jha *et al.*, 2009).

Diversos estudios han documentado el beneficio que se obtiene al inocular bacterias solubilizadoras de fosfatos en plantas cultivadas. Por ejemplo, al inocular *Bacillus* sp. y adicionar fertilizantes minerales resulta en un mejor desarrollo de la planta, permitiendo obtener mayores rendimientos (Dias *et al.*, 2009).

3.3. Producción de fitohormonas por RPCV

3.3.1. Bacterias productoras de auxinas

El ácido indol-3-acético (IAA) puede ser producido por microorganismos del suelo, el cual se conoce como estimulante de la elongación, la división y la diferenciación celular (Farzana *et al.*, 2007). Los organismos capaces de sintetizar IAA son *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Acetobacter* y *Xanthomonas* (Barazani y Friedman 1999; Jha *et al.*, 2009). Estas especies sintetizan IAA, principalmente, por la vía de indol-3- ácido pirúvico (IPyA) (Ahmad *et al.*, 2005).

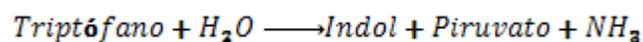
En un estudio realizado con rizobacterias en plantas de tomate donde se inoculó *Azospirillum brasilense* en combinación con *Bacillus subtilis* se encontró que la co-inoculación de ambos microorganismos no tuvo efectos sinérgicos en el peso seco de las plantas e incluso la biomasa de la parte aérea fue más baja con respecto a las inoculaciones individuales de estas bacterias, aun cuando las dos especies de bacterias tenían la capacidad de producir auxinas; lo anterior se atribuyó a que la combinación de ambos microorganismos alteró la arquitectura de la raíz, lo que provocó un efecto negativo en el crecimiento (Felici *et al.*, 2008).

La cantidad de IAA que producen las rizobacterias puede estar influenciada por factores externos como la estructura de la rizosfera, el tipo de planta y su etapa fenológica; otro factor que interviene es la composición microbiana de la rizosfera, ya que ésta se ve afectada por otros microorganismos como los protozoarios. Por ejemplo, se ha observado que hay mayor producción de IAA por bacterias, cuando se encuentra presente *Acanthamoebae* sp. (protozoario que se alimenta de bacterias), debido a una mayor disponibilidad de nutrientes y además el

forrajeo puede inducir una selección en el tipo de bacterias que se encuentran (Vestergard *et al.*, 2007).

En microorganismos se han propuesto al menos tres vías metabólicas para la biosíntesis del ácido indol acético (IAA) a partir de triptófano (Trp): la denominada vía del indol 3-pirúvico (AIP), la vía indol 3-acetamida (AIM), y la vía de la triptamina (Tam) (Figura 3.1). En la primera vía, el AIA es sintetizado a partir del L-triptófano (Trp), que puede estar libre o formando parte de proteínas que por acción de una transaminasa (TAM) se transforma en ácido indol pirúvico (AIP), el cual se descarboxila por acción de una descarboxilasa formándose indol-acetaldehído; luego actúa una oxidasa que lo transforma en ácido indolacético (Hernández-Mendoza *et al.*, 2008). Por otra parte, la vía indol 3-acetamida (IAM) ha sido una de las más estudiadas en bacterias, principalmente fitopatógenas e involucra la acción consecutiva de dos grupos de enzimas: Trp-monooxigenasas responsables de la oxidación del Trp a indol 3-acetamida, y AIM-hidrolasas responsables de la subsecuente hidrólisis del precursor a IAA. La tercera vía es la denominada vía de la Triptamina, en la que los eventos bioquímicos involucran la conversión inicial del Trp a triptamina, catalizada por enzimas tipo Trp-decarboxilasas dependientes del piroxidal fosfato, seguida de la conversión a indol acetaldehído por aminaoxidasa; aunque esta vía está presente en plantas y hongos se ha encontrado también en bacterias como *Bacillus cereus* y *Azospirillum brasilense* (Kawasaki *et al.*, 1995, Jankiewicz y Acosta-Zamudio, 2003).

Otra forma de síntesis de auxinas en bacterias es a través de la enzima triptofanasa (Figura 3.1), que es capaz de hidrolizar y desaminar el triptófano convirtiéndose en indol, ácido pirúvico y amoníaco como lo muestra la siguiente ecuación (Watanabe y Snell, 1972):



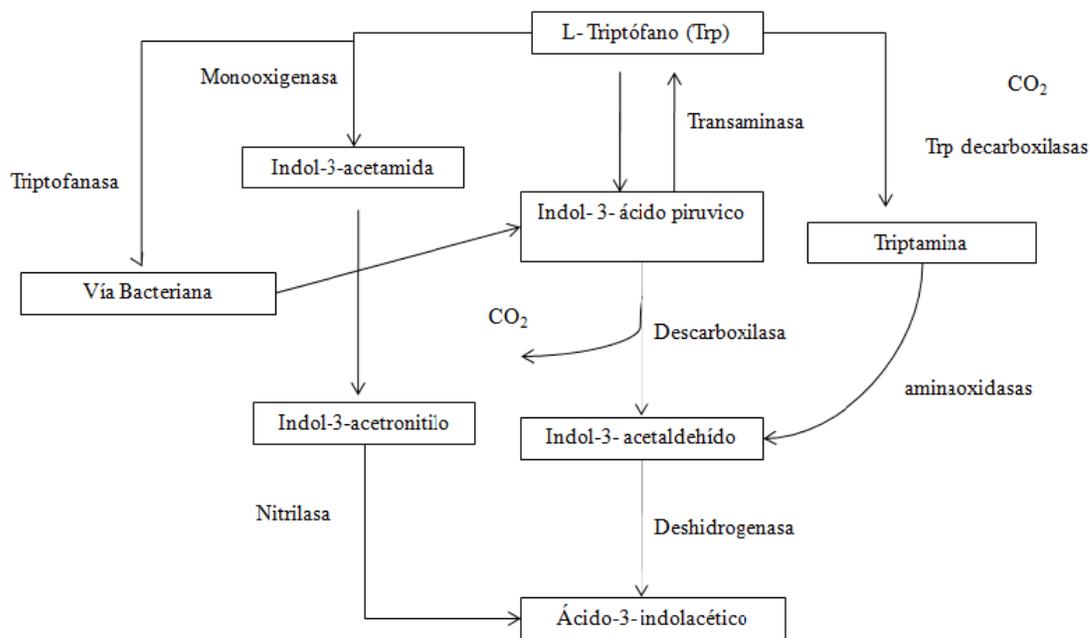


Figura 3.1 Rutas de la biosíntesis del ácido indol-3-acético, descritas en bacterias. Diagrama modificado de Jankiewicz y Acosta-Zamudio (2003).

Aunque las principales vías para la síntesis de la auxina son a partir del triptófano, en la actualidad se conoce que algunos géneros de bacterias como *Azospirillum* sintetizan IAA independientes de este aminoácido. Se ha observado que al aumentar la cantidad de triptófano no hay un aumento en la cantidad de auxinas, indicando que las bacterias no solo sintetizan IAA a partir de triptófano sino a partir de otras fuentes (Lata *et al.*, 2006; Merzaeva y Shirokikh, 2010). El amonio también es precursor de la biosíntesis de IAA ya que cepas como *Streptomyces* sp. y *Flavobacterium* sp., no pueden sintetizar esta auxina si no hay presencia de amonio, esto se debe a la competencia entre el amonio y el triptófano; por otra parte el pH óptimo para su síntesis puede ser de 5.5, aunque *Streptomyces* sp. presenta la mayor concentración de auxina a un pH de 9.0 (Merzaeva y Shirokikh, 2010).

3.3.2. Bacterias productoras de giberelinas

Las giberelinas (GAs) estimulan el crecimiento del tallo de las plantas mediante la división y elongación celular, regulan la transición de la fase juvenil a la fase adulta, influyen en la iniciación floral y en la formación de flores en algunas especies, promueven el establecimiento y crecimiento del fruto, la germinación de las semillas y la producción de enzimas hidrolíticas durante la germinación (Suzuki *et al.*, 2009). En gramíneas por ejemplo, inducen la germinación, al desencadenar la producción de enzimas que desdoblan el almidón en azúcares (Ahmad *et al.*, 2005).

Se han encontrado 136 GAs en plantas superiores, 28 GAs en hongos y sólo 4 GAs (GA₁, GA₃, GA₄ y GA₂₀) en bacterias (Joo *et al.*, 2009). Las especies de bacterias que sintetizan giberelinas son *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Azospirillum* sp. y recientemente se ha encontrado que *Burkholderia* sp. también sintetiza esta hormona (Bottini *et al.*, 2004). Las giberelinas producidas por los microorganismos inducen el crecimiento en las plantas. Por ejemplo, al inocular *Bacillus* sp. en *Alnus glutinosa* se encontró mayor actividad en el crecimiento (Gutiérrez-Mañanero *et al.*, 2001) evaluado con base en el tamaño de brote, la altura y el peso seco de la planta (Kang *et al.*, 2009).

La biosíntesis de giberelinas se divide en tres etapas (Figura 3.2), la primera consiste en la conversión de geranylgeranyl difosfato (GGDF) a *ent-kaureno*, aquí participan dos enzimas importantes la *ent-copalil* difosfato sintetasa (CPS) y la *ent-kaureno* sintetasa (KS) que llevan a cabo la doble ciclización de GGDF (Bottini *et al.*, 2004). La segunda etapa consiste en la síntesis de GA₁₂ a partir de *ent-kaureno*, que es catalizada por dos monooxigenasas, las cuales requieren de NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fósforo en forma reducida) y de oxígeno, y se

asume que involucra al citocromo 450; estas dos enzimas son la *ent-kaureno* oxidasa (KO) y ácido *ent-kaurenoico* oxidasa (KAO), cada una de ellas cataliza tres pasos metabólicos consecutivos (Olszewskiet *al.*, 2002). La tercera etapa es a partir del aldehído de GA₁₂ de la cual se forman todas las giberelinas, primero las de 20 carbonos y luego las de 19 carbonos, estas últimas son biológicamente más activas (GA₁, GA₃, GA₄, GA₇, GA₃₂). Las enzimas de esta tercera etapa son oxidasas solubles que usan 2-oxoglutarato como sustrato. Estas enzimas pertenecen a un grupo que no contienen un núcleo hemo con Fe⁺². Las reacciones catalizadas por las dioxigenasas parten del aldehído de GA₁₂, y lleva hacia dos rutas paralelas de transformaciones: la ruta sin 13-hidroxilación (GA₁₅, GA₂₄, GA₉, GA₄, GA₇) o a la ruta con 13-hidroxilación (GA₅₃, GA₄₄, GA₁₉, GA₂₀, GA₁, GA₃) (Grochowska y Mejía-Muñoz, 2003).

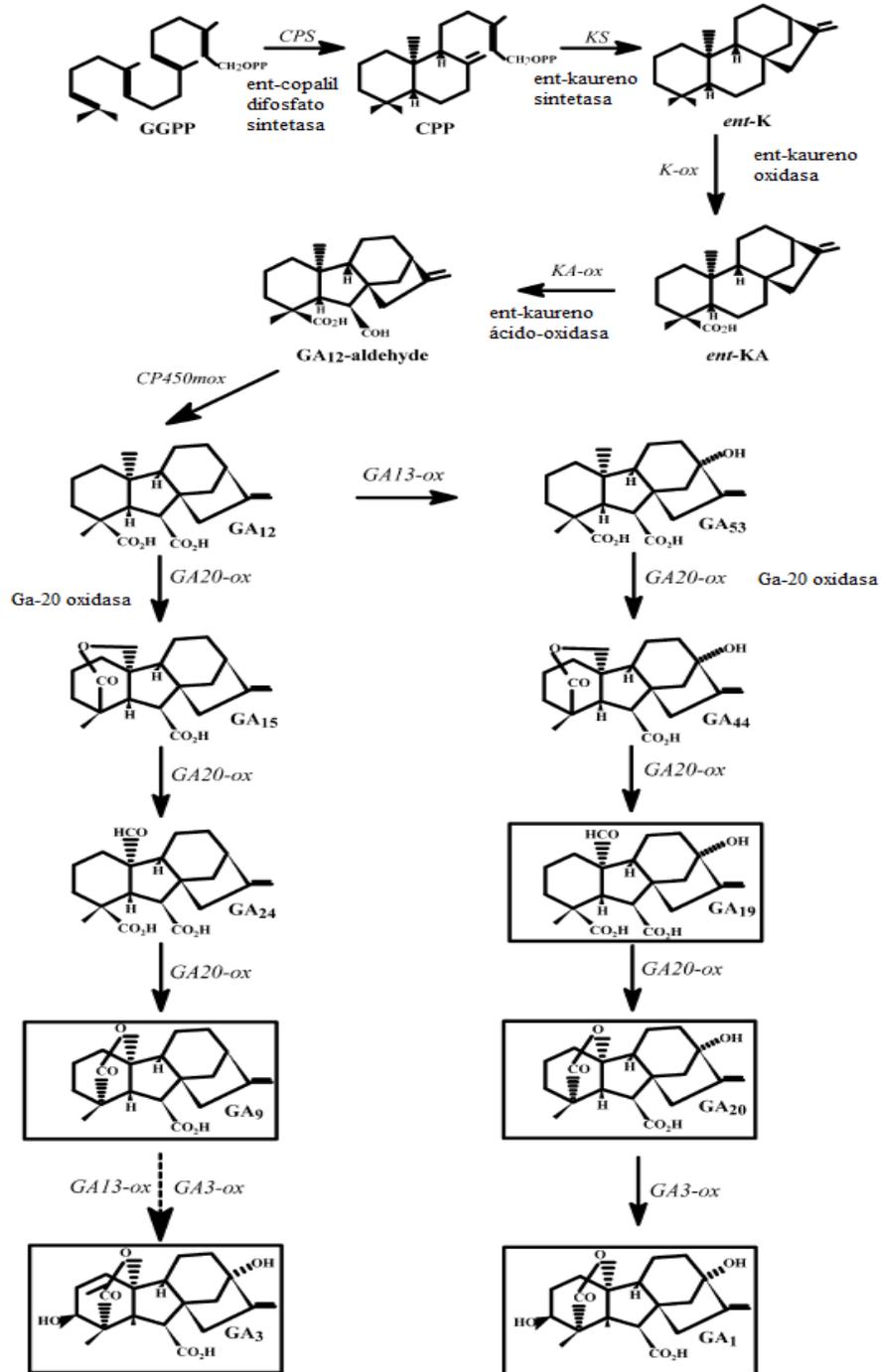


Figura 3.2 Ruta de la biosíntesis de giberelinas en *Azospirillum* sp. basado en lo que ocurre en plantas vasculares y hongos (Bottini *et al.*, 2004).

3.3.3. Bacterias productoras de citocininas

Las citocininas representan un grupo diverso de compuestos lábiles que usualmente están en pequeñas cantidades en sistemas biológicos, intervienen en la división celular, en el desarrollo de raíces, además fomentan el crecimiento de las yemas laterales y se oponen así a las auxinas; también favorecen la formación de yemas (Werner *et al.*, 2003). Sin las citocininas probablemente no habría diferenciación de órganos vegetales. Las citocininas se forman en cualquier tejido vegetal (tallos, raíces, hojas, flores, frutos o semillas), aunque se acepta en general, que en las raíces se producen las mayores cantidades de estas hormonas (Dobbelaere *et al.*, 2003).

En un estudio se indica que 90% de los microorganismos son capaces de sintetizar esta hormona vegetal, aunque se ha aislado principalmente de microorganismos patógenos (Felici *et al.*, 2008). La producción de citocininas por microorganismos al principio se identificó en bacterias patógenas como *Agrobacterium* y *Pseudomonas* spp.; sin embargo, algunas RPCV como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus*, y *Pseudomonas* spp. producen citocininas [Ribosido de trans -Zeateina (ZR), Dihidrozeateina ribosido (DHZR), Isopentil adenina (IPA)] (García de Salamone *et al.*, 2001). Además, la bacteria púrpura fototrófica *Chromatium minutissimum* produce citocininas (Serdyuk *et al.*, 2003).

La inoculación de *Bacillus subtilis* (cepa con capacidad de producir citocininas), incrementó el peso fresco en hojas y raíces de plantas de lechuga, esta respuesta se dió cinco días después de la inoculación de la bacteria. Sin embargo, al final del experimento las raíces de las plantas que fueron inoculadas eran más cortas (100 ± 5.4 mm) que los controles (126 ± 4.1 mm) mientras que la acumulación de citocininas en raíces fue mayor que en los brotes, de igual

manera el contenido de pigmentos fotosintéticos aumentó cuando se inoculó *Bacillus subtilis*, la clorofila α aumentó 73% y la clorofila β incrementó 93%, mientras que la concentración de carotenoides fue 68% mayor que el control (Arkhipova *et al.*, 2005).

3.4. Bacterias productoras de antibiosis

Las plantas han desarrollado defensas directas e indirectas (Pineda *et al.*, 2010). Los efectos positivos de las RPCV y otros microorganismos benéficos sobre las plantas, involucran dos mecanismos de acción: la promoción de crecimiento de la planta, y la inducción de la resistencia sistémica (IRS), que protege a la planta contra diferentes patógenos y posiblemente contra algunos insectos (Pineda *et al.*, 2010). El uso de microorganismos para el control biológico de enfermedades es una alternativa de los plaguicidas, debido a que los microorganismos liberan metabolitos secundarios muy cerca de la superficie de los órganos de las plantas como los tallos, las hojas y las raíces, en comparación con los agroquímicos los cuales no siempre actúan directamente sobre el fitopatógeno (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

La forma en que las rizobacterias inducen la resistencia sistémica se relaciona con las respuestas de defensa que originan en las plantas, entre las que destacan la acumulación de proteínas y enzimas (Nga *et al.*, 2010) que fortalecen la pared celular como la polifenol oxidasa, la fenilalanina amonio-liasa, así como la producción de fitoalexinas (Wei *et al.*, 1996). También las peroxidases están involucradas en las respuestas de defensa con la generación y degradación de peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Algunas cepas de *Pseudomonas* sp. seleccionadas como antagonistas contra *Fusarium* y *Colletotrichum orbiculare*, son capaces de inducir resistencia sistémica cuando se inoculan en las plantas (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Jeun *et al.* (2004) encontraron que la inoculación con RPCV disminuyó hasta 40% las lesiones en frutos de pepino,

mientras que la utilización de químicos como DL-ácido aminobutírico y ácido aminosalicílico redujo hasta 85% las lesiones en los frutos; la baja efectividad de las RPCV puede deberse a que las condiciones del suelo fueron desfavorables para la colonización y sobrevivencia. Por lo tanto, los factores abióticos pueden ser una causa por lo que las RPCV no siempre presentan una respuesta positiva en la planta.

3.5. El cultivo de pepino

Las hortalizas ocupan un lugar importante en la economía de México debido a las divisas que generan. Una de esas hortalizas es el pepino ya que presenta una alta demanda en el mercado nacional como en el internacional propiciando que los productores implementen este cultivo en condiciones protegidas (invernadero y malla sombra), principalmente en los estados de Baja California, Sinaloa y San Luis Potosí (Avendaño y Schwentesius, 2004).

El pepino es la segunda hortaliza exportable por México, después del jitomate, ya que los costos de producción de pepino por tonelada son inferiores a otras hortalizas. Sin embargo, para la exportación, esta ventaja se pierde en parte debido a los altos costos de empaque y transporte. En el noroeste del país, el cultivo de pepino constituye una de las actividades más importantes, por el nivel de producción (Cuadro 3.1), generación de empleos, cercanía a las vías de comunicación internacional y al potencial climático de la zona. Sin embargo, esta actividad ha enfrentado varias crisis en los años recientes, entre las que se incluyen la contaminación del agua del subsuelo, catástrofes meteorológicas y carteras vencidas, entre otros (Avendaño y Schwentesius, 2004).

Cuadro 3.1. Estados de la República Mexicana con mayor producción de pepino de acuerdo a las estadísticas de SIAP.

Estado	2010	2009	2008
	Toneladas hectárea ⁻¹		
Baja California	56.64	52.91	42.47
Baja California Sur	56.77	74.93	54.32
Colima	16.74	16.89	18.85
Guanajuato	27.57	19.67	21.24
Sinaloa	55.1	60.15	53.56
Sonora	32.91	24.54	21.74
Yucatán	42.70	34.91	25.09

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA.

3. 5.1. Requerimientos ambientales

El pepino es una planta anual, con tallo herbáceo rastrero y trepador, y fruto alargado y cilíndrico de cáscara lisa más o menos verrugosa, desde varios tonos de verde hasta amarillo (Fersin, 1979). Desde la germinación hasta los primeros cortes de sus frutos, generalmente transcurren 45 a 70 días dependiendo de las características genéticas de la variedad y de las condiciones ambientales (Sirohi *et al.*, 2005). El cultivo de pepino exige un clima templado cálido con temperaturas de 18° a 25 °C, como óptimas, con una máxima de 32 °C y una mínima de 10 °C. Las semillas germinan mejor a una temperatura entre 21° y 32 °C (Cásseres, 1965; Fersin, 1979). Este tipo de cultivos prefiere suelos fértiles y no muy ácidos, donde el pH más adecuado oscila entre 6.0 y 6.8 (Cásseres, 1965). El cultivo requiere de altas cantidades de agua, sobre todo cuando está en etapa de producción, ya que con la falta de humedad los pepinos que se producen son pequeños y presentan deformaciones, así que lo más recomendable en sistemas hidropónico es usar 0.6 L de agua por planta al día (Sirohi *et al.*, 2005). La siembra debe

realizarse sobre líneas distantes de 1.3 a 1.5 m y entre semillas debe haber una distancia de 60 cm (Fersin, 1979).

Los pepinos después de ser cosechados, deben ser seleccionados de acuerdo con las norma de calidad NMX-FF-023-1982, la cual establece las características de calidad que debe cumplir el pepino destinado al consumo humano (Secretaria de Comercio y Fomento Industrial, 1982). Entre las especificaciones de la norma, los pepinos deben estar bien desarrollados, enteros, sanos, frescos, limpios, de consistencia firme, tener forma, color, y olor característicos, estar exentos de humedad exterior, prácticamente libres de descomposición o pudrición, libres de defectos de origen mecánico, entomológico, microbiológico y genético-fisiológico.

3.6. Justificación

Las bacterias que habitan en la rizosfera presentan una gran variedad de interacciones con otros grupos microbianos y con las plantas; influyen en la planta por medio de la adquisición de nutrientes y estimulación del crecimiento de la raíz, entre otras. Las rizobacterias son una alternativa para hacer un uso más eficiente de los fertilizantes químicos. Por ejemplo, el pepino se cultiva con altas dosis de fertilizantes por ser un cultivo redituable, esto tiene un elevado costo económico y ambiental.

Por otra parte son pocos los estudios en México enfocados al uso de inoculantes bacterianos para promover el crecimiento de pepino, debido al limitado conocimiento de las bondades de estas rizobacterias. Por ejemplo, en el Valle de Mexicali se ha iniciado el uso de biofertilizantes enfocados principalmente a trigo, por lo que pepino es un cultivo potencial para la utilización de rizobacterias promotoras de crecimiento, donde las condiciones de agricultura protegida podrían garantizar una mejor respuesta a la inoculación.

3.7. Literatura citada

- Adesemoye, A. O., H. A. Torbert and J. W. Kloepper.** 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology* 58:921–929.
- Adesemoye, A. O., H. A. Torbert and J. W. Kloepper.** 2010. Increased plant uptake of nitrogen from 15N-depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology* 46: 54–58.
- Aghili, F., A. H. Khoshgoftarmaneshb, M. Afyuni and M. Mobli.** 2009. Relationships between fruit mineral nutrients concentrations and some fruit quality attributes in greenhouse cucumber. *Journal of Plant Nutrition* 32: 1994–2007.
- Ahmad, F., I. Ahmad and M. S. Kjhan.** 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk Journal Biology* 29: 29-34.
- Alexander, M.** 1994. Introducción a la microbiología del suelo. AGT. México, D.F. México. 491 p.
- Arkhipova, T. N., S. U. Veselov, A. I. Melentiev, E.V. Martynenko and G.R. Kudoyarova.** 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil* 272: 201–209.
- Avendaño, R. y B. Schwentesius.** 2004. Factores de competitividad en la producción y exportación de hortalizas: el caso del Valle de Mexicali, B.C., México. *Revista Latinoamericana de Economía* 36: 165-192.
- Badalucco, L and P. Nannipieri.** 2007. Nutrient transformations in the rhizosphere. *In: Pinton, R., Z. Varanini., P. Nannipieri.(Eds.) The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface.* Taylor & Francis Group. 111-120 p.
- Barazani, O and J. Friedman.** 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology* 25: 2397-2406.
- Bottini, R., F. Cassán and P. Piccoli.** 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 497–503
- Brimecombe, M. J., F. A.A.M. De Leij., and J. M. Lynch.** 2007. Rhizodeposition and Microbial Populations. *In: Pinton, R., Z. Varanini., P. Nannipieri.(Eds.) The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface.*Taylor & Francis Group.73-110 p.
- Cásseres, E.** 1965. Producción de hortalizas. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 205- 222 p. Lima, Perú.
- Chebotar, V. K., C. A. Asis and S. Akao.** 2001. Production of growth- promoting substances and high colonization ability of rhizobacteria enhance the nitrogen fixation of soybean when coinoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Biology Fertility Soil* 34:427-432.
- Chotte, J. L., A. Schwartzmann, R. Bally and L. J. Monrozier.** 2002. Changes in bacterial communities and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. *Soil Biology and Biochemistry* 34:1083-1092.
- Dias, C. F. A., E. C. F. Costa, D. F. Andreote, T. P. Lacava, A. M. Teixeira, C. L. Assumpção, L. W. Araújo, J. L. Azevedo and S. I. Melo.** 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25:189-195.

- Díaz**, V. P., R. Ferrera-Cerrato, J.J. Almaraz-Suarez y G. Alcántar G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra* 19:327-335.
- Dobbelaere**, S., J. Vanderleyden and Y. Okon. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Plant Sciences* 22:107-149.
- Egamberdiyeva**, D. 2005. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology* 36: 184-189.
- Eifediyi**, E. K and S. U. Remison. 2010. Growth and Yield of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) as Influenced by Farmyard Manure and Inorganic Fertilizer. *Report and Opinion* 2:1-6
- Farzana**, Y., O. Radziah, M. S. Saad and K. Sijam. 2007. Screening for beneficial properties of rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *Biotechnology* 6: 49-42.
- Felici**, C., L. Vettori, E. Giraldi, L. M. C. Forino, A. Toffanin, A. M. Tagliasacchi and M. Nuti. 2008. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology* 40: 260-270.
- Fersin**, A. 1979. Horticultura práctica. Ed. Diana. 2 ed. 417- 422 p. México.
- García de Salamone**, I. E., R. K. Hynes and L. M. Nelson. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology* 47:104-111.
- Glick**, R. B., B. Todorovic, J. Czarny, Z. Cheng, J. Duan and B. McConkey. 2007. Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences* 26:227–242.
- Grochwska**, M y J. M. Mejía-Muñoz. 2003. Auxinas. *In: Jankiewicz, L. S. (ed.) Reguladores de crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas*. Ediciones Mundi Prensa. 21-60.
- Gül**, A., F. Kidoglu, Y. Tüzel and I. H. Tüzel. 2008. Effects of nutrition and *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) growing in perlite. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 422-429.
- Gutiérrez-Mañanero**, F., B. Ramos-Solano, A. Probanza, J. Mehouchi, F. Tadeo and M. Talon. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum* 111: 206–211.
- Han**, H.S., Supanjani and K. D. Lee. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant, Soil and Environment* 52: 130–136.
- Hariprasad**, P. and S. R. Niranjana. 2009. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant Soil* 316:13–24.
- Hernández-Mendoza**, J. L., J. D. Quiroz-Velásquez, V.R. Moreno-Medina y N. Mayek-Pérez. 2008. Biosíntesis de ácido antranílico y ácido indolacético a partir de triptófano en una cepa de *Azospirillum brasilense* nativa de Tamaulipas, México. *Avances en Investigación Agropecuaria* 12:57-67.
- Holguin**, G., Y. Bashan, E. Puente, A. Carrillo, G. Bethlenfalvay, A. Rojas, P. Vázquez, G. Toledo, M. Jiménez, B. R. Glick, L.G. de Bashan, V. Lebsky, M. Moreno and J. P. Hernández. 2003. Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizosfera. *Agricultura Técnica en México* 29: 201-211.
- Jankiewicz**, L. S y C. Acosta-Zamudio. 2003. Auxinas. *In: Jankiewicz, L. S. (ed.) Reguladores de crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas*. Ediciones Mundi Prensa. 21-60.

- Jeun**, Y. C., K. S. Park, C. H. Kim, W. D. Fowler and J. W. Kloepper. 2004. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological Control* 29: 34-42.
- Jha**, B. K., M. G. Pragash, J. Cletus, G. Raman and N. Sakthivel. 2009. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. moselii*. *World Journal Microbiology Biotechnology* 25:573-581.
- Joo**, G., S. Kang, M. Hamayun, S. Kim, C. Na, D. Shin and I. Lee. 2009. *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. *The Journal of Microbiology* 47:167-171.
- Jorquera**, M. A., M. T. Hernández, Z. Rengel, P. Marschner and M. L. Mora. 2008. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology Fertility Soil* 44:1025-1034.
- Kang**, S., G. Joo, M. Hamayun, C. Na, D. Shin, H. Y. Kim, J. Hong and I. Lee. 2009. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnology Letters* 31:277-281
- Kawasaki**, K., A. Yokota and F. Tomita. 1995. Enzymatic synthesis of L-Tryptophan by *Enterobacter aeruginosa* tryptophanase highly expressed in *Escherichia coli*, and some properties of the purified enzyme. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59:1938-1995.
- Kokalis-Burelle**, N., C. S. Vavrina, E. N. Rosskopf and R. A. Shelby. 2002. Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant and Soil* 238: 257-266.
- Lata**, H., X.C. Li, B. Silva, R.M. Moraes and L. Halda-Alija. 2006. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated *Echinacea* plants using 16S rRNA sequencing. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85: 353-359.
- Lugtenberg**, B and F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63:541-56.
- Mantilla-Paredes**, A. J., G. I. Cardona, C. P. Peña-Venegas, U. Murcia., M. Rodríguez y M. M. Zambrano. 2009. Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Revista Biología Tropical* 57: 915-927.
- Mena-Violante**, G. H and V. Olalde-Portugal. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae* 113: 103-106.
- Merzaeva**, O. V and I. G. Shirokikh. 2010. The Production of auxins by the endophytic bacteria of winter rye. *Applied Biochemistry and Microbiology* 46:44-40.
- Mia**, B. M.A., Z.H. Shamsuddin, Z. Wahab and M. Marziah. 2010. Rhizobacteria as bioenhancer and biofertilizer for growth and yield of banana (*Musa* spp. cv. 'Berangan'). *Scientia Horticulturae* 126: 80-87.
- Mohammadi**, Ali and M. Omid. 2010. Economical analysis and relation between energy inputs and yield of greenhouse cucumber production in Iran. *Applied Energy* 87: 191-196.

- Nga**, N.T.T., N.T. Giau, N.T. Long, M. Lübeck, N. P. Shetty, E. de Neergaard, T.T.T. Thuy, P. V. Kim and H. J. L. Jorgensen. 2010. Rhizobacterially induced protection of watermelon against *Didymella bryoniae*. *Journal of Applied Microbiology* 109: 567–582.
- Olszewski**, N., T. Sun., and F. Gubler. 2002. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14: S61-S80.
- Peña**, H. B y I. Reyes. 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia* 32: 560-565.
- Pérez**, E., M. Sulbarán, M. M. Ball and L. A. Yarzabal. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 2905-2914.
- Pineda**, A., S. Zheng, J. J. A. Van-Loon, C. Pieterse and M. Dicke. 2010. Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends in Plant Science* 15: 507-514.
- Rodríguez**, Z. S. 2007. Protozoarios del suelo. *In*: Ferrera- Cerrato, R. y Alarcón, A. (Eds.) *Microbiología agrícola*. Editorial Trillas. México, D.F. 254-269 p.
- Ryu**, C., M. A. Farag, C. Hu, M. S. Reddy, J. W. Kloepper and P. W. Pare. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in arabidopsis. *Plant Physiology* 134: 1017–1026.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial**. 1982. NMX-FF-023-1982. Productos alimenticios no industrializados para uso humano-fruta fresca- pepino- (*Cucumis sativus*)- especificaciones. Internet. Fecha de acceso 09 de noviembre de 2009.
- Serdyuk**, O. P., L. D. Smolygina, E. P. Ivanova and V. M. Adanin. 2003. Phototrophic purple bacterium *Chromatium minutissimum* does not synthesize cytokinins under optimal growth conditions. *Biochemistry, Biophysics, and Molecular Biology* 392: 285-287.
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera**. 2011. SIAP, SIACON, Anuario Agrícola por Municipio, SAGARPA. Consulta de Indicadores de Producción Nacional de Pepino.
- Shen**, W., X. Lin, N. Gao, H. Zhang, R. Yin, W. Shi and Z. Duan. 2008. Land use intensification affects soil microbial populations, functional diversity and related suppressiveness of cucumber *Fusarium* wilt in China's Yangtze River Delta. *Plant Soil* 306:117–127.
- Shen**, W., X. Lin, W. Shi, J. Min, N. Gao, H. Zhang, R. Yin and X. He. 2010. Higher rates of nitrogen fertilization decrease soil enzyme activities, microbial functional diversity and nitrification capacity in a Chinese polytunnel greenhouse vegetable land. *Plant Soil* 337:137–150.
- Sirohi**, P. S., A. D. Munshi., G. Kumar and T. K. Behera. 2005. Cucurbits. *In*: Dhillon B. S., R. K. Tyagi., S. Saxena and G. J. Randhawa (eds). *Plant genetic resources: horticultural crops*. Narosa publishing house. India. 34- 58 p.
- Suniaga** Q, J., A. Rodríguez., L. Ramírez, R., E. Romero y E. Montilla. 2008. Fertilización, mediante fertirriego, durante diferentes etapas del ciclo de cultivo del pepino (*Cucumis sativus* L.) en condiciones de bosque seco premontano. *Agricultura Andina* 15: 56-66.
- Supanjani**, S., K. D. Lee., J. J. Almaraz., X. Zhou and D. L. Smith. 2006. Effect of organic N source on bacterial growth, lipo-chitooligosaccharide production, and early soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. *Canadian Journal of Microbiology* 52:227-236.
- Suzuki**, H., S. Park, K. Okubo, J. Kitamura, M. Ueguchi-Tanaka, S. Iuchi, E. Katoh, M. Kobayashi, I. Yamaguchi, M. Matsuoka, T. Asami and M. Nakajima. 2009.

- Differential expression and affinities of Arabidopsis gibberellin receptors can explain variation in phenotypes of multiple knock-out mutants. *The Plant Journal*. 60: 48–55.
- Uren**, N. C. 2007. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. *In*: Pinton, R., Z, Varanini and P, Nannipieri. (Eds.) *The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. Taylor and Francis Group. 1-22 p.
- Velasco**, V. J., R. Ferrera-Cerrato y J.J. Almaraz-Suarez. 2001. Vermicomposta, micorriza arbuscular y *Azospirillum brasilense* en tomate de cascara. *Terra* 19(3): 241-248.
- Vestergard**, M., L. Bjornlund, F. Henry and R. Ronn. 2007. Decreasing prevalence of rhizosphere IAA producing and seedling root growth promoting bacteria with barley development irrespective of protozoan grazing regime. *Plant and Soil* 295:115–125.
- Watanabe**, T and E. E. Snell. 1972. Reversibility of the Tryptophanase Reaction: Synthesis of Tryptophan from Indole, Pyruvate, and Ammonia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69:1086-1090.
- Wei**, G., J. W. Kloepper and S. Tuzan. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Biological Control* 86: 221-224.
- Werner**, T., V. Motyka, V. Laucou, R. Smets, H. V. Onckelen and T. Schmulling. 2003. Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15:2532–2550
- Yang**, J., J. W. Kloepper and C. Ryu. 2009. Rhizosphere bacterial help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* 14: 1-4

CAPÍTULO 4

EFECTO DE CUATRO CEPAS DE RIZOBACTERIAS EN EL CRECIMIENTO Y NUTRICIÓN DE PLÁNTULAS DE PEPINO

4.1. RESUMEN

En la actualidad se requiere de plántulas de alta calidad en tamaño, vigor y sanidad que conduzcan a lograr un buen establecimiento, adaptación y rápido crecimiento del cultivo. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la inoculación de cuatro cepas de rizobacterias: *Pseudomonas tolaasi* (P61), *P. tolaasi* (A46), *Bacillus pumilus* (R44) y *Microbacterium paraoxydans* (P21) en plántulas de pepino. El experimento se estableció en un diseño completamente al azar bajo condiciones de invernadero con 10 tratamientos de inoculación que incluyó las cepas bacterianas, las combinaciones por pares entre ellas y un testigo sin inoculación, con 12 repeticiones cada uno. La inoculación de bacterias se realizó mezclando el inóculo correspondiente con el sustrato (peat moss) en una relación 1:10 p/p. Una vez que las macetas se llenaron con el sustrato se sembraron las semillas de pepino var. Alcazar. A los 30 días se evaluó la altura, el diámetro de tallo, la longitud de raíz, el contenido relativo de clorofila, el área foliar, el peso seco de planta, y el contenido de NO_3^- , K^+ y PO_4^{3-} en tallos. El tratamiento inoculado con las cepas A46 y R44 presentó la mayor altura de plántula (32.33 cm) en comparación con el testigo; en cuanto a longitud de raíz los tratamientos R44 (11.23 cm) y P21+P61 (9.93 cm) tuvieron los valores más altos en comparación con el testigo. En el área foliar el tratamiento inoculado con las cepas A46 y R44 (237 cm²) presentó los valores más altos en comparación con los otros tratamientos, de igual manera sucedió con el peso seco. En relación al contenido de fósforo las plantas inoculadas con *P. tolaasii* (cepas A46 y P61), fueron las que presentaron los valores más altos en comparación con el testigo. Los resultados sugieren que la inoculación en pepino es una alternativa para obtener plántulas de calidad y mejor nutridas que soporten el estrés provocado por el trasplante.

Palabras clave: Inoculación, rizobacterias, calidad de plántulas, hortalizas, trasplante.

CHAPTER 4

EFFECT OF FOUR RHIZOBACTERIA STRAINS ON GROWTH AND NUTRITION OF CUCUMBER SEEDLINGS

4.2. ABSTRACT

Farmers currently require high seedling quality in size, vigor and health in order to get a better establishment, adaptation, and rapid plant growth in the field. The aim of this study was to determine the effect of inoculation of four strains of rhizobacteria: *Pseudomonas tolaasi* (P61), *P. tolaasi* (A46), *Bacillus pumilus* (R44) and *Microbacterium paraoxydans* (P21) on cucumber seedling growth. The experiment was established in a completely randomized design with 10 treatments of inoculation which included four bacterial strains, their pair combinations among them and a control without inoculation, with 12 replicates each of them. Inoculation was performed by mixing the bacterial inoculum with the growth substrate (peat moss) in a ratio of 1:10 w/w. Pots were filled with the substrate and seeds of cucumber cv. Alcazar were sown on each one. At 30 days after planting seedling height, stem diameter, root length, relative chlorophyll content, leaf area, dry weight, and content of NO_3^- , K^+ and PO_4^{3-} in stems were evaluated. The inoculated treatment A46+R44 had the highest seedling height (32.33 cm) and the biggest leaf area (237 cm^2), and treatments R44 and P21+P61 had the highest values of root length (11.23 and 9.93 cm, respectively). Regarding phosphorus content plants inoculated with *P. tolaasi* (strains A46 and P61) showed higher values compared with the control. These results suggest that inoculation with PGPR in cucumber is a good option to obtain cucumber seedlings with high quality for transplanting in the Mexicali Valley.

Keywords: Inoculation, rhizobacteria, seedling quality, vegetables, transplanting.

4.3. INTRODUCCIÓN

Los fertilizantes químicos son esenciales en la agricultura moderna ya que aportan los nutrientes requeridos por las plantas; sin embargo, su uso excesivo ha causado un deterioro en el ambiente, además que no todo el fertilizante es aprovechado por las plantas (Adesemoye *et al.*, 2010; Avendaño y Schwentesius, 2004). El uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) es una alternativa a la aplicación de fertilizantes químicos (Adesemoye *et al.*, 2009; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Deepa *et al.*, 2010). Las RPCV colonizan la rizosfera e incrementan el crecimiento de las plantas (Yang *et al.*, 2009), a través de la fijación de nitrógeno, la producción de sideróforos, la solubilización de fosfatos y la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas y citocininas) (Ahmad *et al.*, 2005; Joo *et al.*, 2009); también se ha observado que la producción de antibióticos y enzimas por estos microorganismos disminuye la incidencia de enfermedades (Kokalis-Burelle *et al.*, 2002; Glick *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). Díaz *et al.* (2001) encontraron que la inoculación con RPCV incrementó la germinación de semillas de lechuga hasta un 76% y además, observaron un efecto positivo en el desarrollo de la raíz y de la parte aérea de las plantas. Así mismo, la utilización de RPCV en jitomate mejoró la calidad del fruto (Mena-Violante y Olalde-Portugal, 2007), y la cantidad de fósforo disponible en la rizosfera (Hariprasad y Niranjana, 2009) y en maíz aumentó el contenido foliar de nitrógeno, fósforo y potasio (Egamberdiyeva, 2007). No obstante, el efecto positivo de la inoculación dependerá de la especie vegetal, la cepa de RPCV utilizada y las condiciones climáticas (Adesemoye *et al.*, 2008; Hassen y Labuschagne, 2010). En el cultivo de pepino la inoculación con *Burkholderia* sp. incrementó el peso fresco de la planta y mejoró la calidad del fruto en cuanto al contenido de proteínas y azúcares solubles (Kang *et al.*, 2010).

La inoculación con RPCV ayuda a la planta a tolerar el estrés provocado por el trasplante, dando como resultado que las plantas inoculadas tengan un mayor porcentaje de sobrevivencia (Yan *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2009; Jing *et al.*, 2010). Esta capacidad de las RPCV para mejorar la tolerancia al estrés es particularmente útil en áreas con altas temperaturas, ya que pueden ser afectadas severamente al momento del trasplante; por lo que plántulas vigorosas con un crecimiento radical abundante pueden tolerar mejor el estrés causado por el trasplante y reanudar rápidamente su desarrollo normal (Preciado *et al.*, 2002).

La producción de hortalizas en sistemas intensivos es una actividad altamente demandante de fertilizantes químicos (Avendaño y Schwentesius, 2004), además por representar un sistema productivo en regiones de condiciones de altas temperaturas como es el caso del Valle de Mexicali, Baja California. La implementación de los inoculantes bacterianos, representa una alternativa para la producción de plántulas de buena calidad que garantizan su establecimiento, y que puede reducir los costos de producción, ya que a nivel regional la producción de planta de trasplante la realiza generalmente el productor, aunque también tiene la opción de adquirir las plantas en empresas establecidas en la zona costera del estado a precios que fluctúan entre \$1.10 y \$1.20, dependiendo del precio de la semilla.

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la inoculación de RPCV en plántulas de pepino.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las semillas de pepino (*Cucumis sativus* cv Alcazar), fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 2% por 30 s, y posteriormente lavadas con agua destilada estéril. Estas

semillas fueron sembradas en macetas que contenían 100 g de peat moss (marca Premier®) previamente esterilizado por dos por cuatro horas en dos días inoculado.

Material microbiológico

Se utilizaron las cepas *Pseudomonas tolaasii* (A46), *Microbacterium paraoxydans* (P21), *Pseudomonas tolaasii* (P61) y *Bacillus pumilus* (R44), obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología del Colegio de Postgraduados (Montecillo, Estado de México). Cada una de las cepas fueron crecidas en caldo nutritivo a 24°C por 72h hasta obtener una concentración bacteriana de 1×10^9 UFC mL⁻¹. Después cada inóculo bacteriano fue mezclado con turba estéril y neutra en proporción 1:3 v/p. Los inoculantes así obtenidos se incubaron por dos semanas a 28°C. La carga bacteriana final en la turba impregnada con los inóculos fue en promedio de 5×10^9 UFCg⁻¹.

Tratamientos

Los 12 tratamientos evaluados consistieron de los inoculantes individuales y combinado de cuatro cepas de bacterias (A46, P21, P61, R44, A46+P21, A46+P61, A46+R44, P21+P61, P21+R44, P61+R44) y de un testigo sin inocular. El experimento se estableció en un diseño experimental completamente al azar bajo condiciones de invernadero. Cada tratamiento contó con 12 repeticiones considerando una maceta por repetición. El inóculo sólido se mezcló con peat moss (marca Premier®) en una relación 1:10 p/p, de la cual previamente se había esterilizado. Con este sustrato inoculado se llenaron las macetas y en seguida se sembraron las semillas; se adicionó periódicamente agua destilada para mantener la humedad. Las plantas fueron regadas con 100 mL de solución nutritiva Long Ashton (Hewitt, 1966), a partir del día 18 después del establecimiento del experimento.

Variables evaluadas

Se llevo acabo un muestreo a los 30 días después de la siembra en el que se midió altura de planta, el diámetro de tallo, la longitud de raíz, y el contenido relativo de clorofila en hojas con un equipo SPAD-502 (Minolta, Japan), en el que se consideró la hoja más recientemente madura, y el área foliar con un medidor marca LICOR (LI 3000, Inc. Lincoln, NE, EUA). También se cuantificó el peso seco de raíces y de la parte aérea, para lo cual el material vegetal se colocó en un horno a 70° C por 72 h.

El tallo de tres plántulas por tratamiento se maceró hasta obtener un volumen de 1000 μL , de extracto celular posteriormente se determinó el contenido de K^+ con un ionómetro marca Horiba (Spectrum Technologies, Inc.) modelo C-131 con rango de 5 a 4900 ppm, el contenido de NO_3^- se determinó con un ionómetro marca Horiba (Spectrum Technologies, Inc.) modelo C-141 con rango de 4 a 6200 ppm, y el contenido de fosfatos se determinó con un espectrofotómetro marca Hanna modelo HI93713 con rango de 0.0 a 15.0 mg L^{-1} .

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SYSTAT 10.2 (Systat Software Inc., California, USA) en los cuales se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y se hizo una prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$).

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tratamientos inoculados con la cepa R44, y con las combinaciones entre las cepas A46+R44 y P21+P61 tuvieron el mayor crecimiento de plántulas, área foliar, longitud de raíz y peso seco (Cuadro 4.1). Dos de las cepas usadas (A46 y P61) pertenecen al género *Pseudomonas*; se ha reportado que este género posee la propiedad de estimular la germinación de semillas,

acelerar el crecimiento de las plantas especialmente en sus primeros estadios, incrementar la formación de raíces y pelos radicales, y tener una alta capacidad de colonizar cualquier sistema radical de plantas (Dobbelaere *et al.*, 2003; Cassán *et al.*, 2009), en situaciones de estrés en la planta, las rizobacterias de este género mejoran algunos parámetros tales como: germinación y el crecimiento en plantas (Felici *et al.*, 2008; Ashrafuzzaman *et al.*, 2009). De la misma manera la inoculación con bacterias del género *Bacillus* promueve el crecimiento, la vitalidad y la capacidad de las plantas en hacer frente a algunos patógenos, dando como resultado mayor rendimiento (Wahyudi *et al.*, 2011).

Por otra parte se observó que algunas combinaciones entre cepas (A46-P21 y A46-P61) no estimularon el crecimiento, probablemente se debió a que las cepas de rizobacterias inoculadas no fueron eficientes en colonizar la raíz o competieron entre ellas y por lo tanto no causaron efectos positivos en el crecimiento de la planta (Felici *et al.*, 2008).

En relación al contenido relativo de clorofila no se encontraron diferencias significativas (datos no mostrados). Sin embargo, en otros estudios se ha observado que la inoculación con *Trichoderma harzianum* aumenta el contenido de clorofila en pepino (Yedidia *et al.*, 2001; Dimkpa *et al.*, 2009). La posible explicación del nulo efecto de la inoculación en el contenido de clorofila probablemente se debió al corto tiempo (30 días) que duro el experimento y por lo cual no se encontró una respuesta.

Cuadro 4.1. Efectos de la inoculación de cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en las respuestas de crecimiento de plántulas de pepino (*Cucumis sativus* cv. Alcazar) 30 días después de la siembra.

Tratamiento	Altura de plántula (cm)	Longitud de raíz (cm)	Área foliar (cm ²)	Peso seco total (g)
A46	23.00 e	8.33 b	111.48 e	0.243d
P21	22.17 e	8.57 b	121.70 e	0.333b
P61	15.90 d	8.23 b	116.18 e	0.288d
R44	28.50 b	11.23 ab	180.70 b	0.318b
A46+P21	20.17 e	8.47 b	147.71 d	0.293c
A46+P61	20.00 e	7.93 b	130.47 e	0.302b
A46+R44	32.33 a	8.83 b	237.00 a	0.403 ^a
P21+P61	29.33 b	9.93 ab	209.89 c	0.290c
P21+R44	24.33 ed	7.77 b	108.16 e	0.305b
P61+R44	23.67 ed	7.70 b	66.17 f	0.291c
Testigo	19.78 e	5.07 c	98.39 e	0.240d

A46= *Pseudomonas tolaasii*, P21= *Microbacterium paraoxydans*, P61= *Pseudomonas tolaasii*, R44= *Bacillus pumilus*. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$). n= 3.

Las concentraciones de nitratos (NO_3^-) en tallos de plantas inoculadas con la cepas R44 y A46 fueron las más altas con 1.35 y 1.34 g L^{-1} , respectivamente (Figura 4.1), mientras que el testigo tuvo un valor de 0.30 g L^{-1} . Esto sugiere que el incremento en longitud radical causado por la inoculación de las cepas R44 y A46 permitió mayor absorción de nutrientes, lo que se ve reflejado en una concentración alta de nitratos en tallos en comparación con el testigo. Lo cual concuerda con Deepa et al. 2010, quienes mencionan que el mayor desarrollo radical conduce a una mayor superficie de raíz, dando como resultado una mejor nutrición en las plantas, y por lo tanto que esto es un factor clave en la promoción del crecimiento inducido por RPCV.

Por otra parte, la mayor concentración de potasio correspondió a los tratamientos donde se aplicaron las combinaciones entre las cepas bacterianas, mientras que en donde sólo se inoculó cepas individuales y en el testigo no se encontraron diferencias estadísticas (Figura 4.1). Lo anterior puede deberse al sinergismo entre cepas dando como resultado mayor absorción de potasio en las plántulas. Muchos microorganismos en el suelo son capaces de solubilizar el potasio, principalmente los pertenecientes al género *Bacillus*, y convertirlo a formas más asimilables para las plantas (Ordookhani *et al.*, 2010). Además se ha encontrado que la inoculación con *Bacillus*, aumenta la disponibilidad y el contenido de potasio en la planta (Han *et al.*, 2006).

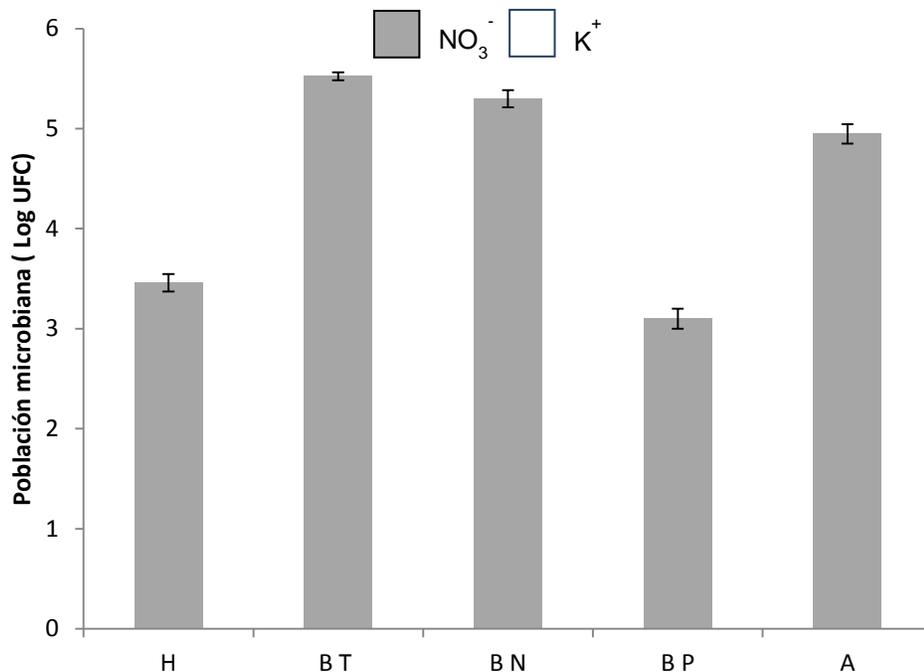


Figura 4.1. Efecto de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en la concentración de NO₃⁻ y K⁺ en tallos de plántulas de pepino. n = 3, I=Error estandar.

Las RPCV tienen la capacidad de convertir el fósforo no asimilable a formas más disponibles para las plantas (Dastager *et al.*, 2011). La inoculación con rizobacterias que tienen la capacidad de solubilizar fósforo, aumenta la concentración de éste en la planta (Martín *et al.*, 2003; Hariprasad yNiranjana, 2009). En el presente estudio se observó que la sola inoculación de las cepas A46 y P61(*Pseudomonas tolaasii*) aumentó la concentración de fósforo en los tallos de las plántulas (Figura 4.2). Lo anterior puede deber a que la solubilización de fosfato en el suelo causando por las cepas de rizobacterias condujo a una mayor absorción de fósforo en plantas (Martín *et al.*, 2003).

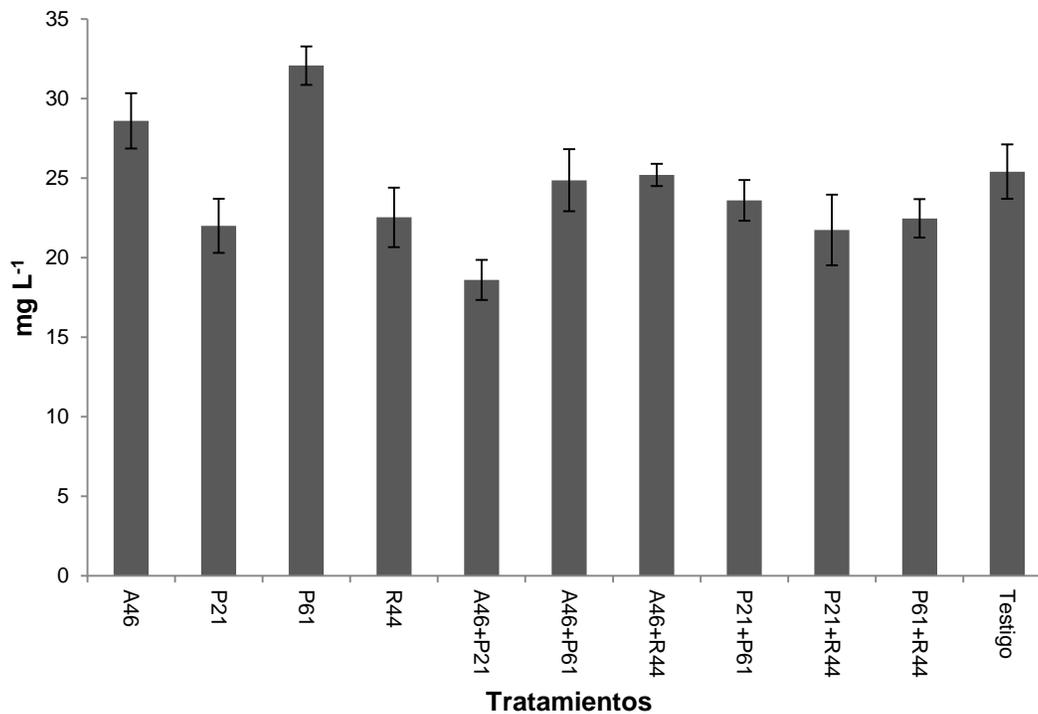


Figura 4.2. Efecto de la inoculación de cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en la concentración de fósforo en tallos de plántulas de pepino. n= 3, I= Error estandar.

El impacto de la inoculación de microorganismos en cultivos de grano es ampliamente conocido (Bastián *et al.*, 1998; Glick *et al.*, 2007; Trivedi *et al.*, 2005; Joo *et al.*, 2009; Hassen y Labuschagne, 2010). Sin embargo hay pocos estudios enfocados a cultivos hortícolas como pepino. El presente trabajo fue uno de ellos, que se enfocó a la obtención de plántulas de calidad usando inoculantes bajo agricultura protegida.

4.6. CONCLUSIONES

La inoculación de cepas de bacterias mejoró el desarrollo radical de plántulas dando como resultado un aumento en la concentración de nutrientes como N, P y K, y la obtención de plántulas de mayor calidad que están más aptas para soportar el estrés provocado al momento del trasplante, por lo que la inoculación de rizobacterias es una alternativa en la agricultura sustentable para obtención de plántulas de alta calidad en cultivos de transplante; no obstante es necesario realizar una selección de cepas microbianas específicas para cada cultivo y región, que conduzcan tener resultados positivos en la promoción de crecimiento.

4.7. LITERATURA CITADA

- Adesemoye, A. O., H. A. Torbert and J. W. Kloepper.** 2008. Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. Brazilian Journal of Microbiology 39:423-426.
- Adesemoye, A. O., H. A. Torbert and J. W. Kloepper.** 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. Microbial Ecology 58:921-929.
- Adesemoye, A. O., H. A. Torbert and J. W. Kloepper.** 2010. Increased plant uptake of nitrogen from 15N-depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria. Applied Soil Ecology 46: 54-58.
- Ahmad, F., I. Ahmad and M. S. Kijhan.** 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. Turk Journal Biology 29: 29-34.
- Ali, S. Z., V. Sandhya, M. Grover, N. Kishore, L. Venkateswar and B. Venkateswarlu.** 2009. *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. Biology and Fertility of Soils 46:45-55.
- Ashrafuzzaman, M. F. Akhtar, M. Razi, M. Hoque, M. Zahurul, S. M. Shahidullah and S. Meon.** 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. African Journal of Biotechnology 8:1247-1252.
- Avendaño, R. B y Schwentesius.** 2004. Factores de competitividad en la producción y exportación de hortalizas: en caso del Valle de Mexicali, B.C., México. Revista Latinoamericana de Economía 36: 165-192.
- Bastián, F., A. Cohen, P. Piccoli, V. Luna, R. Baraldi and R. Bottini.** 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culturemedia. Plant Growth Regulation24: 7-11.
- Cassán, F., D. Perrig, V. Sgroy, O. Masciarelli, C. Penna and V. Luna.**2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). European Journal of Soil Biology 45: 28 - 35.
- Dastager, S. G., C. K. Deepa and A. Pandey.** 2011. Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology27:259-265.
- Deepa, C. K., Syed, G. Dastager and A. Pandey.** 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria from non-rhizospheric soil and their effect on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seedling growth. World Journal of Microbiology & Biotechnology26:1233-1240.

- Dimkpa**, C., T. Weinand and F. Asch. 2009. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell and Environment* 32:1682-1694.
- Dobbelaere**, S., J. Vanderleyden and Y. Okon. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere, critical reviews. *Plant Sciences* 22:107-149.
- Egamberdiyeva**, D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology* 36: 184-189.
- Felici**, C., L. Vettori, E. Giraldi, L. M. C. Forino, A. Toffanin, A. M. Tagliasacchi and M. Nuti. 2008. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology* 40: 260-270.
- Glick**, R. B., B. Todorovic, J. Czarny, Z. Cheng, J. Duan and B. McConkey. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences* 26:227–242.
- Han**, H.S., Supanjani and K. D. Lee. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant Soil and Environment* 52: 130–136.
- Hariprasad**, P. and S. R. Niranjana. 2009. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant Soil* 316:13–24.
- Hassen**, A.I and N. Labuschagne. 2010. Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the rhizoplane of grasses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:1837–1846.
- Hewitt**, E.J., 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical Communication, 2nd ed., No. 22. Commonwealth Agricultural Bureaux, London.
- Jing**, L., W. Feng-Zhi and Y. Yang. 2010. Effects of cinnamic acid on bacterial community diversity in rhizosphere soil of cucumber seedlings under salt stress. *Agricultural Sciences in China* 9: 266-274.
- Joo**, G., S. Kang, M. Hamayun, S. Kim, C. Na, D. Shin and I. Lee. 2009. *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. *The Journal of Microbiology* 47:167-171.
- Kang**, S., M. Hamayun., G. Joo., A. Khan., Y. Kim., S. Kim., H. Jeong and I. Lee. 2010. Effect of *Burkholderia* sp. KCTC11096BP on some physiochemical attributes of cucumber. *European Journal of Soil Biology* 46: 264-268.
- Kokalis-Burelle**, N., C. S. Vavrina, E. N. Roskopf and R. A. Shelby. 2002. Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant and Soil* 238: 257–266.
- Lugtenberg**, B and F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63:541–56.
- Martín**, L., E. Velázquez, R. Rivas, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina, C. Rodríguez-Barrueco and A. Peix. 2003. Effect of inoculation with a strain of *Pseudomonas fragi* in the growth

and phosphorous content of strawberry plants. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, 309–315

- Mena-Violante**, G. H and V. Olalde-Portugal. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae* 113: 103–106.
- Ordookhani**, Kouros., K. Kazem, M. Moezzi and R. Farhad. 2010. Influence of PGPR and AMF on antioxidant activity, lycopene and potassium contents in tomato. *African Journal of Agricultural Research* 5: 1108-1116.
- Preciado**, R. P., G. A. Baca C., J. L. Tirado T., J. Kohashi-Shibata., L. Tijerina C y A. Martínez G. 2002. Nitrógeno y potasio en la producción de plántulas de melón. *Terra* 20: 267:276.
- Trivedi**, P., A. Pandey and L. M. S. Paln. 2005. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 941-945.
- Wahyudi**, A., R. Puji, A. Widyawati, A. Meryandini and A. Nawangsih. 2011. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 3: 34-40.
- Yan**, Z., M.S. Reddy and J. W. Kloepper. 2003. Survival and colonization of rhizobacteria in a tomato transplant system. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 383.389.
- Yang**, J., J. W. Kloepper and C. Ryu. 2009. Rhizosphere bacterial help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* 14: 1-4.
- Yedidia**, I., A. K. Srivastva, Y. Kapulnik and I. Chet. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil* 235:235–242.

CAPÍTULO 5

INOCULACIÓN DE RIZOBACTERIAS EN LA PRODUCCIÓN DE PEPINO BAJO UN SISTEMA DE FERTIRRIEGO EN INVERNADERO

5.1. RESUMEN

Estudios sobre el efecto de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV), en cultivos hortícolas son escasos, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de pepino (*Cucumis sativus* L.cv Alcazar.) a la inoculación con RPCV bajo un sistema de fertirriego en Mexicali, Baja California. Se utilizaron 12 tratamientos consistentes en tres cepas de rizobacterias (*Pseudomonas tolaasii* (A46) *P. tolaasii* (P61) y *Bacillus pumilus* (R44)) y un testigo sin inoculación bajo tres dosis de fertilizantes (0 %, 50 % y 100 % de la tasa de fertilización) en un sistema de fertirriego; el experimento se estableció en un diseño experimental en parcelas divididas. Se evaluó altura de planta en etapa de almácigo (antes del trasplante) y a los 55 días después del trasplante se evaluaron las variables: área foliar, altura de planta y clorofilas (SPAD), así como nitratos, fósforo y potasio en extracto celular de peciolo, y rendimiento de frutos. En el muestreo realizado en la etapa de almácigo (25 días después de la siembra) las plántulas inoculadas con la cepa *P. tolaasii* (P61) fueron las que presentaron la mayor altura. En la etapa de floración se encontró que el tratamiento inoculado con la cepa A46 y con una dosis de fertilizante del 100 % obtuvo la mayor área foliar (11173.7 cm^2) y altura de planta (253.5 cm), mientras que la mayor concentración de fósforo (13 mg L^{-1}) y nitratos (320 mg L^{-1}) en peciolo se encontró en el tratamiento inoculado con la cepa A46 combinada con una dosis de fertilizante del 50%. En la dosis cero de fertilizante la inoculación incrementó el rendimiento, pero al aumentar la dosis de fertilizante a 50% la respuesta en el rendimiento de las plantas a la inoculación disminuyó, y al 100% de fertilizante la inoculación no aumentó el rendimiento en tratamientos como P61 y R44, no obstante el tratamiento A46 mostró solo un pequeño incremento.

Palabras clave: Hortalizas, bacterias de la rizosfera, rendimiento, área foliar, fósforo, nitratos.

CHAPTER 5

INOCULATION OF RHIZOBACTERIA IN GREENHOUSE PRODUCTION OF CUCUMBER UNDER A FERTIGATION SYSTEM

5.2. ABSTRACT

Studies about the effect of inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in horticultural crops are scarce; the objective of this study was to evaluate the response of cucumber (*Cucumis sativus* L. cv Alcazar.) to inoculation with PGPR under a fertigation system in Mexicali, Baja California. The treatments consisted in three rhizobacteria strains (*Pseudomonas tolaasii* (A46), *P. tolaasii* (P61) and *Bacillus pumilus* (R44)) and a control without inoculation, all of them with three doses of fertilizer (0, 50 and 100 % of full fertilization rate). The experiment was established in a split plot design. Plant height was evaluated at seedbed stage and the following variables: leaf area, plant height, chlorophyll (SPAD), nitrates, phosphorus and potassium in cell extract of petiole, and yield were evaluated at 55 days after transplanting. In seedbed stage, seedlings inoculated with *P. tolaasii* (P61) had the highest height. In flowering stage, treatment with strain A46 at fertilizer dose of 100% had the highest leaf area (11173.7 cm²) and plant height (253.5 cm), while treatment inoculated with strain A46 combined with a fertilizer rate of 50% had the highest concentration of phosphorus (13 mg L⁻¹) and nitrate (320 mg L⁻¹) in petiole. At level zero of fertilizer inoculation increased the yield, but when doses of fertilizer increase to 50% yield response to inoculation decreased and at 100% of fertilizer dose inoculation with strains P61 and R44 did not increase yield, and only lightly with strain A46.

Keywords: *Pseudomonas tolaasii*, *Bacillus pumilus*, leaf area, phosphorus, nitrates, vegetables

5.3. INTRODUCCIÓN

Las prácticas agrícolas actuales requieren del uso intensivo de fertilizantes químicos para la obtención de altos rendimientos en los cultivos, dando además como resultado, problemas, ambientales (Adesemoye *et al.*, 2008;Karakurt *et al.*, 2011). Sin embargo, recientemente han surgido técnicas agrícolas amigables con el ambiente entre las que se encuentran la utilización de biofertilizantes que contienen microorganismos benéficos que sirven para mejorar el crecimiento vegetal, además de suministrar nutrientes y mantener la calidad del suelo sin afectar los rendimientos (Esitken *et al.*, 2006; Karlidag *et al.*, 2007).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) representan una amplia variedad de bacterias del suelo, que cuando se asocian con una planta hospedera estimulan el crecimiento (Rokhzadi y Toashih, 2011). La forma en que actúan las RPCV aún no se ha comprendido en su totalidad, pero las funciones más conocidas se relacionan con: la capacidad de producir fitohormonas como auxinas, citocininas y giberilinas; la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y otros nutrientes, el antagonismo contra microorganismos fitopatógenos, la producción de sideróforos, la síntesis de antibióticos, enzimas o metabolitos fungicidas, y la competencia con microorganismos perjudiciales (Adesemoye *et al.*, 2009; Karakurt *et al.*, 2011; Rokhzadi y Toashih, 2011).

Para estimular el crecimiento de las plantas, los microorganismos primero colonizan la rizosfera (Hatzinger y Alexander, 1994) y provocan una respuesta en la planta hospedante (Holl y Chanway, 1992). Así mismo, el suelo influye en la colonización microbiana de dos maneras, ya sea por su naturaleza físico-química o por la comunidad bacteriana existente asociada al suelo; la comunidad microbiológica nativa del lugar puede ser afectada ya sea positiva o negativamente por la inoculación de RPCV (Marilley *et al.*, 1998) por lo que las RPCV inoculadas deben

competir con los microorganismos nativos y sobrevivir en el suelo (Cattelan *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2003).

El uso de estos microorganismos benéficos está dirigido a reducir significativamente el uso de fertilizantes sintéticos en el sector agrícola, por lo que su inoculación puede beneficiar a la planta mediante el mejoramiento del desarrollo de la raíz y biomasa, el contenido de nutrientes y el rendimiento (Amir *et al.*, 2005). Esta biotecnología en países en desarrollo es una alternativa para la obtención de mejores rendimientos (Cassán *et al.*, 2009). La inoculación con RPCV puede proporcionar hasta el 31% de N que requiere el maíz, 40% de N que necesitan las plántulas de palma de aceite; el 20 % del N que demandan las plantas de arroz, y hasta 70% del N requerido por la caña de azúcar. La fijación de nitrógeno o solubilización de nutrientes se incrementa cuando se aplican bajas dosis de fertilizante en el suelo; en contraste cuando la dosis del fertilizante es alta se presentan una disminución de la fijación de nitrógeno o de la solubilización de nutrientes (Mia *et al.*, 2010). Por lo anterior, la inoculación de plantas con microorganismos ha ganado más importancia, en particular en la horticultura y en la producción de plantas en vivero (Erturk *et al.*, 2010).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de pepino (*Cucumis sativus* L.) a la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal en un sistema de fertirriego en condiciones de invernadero.

5.4. MATERIAL Y MÉTODOS

Material microbiológico

Se utilizaron las cepas *Pseudomonas tolaasii* (A46), *Pseudomonas tolaasii* (P61), *Bacillus pumilus* (R44), obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología, del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.

Preparación del inóculo

Cada una de las cepas fue crecida por separado en caldo nutritivo a 24°C por 72h hasta obtener una concentración 1×10^9 UFC mL⁻¹ con el fin de usarlas como inóculo en los almácigos.

También se preparó inoculante bacteriano a base de turba, partiendo de cultivos crecidos de la misma forma señalada arriba. Los cultivos bacterianos fueron mezclados cada uno con turba estéril y neutra (pH 7.0) en proporción 1:3 v/p. Una vez impregnada la turba con las bacterias, los inoculantes fueron incubados por dos semanas a 24°C para estimular el crecimiento; la carga bacteriana en el acarreador fue en promedio de 5×10^9 UFC mL⁻¹.

Análisis de suelo

Debido a que los suelos de Mexicali son escasos en materia orgánica y muy arcillosos, al suelo utilizado se le agregó arena y composta en una proporción 1:3 p/p, respectivamente. A partir de esta mezcla se llevo a cabo el análisis del sustrato, del cual se tomaron cuatro muestras de aproximadamente 250 g, considerando cuatro puntos equidistantes en el invernadero. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Fertilidad de Suelos en el Colegio de Postgraduado; Campus Montecillo para su análisis químico y cuyos resultados se muestran en el cuadro 5.1.

Cuadro 5.1. Análisis químico del suelo utilizado en el experimento

Variable	Valor
pH (1:2 p/v) H ₂ O	8
Conductividad eléctrica	3 ds m ⁻¹
Materia orgánica	6 %
Nitrógeno	0.30 %
Fósforo	284 mg Kg ⁻¹
Potasio	11 cmoles Kg ⁻¹

Experimento de invernadero y material vegetal

El experimento se realizó en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, en el Valle de Mexicali. Las semillas de pepino (*Cucumis sativus* cv. Alcazar) fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 2 % por 30 s, y posteriormente, lavadas con agua destilada estéril.

Los almácigos de 128 cavidades se llenaron parcialmente con peat moss (marca Premier®) esterilizado; y en cada cavidad se colocó una semilla de pepino a la cual se aplicaron 2 mL de la correspondiente suspensión bacteriana por semilla, mientras que al tratamiento testigo se le agregó 2 mL de caldo nutritivo sin bacteria por cavidad.

Las plántulas fueron trasplantadas en el suelo del invernadero a los 25 días después de la siembra, realizando una segunda inoculación con el inóculo a base de turba, en proporción de 1kg por hectárea.

El experimento se estableció bajo un diseño experimental de parcelas divididas, donde la parcela grande se refiere a las dosis de fertilizante (sin fertilizante, 50% y 100% de dosis de fertilización recomendada), y la parcela pequeña correspondió a la inoculación con las cepas bacterianas (tres cepas y el testigo), cuya combinación da un total de 12 tratamientos, y cada uno con tres repeticiones. La parcela pequeña contenía un total de 48 plantas, distribuidas en surcos y distancia entre plantas de 0.50 m, mientras que la parcela grande tenía un total de 192 plantas.

El sistema de riego utilizado fue por goteo, por el cual la dosis de fertilizante fue aplicada de acuerdo a la etapa fenológica del cultivo (Cuadro 5.2). Las plantas fueron conducidas verticalmente a un solo tallo, y para ello se podaron los brotes laterales.

Cuadro 5.2. Dosis de fertilizante utilizando durante el experimento

N-P-K	Dosis de fertilizante 100 % (g)			Dosis de fertilizante 50 % (g)		
	Etapa 1 15 dds	Etapa 2 30 dds	Etapa 3 50 dds	Etapa 1 15 dds	Etapa 2 30 dds	Etapa 3 50 dds
11-00-00-16Mg	9.2	8.3	8.3	4.6	4.15	4.15
15.5-00-00-19 CaCO ₃	77.0	108.7	63.15	38.5	54.35	31.575
13-2-44	72.2	60.6	60.6	36.1	30.3	30.3
12-61-00	30.4	13.3	23.06	15.2	6.65	11.53

dds: días después de la siembra

* La dosis empleada se diluía en 200 L de agua.

Población microbiana nativa del sustrato del invernadero

Antes de establecer el experimento se tomó una porción de suelo de tres diferentes zonas del invernadero que se mezcló homogéneamente y de la cual se pesaron submuestras de 10 g que se colocaron en frascos de vidrio de 90 mL agua destilada estéril. La suspensión del suelo se homogeneizó durante 10 minutos, y luego se realizaron diluciones con una micropipeta de 1 mL, de cada dilución se tomó una alícuota de 0.1 mL y se sembró en cajas con medio de cultivo. Para la cuantificación de hongos (Agar Papa Dextrosa, PDA) se empleó la dilución de 10^{-2} ; mientras que las bacterias totales (Agar nutritivo) y bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (medio de Rennie), se cuantificaron en la dilución 10^{-3} . Para bacterias solubilizadoras de fosfato (medio Pikovskaya) y actinomicetos (medio Czapek) se usó la dilución 10^{-2} y 10^{-3} respectivamente. Una vez que se sembraron las alícuotas de las diluciones en las cajas de medios de cultivo por triplicado, estas se incubaron a 28°C de 5 a 7 días, y se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), para posteriormente transformar los datos a logaritmo base 10.

Población bacteriana inoculada en la rizosfera de pepino

Para la cuantificación de la población de bacterias de la rizosfera en plantas de pepino se realizaron dos muestreos, el primero a los 25 días después de la siembra, y el segundo a los 40 días después del trasplante. En ambos muestreos se tomó 1 g de suelo adyacente a la raíz de la planta y se colocó en tubos con 9 ml de agua destilada estéril, y homogeneizó durante 10 minutos, para después realizar diluciones con una micropipeta de 1 mL. Se tomó una alícuota de 0.1 mL de la dilución 10^{-6} y se sembró en agar nutritivo para cuantificar las bacterias totales y en medio Pikovskaya para determinar las bacterias solubilizadoras de fosfato. Se sembraron tres cajas por dilución, que fueron incubadas a 28°C durante 7 días y una vez concluida la incubación se realizó el conteo de UFC, para posteriormente convertir los datos a logaritmo base 10.

Variables evaluadas en plantas

Se realizó un muestreo a los 55 días después del trasplante para evaluarla altura de planta, el diámetro de tallo, el contenido relativo de clorofila en hojas con un equipo SPAD-502 (Minolta, Japan) en el que se consideró la hoja más recientemente madura y el área foliar mediante un medidor marca LICOR (LI 3000, Inc. Lincoln, NE, EUA).

La evaluación del contenido de nitratos, potasio y fósforo se llevó a cabo a partir del extracto celular de peciolo. Los peciolos de la tercera y cuarta hoja fueron macerados, hasta obtener aproximadamente 2 mL de extracto, y posteriormente se depositaron unas gotas en los sensores específicos. Para nitratos se utilizó el ionómetro modelo C-141 (rango de 4 a 6200 ppm) y para potasio se utilizó el modelo C-131 (rango de 5 a 4900 ppm), ambos de la marca Horiba (Spectrum Technologies, Inc.). Para la determinación de fósforo se utilizó el medidor Hanna modelo HI 93706 con rango de 0.0 a 15.0 mg L⁻¹.

A partir del día 50 después del trasplante, se llevo a cabo la cosecha de frutos, realizando cortes cada tercer día. Y el último corte se realizó en el día 70. Las variables evaluadas fueron rendimiento por planta (kg) y el rendimiento por m² (kg m⁻²).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada una de las variables fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha= 0.05$) utilizando el paquete estadístico SYSTAD 10.2 (Systat Software Inc., California, USA).

5.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Población microbiana nativa del suelo del invernadero

El análisis microbiológico del suelo del invernadero mostró que las bacterias totales, las fijadoras de nitrógeno de vida libre y los actinomicetos presentaron mayor población que la población de hongos y de bacterias solubilizadoras de fosfato (Figura 5.1). Olalde y Aguilera (1998) consideran que una rizosfera alta en bacterias será cuando en el suelo haya un número de 10^6 y 10^7 bacterias g⁻¹. Comparando esos valores con nuestros resultados, las bacterias del suelo fueron menores, posiblemente debido a las condiciones del suelo.

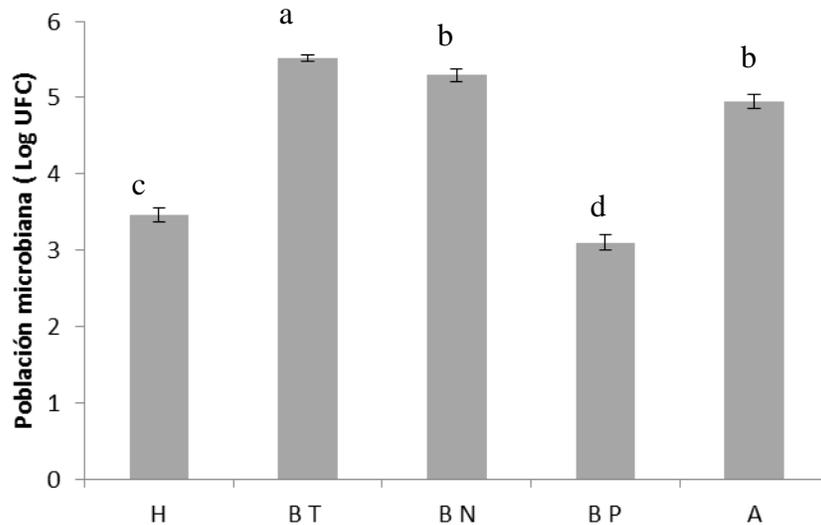


Figura 5.1. Población de microorganismos en el suelo del invernadero antes del establecimiento del experimento. H= Hongos, BT= bacterias totales, BN= bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, BP= Bacterias solubilizadoras de fosfato, y A= actinomicetos. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.05$). n = 3, medias \pm Error estándar.

Población bacteriana en la rizosfera de pepino en almácigo

El análisis microbiológico de las plántulas de pepino a los 25 días después de la siembra a nivel de almácigo, mostró que el tratamiento inoculado con la cepa R44 (*Bacillus pumilus*) mostró el mayor número de bacterias totales, mientras que el tratamiento con la cepa P61 (*Pseudomonas tolaasii*) tuvo el mayor número de bacterias solubilizadoras de fosfato. Por otra parte, el tratamiento inoculado con la cepa A46 (*Pseudomonas tolaasii*) presentó el menor número de bacterias en comparación con los tratamientos inoculados, no obstante, presentó mayor número de bacterias solubilizadoras y de bacterias totales en comparación con el testigo (Figura 5.2). Lo anterior se puede deber a que la composición microbiana del suelo depende de los exudados radicales que libera la planta (Mazzola, 2004), y de la disponibilidad de nutrientes

(Ibekwe *et al.*, 2010). Por ejemplo, se sabe que el género *Pseudomonas* tiene la capacidad de solubilizar las fracciones orgánicas e inorgánicas del fósforo presente en el suelo, por lo que es uno de los géneros bacterianos más estudiados con propósito de la elaboración de inoculantes microbianos (Useche *et al.*, 2005).

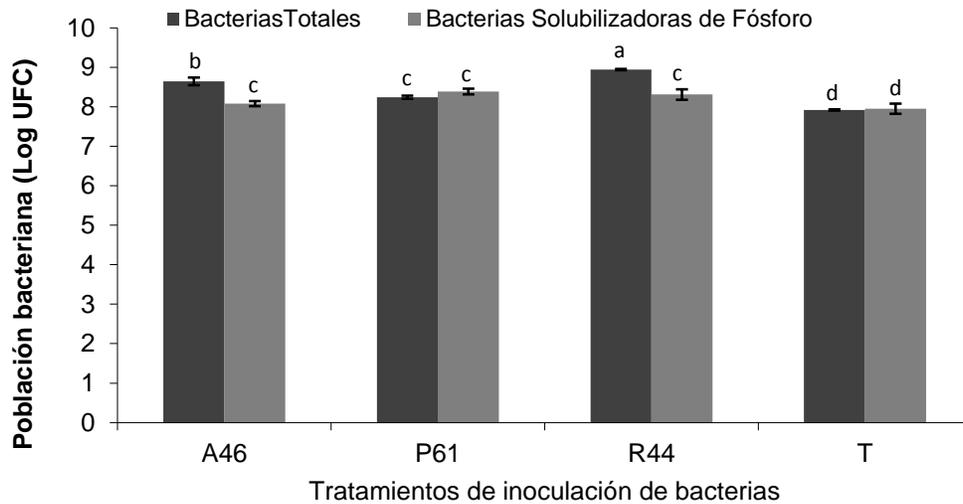


Figura 5.2. Población bacteriana presente en la rizosfera de plántulas de pepino en almácigo a los 25 días después de la siembra. A46 = *Pseudomonas tolaasii*, P61= *Pseudomonas tolaasii*, R44= *Bacillus pumilus*. T= Testigo (sin inocular). Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas (Tukey $\alpha= 0.05$). n= 3 repeticiones por tratamiento, medias \pm Error estándar.

Los tratamientos inoculados con las cepas P61 y A46 que corresponden a la bacteria *Pseudomonas tolaasii*, y el tratamiento con la cepa R44 (*Bacillus pumilus*) presentaron la mayor altura de plántulas en almácigo en comparación con el testigo; (Figura 5.3A y B), ya que la colonización por parte de las rizobacterias aumentó el número de raíces, resultado probable de la secreción de fitohormonas (El Zemrany *et al.*, 2007).

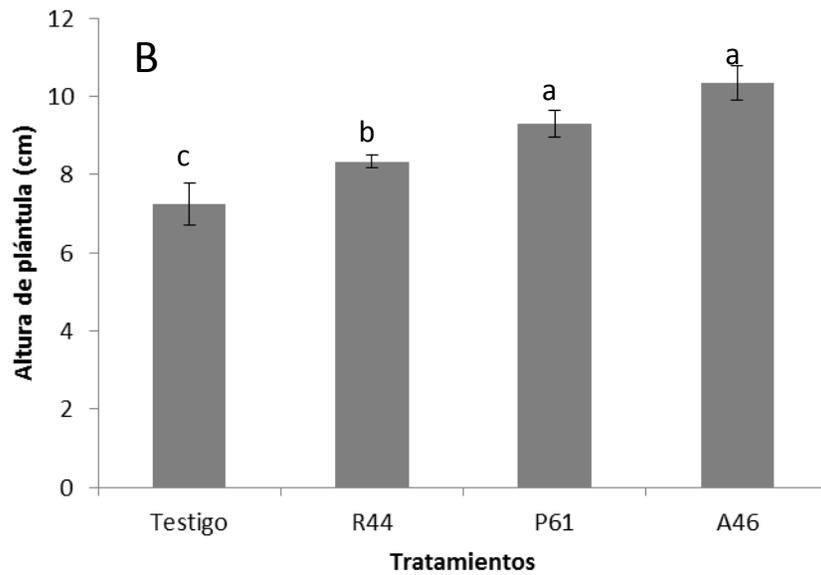


Figura 5.3 Altura de plántulas de pepino (A y B) en almácigo con la inoculación de tres cepas de rizobacterias a los 25 días después de la siembra. A46 = *Pseudomonas tolaasii*, P61= *Pseudomonas tolaasii*, R44= *Bacillus pumilus* T= Testigo (sin inocular). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha= 0.05$). N= 3 repeticiones por tratamiento, medias \pm Error estándar.

En la etapa de floración a los 40 días después del trasplante, se encontró que el tratamiento inoculado con la cepa R44 (*Bacillus pumilus*) en combinación con la dosis del 0 % de fertilizante presentó el mayor número de bacterias totales (Figura 5.4 A). De igual manera, los tratamientos R44, P61 y A46 con una dosis de 50 % de fertilizante presentaron mayor número de bacterias totales; mientras que los testigos con 100 % y 50 % de fertilización mostraron el menor número (Figura 5.4 A).

De manera general, la mayor población de bacterias solubilizadoras de fosfato se observó en todos los tratamientos inoculados en comparación con los testigos para cada nivel de dosis de fertilizante (Figura 5. 4B), lo que sugiere que las rizobacterias correspondientes a las cepas inoculadas se establecieron en la rizosfera de pepino, ya que el atributo que poseen estas cepas es el de solubilizar fosfatos, dando una respuesta positiva.

La inoculación de las tres cepas de bacterias estimuló el número de bacterias presentes en la rizosfera, dando respuestas positivas en el crecimiento de la planta. En algunas investigaciones se ha observado que la inoculación de bacterias exógenas puede modificar a los microorganismos nativos, y del mismo modo, un inoculante puede ser afectado por ellos (Ofeck *et al.*, 2009). Por lo tanto, las bacterias nativas de un suelo pueden tener un aumento, disminución o ningún efecto sobre la eficacia de las RPCV (Castro-Sowinski *et al.*, 2007). En un estudio realizado por Baudoin *et al.* (2009) encontraron que la inoculación con *Azospirillum lipoferum* beneficia a la población microbiana nativa del lugar, teniendo el cultivo mayor número de raíces, mejorando parámetros de crecimiento en las plantas.

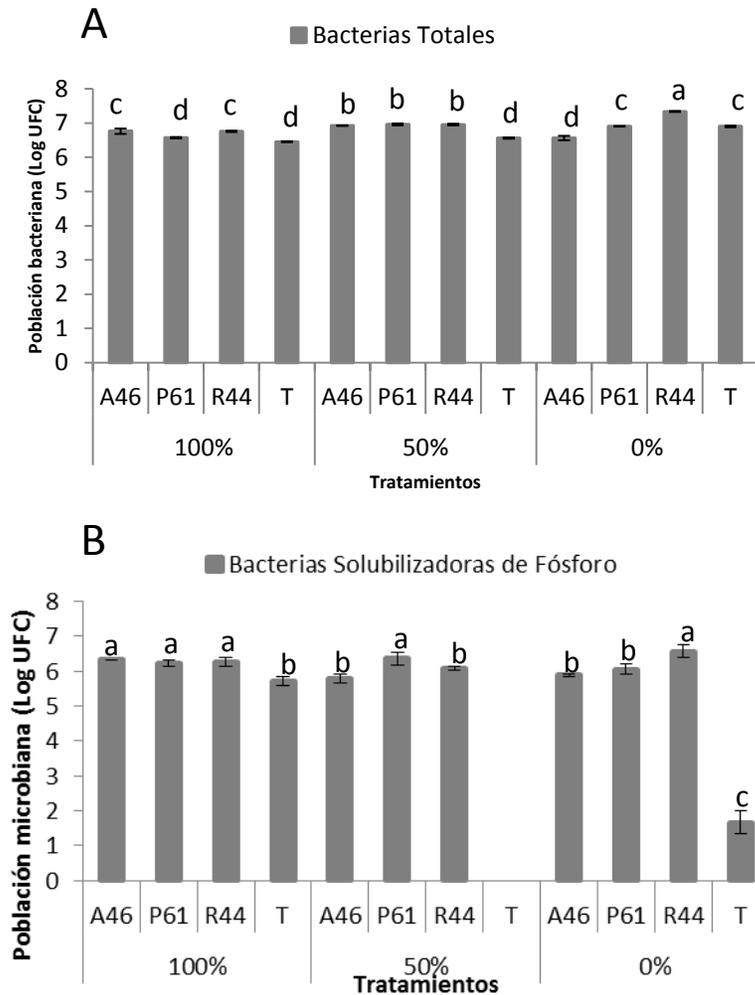


Figura 5.4 Población de bacterias presentes en la rizosfera de pepino a los 40 días después del trasplante (etapa de floración). A) Bacterias totales, B) Bacterias solubilizadoras de fosfato. A46= *Pseudomonas tolaasii*, P61= *Pseudomonas tolaasii*, R44= *Bacillus pumilus*, T= Testigo (sin inocular). Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$). N= 3 repeticiones por tratamiento, medias \pm Error estándar.

Los resultados obtenidos en este trabajo denotan que las rizobacterias se multiplicaron y se establecieron en la rizosfera, y probablemente dando como consecuencia el estímulo de bacterias nativas. Por otra parte, el alto número de bacterias totales en los tratamientos se deba a una mayor secreción de exudados radicales que estimula a la comunidad microbiana. La introducción de microorganismos tiene un efecto mínimo en la estructura de la población microbiana autóctona; sin embargo, es la fisiología de la planta la que causa un cambio en la comunidad microbiana de la rizosfera (Piromyos *et al.*, 2007).

Variables de crecimiento vegetal

El tratamiento inoculado con la cepa A46 (*Pseudomonas tolaasii*) en combinación con el fertilizante al 100 % presentó significativamente mayor área foliar, y altura de planta con respecto a los demás tratamientos, mientras que el tratamiento inoculado con la cepa A46 sin fertilizante presentó el valor más bajo (Cuadro 5.3). Estas respuestas en crecimiento, se pueden deber a la producción de fitohormonas por parte de las RPCV (Karakurt y Aslantas, 2010). Aunque también puede deberse a la capacidad de solubilización de fosfatos que poseen las cepas inoculadas.

Por otra parte la inoculación de las bacterias no produjo diferencias significativas en la concentración de clorofilas (Cuadro 5.3) y potasio (Datos no mostrados). Con respecto a la concentración de fósforo, el tratamiento inoculado con la cepa *Pseudomonas tolaasii* (A46) con 50 % de fertilizante, presentó la mayor concentración de este elemento en el peciolo de la planta, mientras que la mayor concentración de nitratos en peciolo se obtuvo en plántulas sin la inoculación de bacterias con la aplicación de fertilizante al 100% (Cuadro 5.3). Estos resultados pueden atribuirse a que las bacterias de la rizosfera inoculadas intervienen en la adquisición de

nutrientes ya sea directamente por medio de la movilización, inmovilización o indirectamente a través de los cambios que inducen en la morfología y en la fisiología de la raíz (Babalola, 2010).

Cuadro 5.3. Efectos de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en área foliar, altura, contenido de clorofila (Unidades SPAD), y fosfatos y nitratos en peciolo de pepino (*Cucumis sativus* cv. Alcazar) a 55 días después del trasplante.

Inoculación bacteriana	Dosis de fertilización (%)	Área foliar (cm ²)	Altura (cm)	Clorofila (SPAD)	Contenido (mg L ⁻¹)	
					Fósforo	Nitratos
<i>Pseudomonas tolaasii</i> (A46)	0	4324.2 i	181.7d	37.3 a	8.06ab	136.7d
	50	8611.9 d	218.7abc	40.7 a	13.02 a	180.0cd
	100	11173.7 a	253.5 a	42.9 a	4.9b	223.3cb
<i>Pseudomonas tolaasii</i> (P61)	0	5240.1 gh	196cd	38.4 a	4.0b	126.7d
	50	7885.3 ef	215.7abcd	42.4 a	5.98b	176.7cd
	100	9094.9 d	240 abc	44.3 a	4.82b	293.3ab
<i>Bacillus pumilus</i> (R44)	0	5728.5 g	207.3bcd	40.5 a	9.54ab	140.0d
	50	7723.8 ef	220.7abc	41.4 a	8.4ab	220.0cb
	100	9736.5 c	224.7abc	47.4 a	7.82ab	290.0ab
sin inoculación	0	5223.6 gh	181.0 d	38.9 a	6.08b	193.3cd
	50	7280.8 ef	213.3abcd	42.3 a	6.26b	223.3cb
	100	10836.2 b	235.3abc	41.6 a	6.52b	320.0a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey $\alpha= 0.05$). n= 3 repeticiones por tratamiento.

Los resultados obtenidos concuerdan con Mia et al. (2009) quienes mencionan que las RPCV pueden aumentar la concentración de N, P y Ca en tallo, principalmente en tratamientos donde la dosis de fertilizante es mínima, indicando que a una dosis alta de fertilizante la bacteria es inhibida.

Cuadro 5.4. Efecto de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en el rendimiento de frutos de pepino (*Cucumis sativus* cv. Alcazar).

Inoculación bacteriana	Dosis de fertilización (%)	Rendimiento (kg)	
		Planta	m ²
<i>Pseudomonas tolaasii</i> (A46)	0	4.6g	11.6g
	50	8.6c	21.5c
	100	12.9a	32.3a
<i>Pseudomonas tolaasii</i> (P61)	0	5.4f	13.5f
	50	8.4c	21.1c
	100	11.5b	28.8b
<i>Bacillus pumilus</i> (R44)	0	4.3h	10.7h
	50	8.3d	20.7d
	100	10.9b	27.3b
Sin bacteria	0	3.2i	8.1 i
	50	7.6e	18.9e
	100	12.6b	31.4b

Valores mostrados como promedios de tratamientos. n= 3 repeticiones por tratamiento. Valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes.

El tratamiento inoculado con la cepa A46 y con 100% de fertilizante obtuvo el rendimiento más alto (32.3 Kg/m²), aunque la diferencia con respecto al testigo (31.4 Kg/m²) al que se le aplicó fertilizante al 100 % fue pequeña. En general, las dosis de 0% y 50% de fertilizante tuvieron rendimientos menores que la dosis de 100 %; no obstante, los tratamientos inoculados bajo las dosis de 0% y 50 % presentaron rendimientos más altos en comparación con sus correspondientes testigos (Cuadro 5.4). Este incremento se puede atribuir a que posiblemente

la inoculación de las rizobacterias favoreció el crecimiento radical y la disponibilidad de nutrientes, como ha sido discutido por Eifediyi y Remison(2010). De igual manera, la combinación entre microorganismos y fertilizantes disminuye la incidencia de enfermedades en plantas fertilizadas (que son más suculentas para los patógenos) principalmente a través de la secreción de metabolitos secundarios o por la inducción de la resistencia sistémica (Kloepper *et al.*, 2004), dando como resultado mayores rendimientos, como sucedió en este trabajo. Por ejemplo se ha observado que la inoculación de *Bacillus amyloliquefaciens* en tomate resulta en mayores rendimientos en comparación con el testigo (Gül *et al.*, 2008), lo que se confirmó en este experimento.

En la Figura 5.5 se indica en color gris, el máximo rendimiento que podría obtener la planta, cuando fue fertilizada con las tres dosis (0 %, 50 % y 100 %), mientras que en color negro es el incremento del rendimiento cuando las plantas son inoculadas con algunas cepas.

A cero dosis de fertilizante, la inoculación favorece el aumento en el rendimiento en las plantas de pepino, pero al aumentar la dosis de fertilizante a 50% la respuesta en el rendimiento de las plantas a la inoculación disminuye, y al 100% de fertilizante la inoculación no aumenta el rendimiento en tratamientos como P61 y R44. No obstante, el tratamiento A46 mostró solo un pequeño incremento (Figura 5.5). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Adesemoye *et al.* (2009) quienes encontraron que las plantas con dosis baja de fertilizante mineral en combinación con la inoculación de bacterias, presentaron mayor altura, peso seco y mayor rendimiento, pero cuando la dosis de fertilizante aumentó ellos observaron que se obtiene menor respuesta la inoculación de rizobacterias.

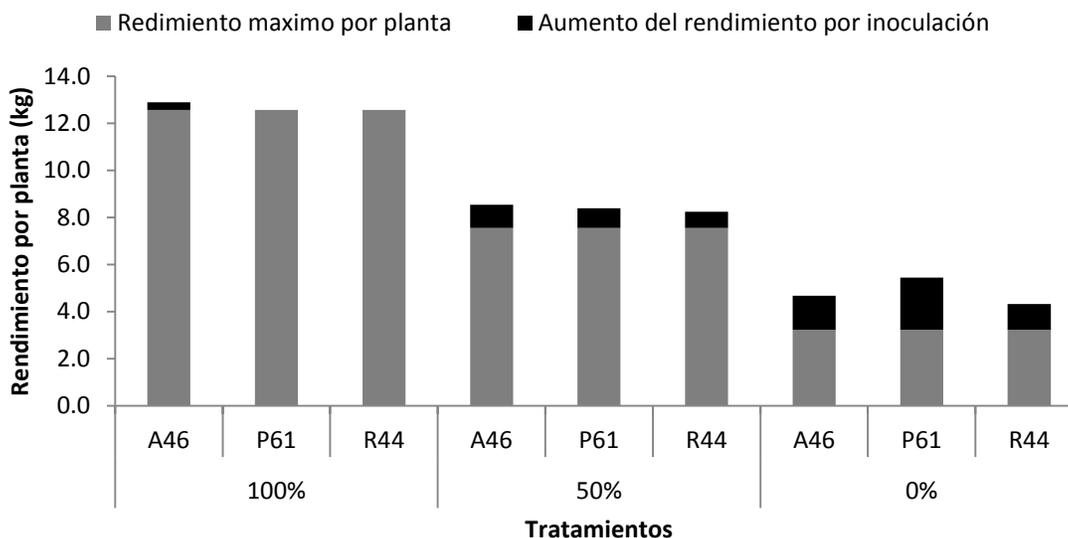


Figura 5.5. Efectos de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en el rendimiento de pepino (*Cucumis sativus* cv. Alcazar). Las barras grises corresponden al rendimiento máximo de la planta y las barras oscuras indican el aumento que se tienen en rendimiento cuando se inocula con las cepas. A46= *Pseudomonas tolaasii*, P61= *Pseudomonas tolaasii*, R44= *Bacillus pumilus* T= Testigo (sin inocular). n= 3 repeticiones por tratamiento, medias \pm Error estándar.

5.6. CONCLUSIONES

La aplicación de RPCV incrementa la altura de planta, área foliar, la concentración de nutrientes y el rendimiento. No obstante, la utilización solo de RPCV no es suficiente para obtener los rendimientos alcanzados con fertilización química. Lo anterior sugiere la búsqueda de la dosis ideal de fertilizante químico y de biofertilizante, con el objetivo de que las funciones de la rizobacterias no se inhiban.

5.7. LITERATURA CITADA

- Adesemoye, A.O., H.A. Torbert and J.W. Kloepper.** 2008. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian Journal of Microbiology* 54: 876–886.
- Adesemoye, A. O., H. A. Torbert and J. W. Kloepper.** 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology* 58:921–929.
- Amir, H. G., Z. H. Shamsuddin, M. S. Halimi, M. Marziah and M. F. Ramlan.** 2005. Enhancement in nutrient accumulation and growth of oil palm seedlings caused by PGPR under field nursery conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36: 2059–2066.
- Babalola, O. O.** 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters* 32:1559–1570.
- Baudoin, E., S. Nazaret, C. Mougel, L. Ranjard and Y. Moënne-Loccoz.** 2009. Impact of inoculation with the phytostimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize. *Soil Biology and Biochemistry* 41:409–413.
- Cassán, F., D. Perrig, V. Sgroy, O. Masciarelli, C. Penna and V. Luna.** 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum*E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology* 45: 28 – 35.
- 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* 1:11.
- Cattelan, A.J., P. G. Hartel and J. J. Fuhrmann.** 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal* 63:1670-1680.
- Eifediyi, E. K and S. U. Remison.** 2010. Growth and yield of cucumber (*Cucumis sativus* L.) as influenced by farmyard manure and inorganic fertilizer. *Report and Opinion* 2:1-6
- El Zemrany, H., S. Czarnes, P. D. Hallett, S. Alamercery, R. Bally and L. Jocteur.** 2007. Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillumlipoferum* CRT1. *Plant Soil* 291:109–118.
- Erturk, Y., S. Ercisli, A. Hazneda and R. Cakmakci.** 2010. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biological Research* 43:91-98.
- Esitken, A., L. Pirlak, M. Turan and F. Sahin.** 2006. Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. *Scientia Horticulturae* 110: 324–327.

- Gül, A., F. Kidoglu, Y. Tüzel and I. H. Tüzel.** 2008. Effects of nutrition and *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) growing in perlite. Spanish Journal of Agricultural Research 6: 422-429.
- Hatzinger, P.B and M. Alexander.** 1994. Relationship between the number of bacteria added to soil or seeds and their abundance and distribution in the rhizosphere of alfalfa. Plant Soil 158: 211-222.
- Holl, F.B and C.P.Chanway.** 1992. Rhizosphere colonisation and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. Canadian Journal of Microbiology 38: 303- 308.
- Ibekwe, A. M., J. A. Poss, S. R. Grattan, C. M. Grieve and D. Suarez.** 2010. Bacterial diversity in cucumber (*Cucumis sativus*) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron. Soil Biology and Biochemistry 42: 567-575.
- Karakurt, H and R. Aslantas.** 2010. Effects of some plant growth promoting rhizobacteria treated twice on flower thinning, fruit set and fruit properties on apple. African Journal of Agricultural Research 5: 384-388.
- Karakurt, H., R. Kotan, Z. F. Dadaşoğlu, R. Aslantaş and F. Şahin.** 2011. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on fruit set, pomological and chemical characteristics, color values, and vegetative growth of sour cherry (*Prunus cerasus* cv. Kütahya). Turkish Journal of Biology 35: 283-291.
- Karlıdag, H., A. Esitken, M. Turan and F. Sahin.** 2007. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. Scientia Horticulturae 114: 16–20.
- Klopper, J.W., M.S. Reddy., R. Rodríguez-Kabana, D. S. Kenney, N. Kokalis-Burelle, N. and N. Martinez-Ochoa.**2004. Application for rhizobacteria in transplant production and yield enhancement. Acta Horticulturae 631:219-229.
- Marilley, L., G. Vogt, M. Blanc and M. Aragno.** 1998. Bacterial diversity in bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA. Plant Soil 198:219-224.
- Mazzola, M.** 2004. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. Annual Review of Phytopathology 42:35–59.
- Mia, B. M. A., Z. H. Shamsuddin, Z. Wahab and M. Marziah.** 2009. The effect of rhizobacterial inoculation on growth and nutrient accumulation of tissue-cultured banana plantlets under low N-fertilizer regime. African Journal of Biotechnology 8: 5855-5866.
- Mia, B. M.A., Z.H. Shamsuddin, Z. Wahab and M. Marziah.** 2010. Rhizobacteria as bioenhancer and biofertilizer for growth and yield of banana (*Musa* spp. cv. ‘Berangan’). Scientia Horticulturae 126: 80–87.
- Ofeck, M. Y. Hadar and D. Minz.** 2009. Comparison of effects of compost amendment and of single-strain inoculation on root bacterial communities of young cucumber seedlings. Applied and Environmental Microbiology 75: 6441-6450.
- Olalde, P. V y L. I. Aguilera, G.** 1998. Microorganismos y biodiversidad. Terra Latinoamericana 16: 289-292.

- Piromyou**, P., B. Buranabanyat, P. Tantasawat, P. Tittabutr, N. Boonkerd and N. Teaumroong. 2007. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *European Journal of Soil Biology* 47: 44-54.
- Ramos**, B., J. A. L. García, A. Probanza, M. L. Barrientos and F. J. Gutiérrez M. 2003. Alterations in the rhizobacterial community associated with *Bacillus licheniformis*. *Environmental and Experimental Botany* 49: 61- 68.
- Rokhzadi**, A. and V. Toashih. 2011. Nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with plant growth promoting rhizobacteria. *Australian Journal of Crop Science* 5:44-48.
- Useche**, Y. M., H. Valencia y H. Pérez. 2005. Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres usos de suelo en el sur del trapezio amazónico. *Acta Biológica Colombiana* 9: 170-180.

CAPÍTULO 6

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON *Pseudomonas tolaasii* Y FERTILIZACIÓN EN LA CALIDAD DE FRUTO DE PEPINO (*Cucumis sativus* L.)

6.1. RESUMEN

La inoculación con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) puede facilitar la disponibilidad de nutrientes mejorando el nivel nutricional de la planta y la calidad de los frutos en algunos cultivos hortícolas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la inoculación con RPCV en la calidad de fruto de pepino (*Cucumis sativus*L.). Se inocularon semillas de pepino con la cepa *Pseudomonas tolaasii* (A46) en combinación de tres regímenes de fertilización (100%, 50% y 0%), además se incluyó un testigo sin inocular. El experimento consistió en un diseño experimental de bloques al azar. Después de 73 días desde la inoculación se cosecharon los frutos producidos para determinar: pH, los sólidos solubles totales (SST), la acidez titulable (AT), y el contenido de nitratos y fosfatos. El valor de pH en los frutos dependió de la dosis de fertilizante; a menor fertilización el valor fue más bajo, así mismo la inoculación hizo que disminuyera este valor. El valor más alto de SST (4.87) y contenido de fósforo (10.86 mg L⁻¹) se encontró en el tratamiento donde se inoculó la cepa de rizobacteria en combinación con fertilizante al 100 %. Estos hallazgos sugieren que la inoculación con rizobacterias puede mejorar los atributos comerciales del fruto de pepino.

Palabras clave: Sólidos solubles totales, acidez titulable, nitratos, fosfatos

CHAPTER 6

EFFECT OF INOCULATION WITH *Pseudomonas tolaasii* AND FERTILIZATION ON FRUIT QUALITY OF CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.)

6.2. ABSTRACT

Inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) can facilitate the availability of nutrients improving plant nutrition and fruit quality in some horticultural crops. The aim of this study was to evaluate the effect of inoculation with PGPR on fruit quality of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Cucumber seeds were inoculated with the strain *Pseudomonas tolaasii* (A46) in combination with three fertilization regimes (0%, 50% and 100% of the fertilization rate), and a control without inoculation was also included. The experiment was established in a randomized block experimental design. At 73 days of inoculation fruits were harvested to determine pH, total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA), and content of nitrates and phosphates. The pH value on fruit was associated to the dose of fertilizer; at low fertilization rate fruit pH was lower than at high fertilization rate, also inoculation decreased pH value. The highest values of TSS (4.87) and phosphates (10.86 mg L⁻¹) were found in the treatment with inoculation in combination with full rate of fertilization. The findings suggest that inoculation with rhizobacteria can improve the commercial fruit quality of cucumber.

Keywords: Total soluble solids, acidity, nitrates, phosphates, vegetables

6.3. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos del suelo son importantes en el reciclaje de nutrientes, en la descomposición de materia orgánica y en la estructura del suelo (Shen *et al.*, 2008), aunque la diversidad de éstos ha sido alterada por el aumento de la fertilización química y por la intensificación del uso de tierra (Shen *et al.*, 2010). Además, los fertilizantes son energéticamente costosos y su producción requiere el uso de combustibles fósiles que contribuyen a la emisión de gases de efecto de invernadero (Mia *et al.*, 2010).

El uso excesivo de fertilizantes contribuye también al deterioro de la calidad del suelo y contaminación de cuerpos de agua, siendo esto claramente insostenible (Kang *et al.*, 2010), por lo que se tienen que buscar alternativas para tener una agricultura más sustentable, como lo es el uso de microorganismos benéficos que incrementen la eficiencia del aprovechamiento de los fertilizantes por las plantas.

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) mejoran la capacidad de absorción de nutrientes, aumentan la germinación de semillas (Gül *et al.*, 2008) y estimulan el rendimiento de cultivos como pimiento y tomate (Mena-Violante y Olalde-Portugal, 2007); también pueden aumentar la calidad de fruto en relación a la apariencia (tamaño, forma, color, brillo), la textura (firmeza, frescura), el sabor, y el valor nutritivo (Aghili *et al.*, 2009).

La calidad del fruto depende del tipo de sustrato, la fertilización, el estado nutricional de la planta (Gajc-Wolska *et al.*, 2008) y el manejo de plagas (Gómez-López *et al.*, 2006). Esta calidad se verá reflejada en la cantidad de sólidos solubles, azúcares, ácidos orgánicos y pH, las cuales son características importantes para el mercado (Huang *et al.*, 2009). Aun cuando las RPCV mejoran el estado nutricional de las plantas, poco se sabe sobre sus efectos en el desarrollo y calidad de frutos (Dursun *et al.*, 2010). Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar el

efecto de la inoculación de *Pseudomonas tolaasii* en la calidad de los frutos de pepino (*Cucumis sativus*L.).

6.4. MATERIAL Y MÉTODOS

Material microbiológico

Se utilizó la cepa *Pseudomonas tolaasii* (A46), la cual fue crecida en caldo nutritivo a 24 °C por 72 h hasta obtener una concentración aproximada de 1×10^9 UFC mL⁻¹.

Material vegetal y establecimiento del experimento

El experimento se llevo a cabo en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California. Las semillas de pepino (*Cucumis sativus* cv. Alcazar) fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 2 % por 30 s y posteriormente, lavadas con agua destilada estéril. La siembra de la semilla se realizó en charolas de 128 cavidades con peat moss (marca Premier®) esterilizado. En cada cavidad se colocó una semilla y en seguida se aplicaron 2 mL de la suspensión bacteriana. Al testigo sólo se agregaron 2 mL de caldo nutritivo sin bacteria. Una vez inoculadas las semillas, éstas después se cubrieron con otra capa de peat moss estéril.

Las plántulas fueron trasplantadas a los 25 días después de la siembra en el suelo del invernadero. Se estableció un diseño experimental de bloques al azar con arreglo factorial 2X3, donde los factores fueron: inoculación (con cepa y sin cepa) y fertilización (testigo, 50% y 100%), resultando un total de seis tratamientos, y cada uno con tres repeticiones.

El experimento se condujo en invernadero bajo un sistema de riego por goteo, donde la dosis de fertilizante fue administrada en el riego y variada de acuerdo a la etapa fenológica del cultivo (Cuadro 6.1). Las plantas fueron conducidas verticalmente a un solo tallo, y para ello se

podaron los brotes laterales. La cosecha de frutos se realizó a partir del día 50 después del trasplante y la calidad de fruto se determinó en el último corte.

Cuadro 6.1. Dosis de fertilizante utilizando durante el experimento

N-P-K	Dosis de Fertilizante 100 % (g)			Dosis de Fertilizante 50 % (g)		
	Etapa 1 15 dds	Etapa 2 30 dds	Etapa 3 50 dds	Etapa 1 15 dds	Etapa 2 30 dds	Etapa 3 50 dds
11-00-00-16Mg	9.2	8.3	8.3	4.6	4.15	4.15
15.5-00-00-19 CaCO ₃	77.0	108.7	63.15	38.5	54.35	31.575
13-2-44	72.2	60.6	60.6	36.1	30.3	30.3
12-61-00	30.4	13.3	23.06	15.2	6.65	11.53

dds: días después de la siembra

* La dosis empleada se diluía en 200 L de agua.

Variables evaluadas

Apartir de la extracción del jugo de seis frutos de pepino de cada tratamiento, se obtuvieron tres muestras para evaluar las variables: 1) pH con un potenciómetro, 2) sólidos solubles totales (grados brix) con un refractómetro modelo N1-á (Atago, Japón) y 3) acidez titulable calculada con 10 mL de jugo del fruto, titulando con 0.1 M de NaOH hasta llegar a pH 8.1, los valores de acidez titulable obtenidos se expresaron en porcentaje. Además se determinó el contenido de K⁺ con un ionómetro marca Horiba (Spectrum Technologies, Inc.) modelo C-131 con rango de 5 a 4900 ppm, el contenido de NO₃⁻ se determinó con un ionómetro marca Horiba (Spectrum Technologies, Inc.) modelo C-141 con rango de 4 a 6200 ppm, y el contenido de fosfatos se determinó con un espectrofotómetro marca Hanna modelo HI93713 con rango de 0.0 a 15.0 mg L⁻¹.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias por Tukey ($\alpha=0.05$) utilizando el paquete estadístico SYSTAT 10.2 (Systat Software Inc., California, USA).

6.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores más altos de pH del jugo de los frutos fue de alrededor de 5.9 que corresponde al testigo con 100 % de fertilización y al tratamiento inoculado con la bacteria y con 100 % de fertilizante, mientras que en el tratamiento inoculado más 50 % de fertilizante obtuvo el valor más bajo con 5.57 (Cuadro 6.2). Los valores de pH en los frutos de pepino pueden variar entre una fecha de corte y otra, lo cual puede ser dependiente del estado nutricional del cultivo, ya que se ha observado que exceso de nitrógeno conduce a un pH más elevado en fruto (Gómez-López *et al.*, 2006). Por otro lado, los valores de pH de pepino varían de acuerdo a la variedad con que se trabaje (Rouphael *et al.*, 2010), de un valor de pH de 4 (Azarmi *et al.*, 2009) a pH 6 (Terraza *et al.*, 2009). Los sólidos solubles totales (grados Brix) relacionan el contenido total de sacarosa disuelta en el jugo lo cual es un valor importante en la evaluación y calidad de frutos (Terraza *et al.*, 2009). En el caso de pepino se han reportado valores con un rango de 3.8 a 6 dependiendo en muchas ocasiones del genotipo (Terraza *et al.*, 2009). En el presente trabajo los valores más altos y significativos de sólidos solubles totales medidos en grados brix se encontraron en los tratamientos inoculados (Cuadro 6.2). Se ha visto que la inoculación con microorganismo no incrementa los sólidos solubles totales (Dursun *et al.*, 2010).

Cuadro 6.2. Efecto de la inoculación de RPCV en pH, sólidos solubles sotaes (SST), acidez titulable (AT) y relación SST/AT de frutos de pepino (*Cucumis sativus* cv. Alcazar).

Inoculación bacteriana	Dosis de fertilizante (%)	pH	SST (° Brix)	Acidez Titulable (%)	Relación SST/AT
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	0	5.73 bc	4.66 ab	0.09 b	49.64
	50	5.57 c	4.57 b	0.11 a	41.97
	100	5.9 a	4.87 a	0.07 cd	65.18
sin inoculación	0	5.80 ba	3.93 c	0.08 bc	47.28
	50	5.77 bac	3.83 c	0.09 bc	44.92
	100	5.87 ab	3.97 c	0.06 d	61.98
Factor	Inoculación	*	*	*	*
	Fertilización	*	*	*	*
	Inoculación X fertilización	*	*	*	*

SST= sólidos solubles totales, AT= Acidez titulable. Valores mostrados como promedios de tratamientos. n= 3 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias.* Significativo $\alpha=0.05$.

El nivel de acidez de los frutos fue similar entre tratamientos inculados y no inoculados independientemente de las dosis de fertilizante, aunque el valor más bajo lo obtuvo la dosis de 100% de fertilización sin inoculación (Cuadro 6.2). La acidez titulable (AT) determina los ácidos orgánicos del fruto y las características organolépticas de éste (Carrera *et al.*, 2008). Los ácidos (cítrico, málico y tartárico) disminuyen con la maduración de los frutos, ya que se convierten en azúcares y por lo tanto aumentan los SST (Cañizares *et al.*, 2003). Se ha observado que las dosis altas en fertilización disminuye la acidez de los frutos (Ruiz y Romero, 1998), lo que concuerda con lo encontrado en este estudio.

En los tratamientos inoculados en combinación con 100% de fertilizante y su respectivo testigo se incrementó la relación SST/AT (Cuadro 6.2), esta relación indica el grado de dulzura y acidez de la fruta, así como la aceptabilidad del consumidor (Martínez-Bolaños *et al.*, 2008). este

aumento sucede cuando los SST se incrementan y la AT disminuye (Campos-Mota *et al.*, 2004; Álvarez-Herrera *et al.*, 2009), así como el pH aumenta (Gómez-López *et al.*, 2006).

En el presente experimento los tratamientos inoculados con las bacterias tuvieron un aumento en la concentración de ortofosfatos en los frutos (Cuadro 6.3). En contraste la concentración de nitratos en el fruto fue menor en los tratamientos inoculados en comparación con el testigo sin inocular, independientemente de las dosis de fertilización (Cuadro 6.3).

Cuadro 6.3. Efectos de la inoculación con RPCV en la concentración de ortofosfatos y nitratos en frutos de pepino (*Cucumis sativus* cv. Alcazar).

Inoculación bacteriana	Dosis de fertilizante (%)	Fósforo (mg L ⁻¹)	Nitratos (mg L ⁻¹)
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	0	14.52 bc	5.67 b
	50	12.06 b	6.3 ab
	100	10.86 a	5.3 b
sin inoculación	0	9.74 d	7.33 ab
	50	6.10 e	8.0 a
	100	8.70 cd	6.0 a
Factor	Inoculación	*	*
	Fertilización	*	*
	Inoculación X fertilización	*	*

Valores mostrados como promedios de tratamientos. n= 3 replicas por tratamiento. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias. *Significancia $\alpha=0.05$

Dursun *et al.* (2010) mencionan que la inoculación con RPCV en pepino puede aumentar la concentración de elementos como N, P, K, Zn, Fe, Mn, Na, Ca y Mg en frutos, debido a la estimulación de la absorción de nutrimentos por las plantas. Las RPCV pueden contribuir a la disponibilidad de P en el suelo a través de la mineralización de P orgánico o bien la

solubilización de P inorgánico (Zabihi *et al.*, 2011), aumentando con ello la disponibilidad de fósforo en el suelo, la asimilación y la concentración de fósforo en frutos como fresa (Esitken *et al.*, 2010). Por otra parte, la deficiencia de este elemento disminuye la firmeza del fruto (Knowles *et al.*, 2001).

6.6. CONCLUSIONES

La inoculación con la cepa de rizobacteria A46 mejoró algunos atributos de la calidad de los frutos de pepino, debido a que disminuye el pH y la acidez del fruto dando como resultado un aumento en la concentración de SST en los frutos, además incrementó la concentración de ortofosfatos, y disminuyó la concentración de nitratos. La inoculación con rizobacterias puede ser una alternativa para mejorar los atributos comerciales del fruto de pepino.

6.7. LITERATURA CITADA

- Aghili, F., A. H. Khoshgoftarmanesh, M. Afyuni and M. Mobli.** 2009. Relationships between fruit mineral nutrients concentrations and some fruit quality attributes in greenhouse cucumber. *Journal of Plant Nutrition* 32: 1994–2007.
- Álvarez-Herrera, J. G., J. A. Galvis y H. E. Balaguera-López.** 2009. Determinación de cambios físicos y químicos durante la maduración de frutos de champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). *Agronomía Colombiana* 27: 253-259.
- Azarmi, R., M. Torabi and B. Hajieghrari.** 2009. The effect of sheep-manure vermicompost on quantitative and qualitative properties of cucumber (*Cucumis sativus* L.) grown in the greenhouse. *African Journal of Biotechnology* 8: 4953-4957.
- Campos-Mota, L., G. A. Baca-Castillo, D. Jaén-Contreras, A. Muratalla-Lúa y R. Acosta-Hernández.** 2004. Fertirriego y micorriza en frambuesa roja cultivada en tepetate. *Agrociencia* 38:75-83.
- Cañizares, A., D. Laverde y R. Puesme.** 2003. Crecimiento y desarrollo del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) en Santa Bárbara, Estado Monagas, Venezuela. *Revista UDO (Universidad de Oriente) Agrícola* 3: 34-38. 2003.
- Carrera, A., D. Mark y R. Gil.** 2008. Algunas características físicas y químicas de frutos de cinco variedades de mango en condiciones de Sabana del estado Monagas. *Agronomía Tropical*: 27-30.
- Dursun, A., M. Ekinici and M. Figen.** 2010. Effects of foliar application of plant growth promoting bacterium on chemical contents, yield and growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Pakistan Journal of Botany* 42: 3349-3356.
- Esitken, A., H. E. Yildiz, S. Ercisli, M. F. Donmez, M. Turan and A. Gunes.** 2010. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae* 124: 62–66.
- Gajc-Wolska, J., D. Bujalski and A. Chrzanowska.** 2008. Effect of a substrate on yielding and quality of greenhouse cucumber fruits. *Journal Elemental* 13: 205-210.
- Gómez-López, M. D., J. P. Fernández-Trujillo and A. Baille.** 2006. Cucumber fruit quality at harvest affected by soilless system, crop age and preharvest climatic conditions during two consecutive seasons. *Scientia Horticulturae* 110: 68–78.
- Gül, A., F. Kidoglu, Y. Tüzel and I. H. Tüzel.** 2008. Effects of nutrition and *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) growing in perlite. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 422-429.
- Huang, Y., R. Tang, Q. Cao and Z. Bie.** 2009. Improving the fruit yield and quality of cucumber by grafting onto the salt tolerant rootstock under NaCl stress. *Scientia Horticulturae* 122: 26–31.

- Kang, S., M. Hamayun, G. Joo, A. Khan, Y. Kim, S. Kim, H. Jeong and I. Lee.** 2010. Effect of *Burkholderia* sp. KCTC11096B on some physiochemical attributes of cucumber. *European Journal of Soil Biology* 46: 264-268.
- Knowles, L., M. R. Trimble and N. R. Knowles.** 2001. Phosphorus status affects postharvest respiration, membrane permeability and lipid chemistry of European seedless cucumber fruit (*Cucumis sativus* L.). *Postharvest Biology and Technology* 21: 179–188.
- Martínez-Bolaños, M., D. Nieto-Angel, D. Téliz-Ortiz, J. Rodríguez-Alcazar, M. T. Martínez-Damian, H. Vaquera-Huerta, O. Carrillo-Mendoza.** 2008. Comparación cualitativa de fresas (*Fragaria x ananassa* Duch.) de cultivares mexicanos y estadounidenses. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14: 113-119.
- Mena-Violante, G. H and V. Olalde-Portugal.** 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae* 113: 103–106.
- Mia, M. A. B., Z. H. Shamsuddin and M. Mahmood.** 2010. Use of plant growth promoting bacteria in banana: a new insight for sustainable banana production. *International Journal of Agriculture and Biology* 12: 459–467.
- Rouphael, Y., D. Schwarz, A. Krumbein and G. Colla.**2010. Impact of grafting on product quality of fruit vegetables. *Scientia Horticulturae* 127: 172–179.
- Ruiz, J. M and L. Romero.** 1998. Commercial yield and quality of fruits of cucumber plants cultivated under greenhouse conditions: response to increases in nitrogen fertilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4171-4173.
- Shen, W., X. Lin, N. Gao, H. Zhang, R. Yin, W. Shi and Z. Duan.** 2008. Land use intensification affects soil microbial populations, functional diversity and related suppressiveness of cucumber *Fusarium* wilt in China's Yangtze River Delta. *Plant Soil* 306:117–127.
- Shen, W., X. Lin, W. Shi, J. Min, N. Gao, H. Zhang, R. Yin and X. He.** 2010. Higher rates of nitrogen fertilization decrease soil enzyme activities, microbial functional diversity and nitrification capacity in a Chinese polytunnel greenhouse vegetable land. *Plant Soil* 337:137–150.
- Terraza, S. P., G. A. Baca-Castillo, J. L. Tirado-Torres, M. Villarreal-Romero, P. Sánchez-Peña y S. Hernández-Verdugo.** 2009. Calidad del fruto, composición y distribución de elementos minerales en pepino en respuesta a silicio y al potencial osmótico de la solución nutritiva. *Terra* 123-131.
- Zabihi, H. R., G. R. Savaghebi, K. Khavazi, A. Ganjali and M. Miransari.** 2011. *Pseudomonas* bacteria and phosphorous fertilization, affecting wheat (*Triticum aestivum* L.) yield and P uptake under greenhouse and field conditions. *Acta Physiology Plant* 33:145–152.

CAPÍTULO 7

CAPACIDAD ANTIBIÓTICA DE CUATRO CEPAS DE RIZOBACTERIAS HACIA HONGOS FITOPATÓGENOS

7.1. RESUMEN

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) tienen la capacidad de suprimir patógenos a través de la secreción de metabolitos secundarios, lo cual puede ser una alternativa al uso de agroquímicos que dañan al ambiente. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antagonista de cuatro cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento contra *Fusarium oxysporum* y *Alternaria* sp. en pruebas de cultivo en condiciones *in vitro*. Se establecieron cultivos duales en los que se inocularon los hongos mencionados en agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron por 48 h a 28°C, posteriormente se inocularon las cepas *Pseudomonas tolaasii* (A46), *P. tolaasii* (P61), *Microbacterium paraoxydans* (P21) y *Bacillus pumilus* (R44). Se determinó el porcentaje de inhibición del hongo. De las cuatro cepas estudiadas solo dos tuvieron la capacidad de inhibir el micelio de ambos hongos. La cepa A46 inhibió en 36.5 % el crecimiento de *F. oxysporum*, y en 53.86 % de *Alternaria* sp., mientras que la cepa P61 inhibió hasta 55% el crecimiento de *Alternaria* sp. y 20 % el de *F. oxysporum*. Estas dos cepas tienen potencial para el control biológico de hongos patógenos en cultivos agrícolas, sin embargo, es necesario evaluar su efectividad en plantas enfermas.

Palabras clave: Antibiosis, rizobacterias, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp., control biológico

ANTIBIOTIC CAPACITY OF FOUR STRAINS OF RHIZOBACTERIA AGAINST PLANT PHATOGEN FUNGI

7.2. ABSTRACT

The plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are capable of suppressing plant pathogens through secretion of secondary metabolites, which can be an alternative to the use of pesticides which damage the environment. The objective of this study was to evaluate the antagonistic capacity of four PGPR strains against *Fusarium oxysporum* and *Alternaria* sp. The pathogen fungi were inoculated in the center of potato dextrose agar (PDA) plates and incubated for 48 h at 28 ° C, then *Pseudomonas tolaasii* (A46), *P. tolaasii* (P61), *Microbacterium paraoxydans* (P21) and *Bacillus pumilus* (R44) were inoculated in three sides of the plate by placing 50 µL of the bacterial inoculum at equidistant points close to fungus, and then percent of fungal inhibition was evaluated. Two strains (A46 and P61) were able to inhibit the mycelial growth of both fungi. The strain A46 inhibited fungal growth of *F. oxysporum* by 36.5%, and *Alternaria* sp by 53.86%., while strain P61 inhibited fungal growth of *F. oxysporum* by 20% and *Alternaria* sp. up to 55%. These two strains have potential for biological control of plant pathogens in agricultural crops, however, their effectiveness on infested plants should be evaluated.

Keywords: Antibiosis, rhizobacteria, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp., biological control

7.3. INTRODUCCIÓN

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal se caracterizan por colonizar rápidamente la rizósfera, y reprimir el crecimiento de patógenos (Maleki *et al.*, 2010; Yao y Wu, 2010), debido a la producción de metabolitos secundarios (Lugtenberg y Kamilova, 2009) como antibióticos, sideróforos o algunas enzimas (quitinasas y glucanasas) (Wei *et al.*, 1996; Schuhegger *et al.*, 2006;), o a través de la inducción de la resistencia sistémica de la planta (Harish *et al.*, 1998; Somers *et al.*, 2004). Varios factores bióticos y abióticos están involucrados en la producción de metabolitos secundarios como son la interacción con otros microorganismos, la diversidad genética del patógeno y la planta hospedera, la temperatura, la humedad y el pH del suelo, entre otros (Slininger *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2005). El control biológico de patógenos en plantas por medio del uso de bacterias antagonistas es una alternativa a la aplicación de productos químicos (Sid *et al.*, 2003; Tariq *et al.*, 2010) al suelo tales como metam sodio y carbofuran, ya que su uso excesivo conduce a la contaminación ambiental y a efectos tóxicos sobre la salud humana (Chen *et al.*, 2010), además de causar resistencia en el patógeno, teniendo una eficiencia a corto plazo (Nga *et al.*, 2010). Un ejemplo de enfermedades de origen fúngico, son aquellas que afectan al cultivo de pepino, el cual es muy susceptible al ataque por *Fusarium oxysporum* (Ye *et al.*, 2004), infectando a la planta a través de la raíz en todas sus etapas de crecimiento, causando marchitez y pérdidas en el rendimiento de hasta 100% (Rose *et al.*, 2003). Otro hongo patógeno que ataca a este cultivo es *Alternaria*, el cual causa lesiones necróticas a hojas y cotiledones (Weete, 1992).

El control biológico por medio de bacterias es una alternativa a la aplicación de agroquímicos (Ji *et al.*, 2010), ya que se ha demostrado que la utilización de cepas como *Pseudomonas fluorescens* disminuye hasta 52% la marchitez por *Fusarium* (Paredes-Escalante *et*

al., 2008), además diversas especies de *Bacillus* aisladas de la rizósfera han demostrado la capacidad para inhibir el crecimiento de hifas de *F. oxysporum* y suprimir el desarrollo de la marchitez (Landa *et al.*, 1997). El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antagónica de cuatro cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento contra *F. oxysporum* y *Alternaria* sp. en pruebas de cultivo dual en condiciones *in vitro*.

7.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Material microbiológico

Se utilizaron cuatro cepas de bacterias pertenecientes al cepario de Área de Microbiología de Suelos del Colegio de Posgraduados, Montecillo, México. Las cepas correspondieron a *Pseudomonas tolaasii* (A46), *P. tolaasii* (P61), *Bacillus pumilus* (R44), *Microbacterium paraoxydans* (P21). Las cepas bacterianas fueron crecidas individualmente en caldo nutritivo a 24°C por 48h hasta obtener una concentración 1×10^9 UFC mL⁻¹. Las cepas de los hongos fitopatógenos usados correspondieron a *Fusarium oxysporum* y *Alternaria* sp. las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fitopatología, del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California.

Ensayos *in vitro*

Para determinar la inhibición del micelio *in vitro*, la siembra de los hongos en el medio de cultivo se llevo a cabo usando la técnica de cultivos duales descrita por Landa *et al.* (1997). Esta técnica consistió en colocar un disco de agar de 4 mm con crecimiento activo del hongo fitopatógeno correspondiente, en el centro de una caja con agar papa dextrosa (PDA). Los cultivos fúngicos fueron incubados a 28°C por 48 h. Después de este periodo se colocaron tres gotas de 50 µL de inóculo de una cepa bacteriana en puntos equidistantes correspondientes al

hongo. Posteriormente, los cultivos fueron incubados a 28°C por siete días. El testigo se realizó siguiendo el mismo procedimiento pero sin inóculo bacteriano. El experimento se estableció en un diseño experimental completamente al azar, y cada tratamiento contó con tres repeticiones considerando una caja por repetición. El porcentaje de inhibición fue calculado con la siguiente ecuación (Landa *et al.*, 1997):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{R - r}{R} \times 100$$

Donde, r es el radio del hongo contrario a la colonia de la bacteria y R es el radio máximo del hongo sin la bacteria.

7.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las cuatro cepas estudiadas, solo dos presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento de los dos hongos (Cuadro 7.1). En el caso de *F. oxysporum*, las cepas A46 y P61 que corresponden a *Pseudomonas tolaasii* inhibieron el crecimiento fúngico hasta en 36 % en promedio, mientras que para *Alternaria* sp., estas mismas cepas inhibieron al hongo hasta en un 55 %, en promedio. Las dos cepas que tuvieron la capacidad de inhibir el micelio pertenecen al género *Pseudomonas*, rizobacterias que son muy conocidas por su capacidad de promover el crecimiento de plantas, así como de inhibir el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*, a través de la producción de sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles y competencia por nutrientes (Saikia *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2010).

Cuadro 7.1. Inhibición del crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* y *Alternaria* sp. *in vitro* causada por cuatro cepas de rizobacterias, después de siete días.

Cepa	Inhibición fúngica (%)	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria</i> sp
<i>Pseudomonas tolassi</i>	36.52 a	53.83 a
<i>Pseudomonas tolassi</i>	20.05 b	55.14 a
<i>Bacillus pumilus</i>	0 c	0 b
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	0 c	0 b

*Medias con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$). n= 3.

Los resultados sugieren que las rizobacterias posiblemente estén produciendo antibióticos que se difunden a través del agar, los cuales son los causantes de la inhibición del crecimiento del micelio de ambos hongos (Figuras 7.1 y 7.2). Landa et al. (1993) mencionan que algunas cepas de *Pseudomonas* producen metabolitos secundarios que se difunden en el agar causando inhibición de *Fusarium* sp.; así mismo como el medio PDA es rico en nutrientes la posible competencia por éstos debe ser excluida (Valencia-Cantero *et al.*, 2005) y por lo tanto, la antibiosis posiblemente es el mecanismo por el cual las cepas de rizobacterias inhiben la actividad fúngica (Jeun *et al.*, 2003; Idris *et al.*, 2007).

El uso de estas cepas en campo para controlar los hongos fitopatógenos posiblemente tenga un impacto positivo en las plantas ya que el daño que causa *F. oxyporum* al cultivo de pepino es de pérdidas de un 80 a 100% en el rendimiento (Saikia *et al.*, 2003). Así mismo como el hongo fue crecido antes que la cepa bacteriana y mostró un alto porcentaje de inhibición, puede ser que en campo la aplicación de inoculante a base de las cepas bacterianas en el suelo tenga un buen control sobre el hongo aun cuando ya se encuentre el patógeno establecido. Aun así, hay que considerar que para que un metabolito liberado por las rizobacterias proteja a las raíces de las

plantas de una infección fúngica, éste debe estar presente *in situ* en las concentraciones adecuadas y se debe considerar la interacción planta-microorganismos para obtener un mejor resultado en el control biológico (Valencia-Cantero *et al.*, 2005).

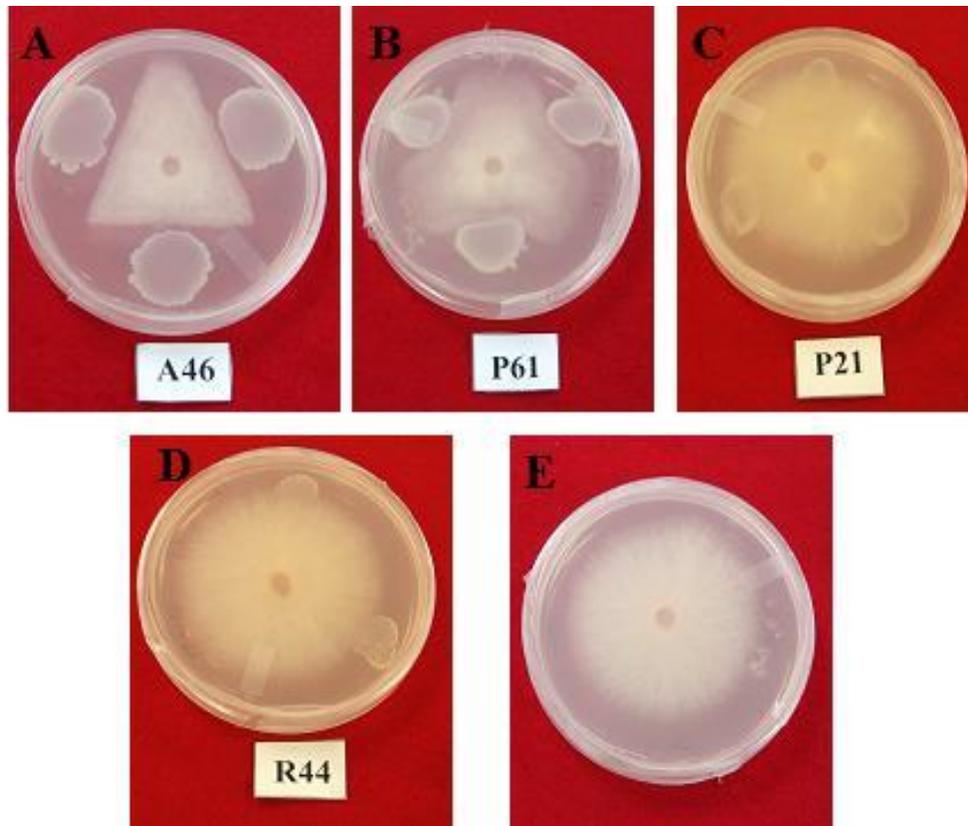


Figura 7.1. Ensayo *in vitro* de la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum*. A) *Pseudomonas tolaasii* (A46); B) *Pseudomonas tolaasii* (P61); C) *Microbacterium paraoxydans* (P21) y D) *Bacillus pumilus* (R44); y E) Testigo (crecimiento del hongo sin bacteria).

La inhibición del crecimiento de *Alternaria* sp. obtenida con las dos cepas de *Pseudomonas tolaasii* (A46 y P61) (Figura 7.2) sugiere que probablemente estas cepas aplicadas como inoculantes en el campo pueden disminuir los daños causados por el hongo y pueden ser

una alternativa de biocontrol. Sin embargo, en este caso el inóculo de bacteria se asperjaría en las hojas ya que el hongo ataca al follaje, se ha visto que de esta forma se puede inhibir hasta 53% la presencia de las lesiones causadas por este patógeno (Sid *et al.*, 2003).

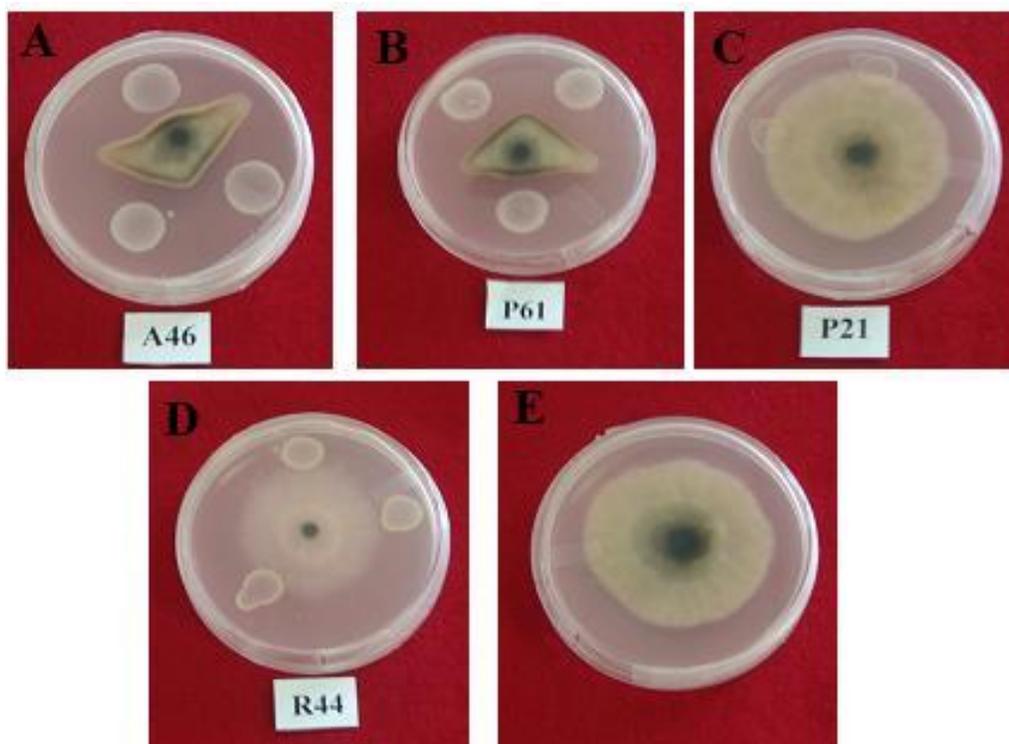


Figura 7.2. Ensayo *in vitro* de la inhibición de micelio de *Alternaria* sp. A) *Pseudomonas tolaasii* (A46); B) *Pseudomonas tolaasii* (P61); C) *Microbacterium paraoxydans* (P21) y D) *Bacillus pumilus* (R44); E) Testigo (crecimiento del hongo sin bacteria).

Por otra parte, se observó que las cepas R44 (*Bacillus pumilus*) y P21 (*Microbacterium paraoxydans*) no presentaron actividad antagonista, posiblemente porque no liberan metabolitos secundarios que inhiban el crecimiento de los hongos. Los datos obtenidos en este trabajo fueron positivos en cuanto la inhibición del crecimiento de los fitopatógenos por dos cepas (A46 y P61),

no obstante, los ensayos *in vitro* tienen ciertas limitaciones y muchas veces en condiciones *in vivo* los resultados no se expresan de la misma forma (Idris *et al.*, 2007), así que sería de mucha utilidad probar las cepas de bacterias en planta y bajo condiciones de campo.

7.6. CONCLUSIONES

Las cepas de *Pseudomonas tolaasii* (P61 y A46) tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* y *Alternaria* sp., por lo que probablemente estas cepas también presenten la misma capacidad inhibitoria sobre otros hongos patógenos. Es necesario realizar un estudio *in vivo* para corroborar los resultados y que permitan dar el siguiente paso en el uso potencial de las rizobacterias en invernaderos comerciales y en campo.

7.7. LITERATURA CITADA

- Chen, F., M. Wang, Y. Zheng, J. Luo, X. Yang and X. Wang.** 2010. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:675–684.
- Harish, S., K. Manjula and A.R. Podile.**1998. *Fusarium udum* is resistant to the mycolytic activity of a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1. *FEMS Microbiology Ecology* 25: 385-390.
- Idris, H. A., N. Labuschagne and L. Korsten.** 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control* 40: 97-106.
- Jeun, Y. C., K. S. Park, C. H. Kim, W. D. Fowler and J. W. Kloepper.** 2003. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological Control* 29: 34-42.
- Ji, X., G. Lu, Y. Gai, H. Gao, B. Lu, L. Kong and Z. Mu.** 2010. Colonization of *Morus alba* L. by the plant growth promoting and antagonistic bacterium *Burkholderia cepacia* strain Lu10-1. *BMC Microbiology* 10:1-12.
- Landa, B., A. Hervás, W. Bettiol and R. Jiménez-Díaz.** 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*. *Phytoparasitica* 25:305-318.
- Lugtenberg, B and F. Kamilova.** 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63:541–56.
- Maleki, M., S. Mostafae, L. Mokhtarnejad and M. Farzaneh.**2010. Characterization of *Pseudomonas fluorescens* strain CV6 isolated from cucumber rhizosphere in Varamin as a potential biocontrol agent. *Australian Journal of Crop Science* 4:676-683.
- Nga, N.T.T., N.T. Giau, N.T. Long, M. Lübeck, N. P. Shetty, E. de Neergaard, T.T.T. Thuy, P. V. Kim and H. J. L. Jorgensen.** 2010. Rhizobacterially induced protection of watermelon against *Didymella bryoniae*. *Journal of Applied Microbiology* 109: 567–582.
- Paredes-Escalante, Jesús ., J. Carrillo-Fasio, R. García-Estrada, R. Allende-Molar, J. Sañudo-Barajas y J. Valdez-Torres.** 2008. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27: 27-35.
- Roberts, D. P., S. M. Lohrke., S. L. F. Meyer., J. S. Buyer., J. H. Bowers., C.J. Baker., W. Lie., J. T. de Souza., J. A. Lewis and S. Chung.** 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Protection* 24: 141–155.
- Rose, S. M. Parker and Z. K. Punja.** 2003. Efficacy of biological and chemical treatments for control of *Fusarium* root and stem rot on greenhouse cucumber. *Plant disease* 87:1462-1470.
- Saikia, R., T. Singh., R. Jumar., J. Srivastava, A. Srivastava, K. Singh and D. Arora.** 2003. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* in chickpea. *Microbiological Research* 158:203-213

- Schuhegger**, R., A. Ihring, S. Gantner, G. Bahnweg, C. Knappe, G. Vogg, P. Hutzler, M. Schmid, F. Van Breusegem, L. Eberl, A. Hartmann and C. Langebartels. 2006. Induction of systemic resistance in tomato by *N*-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell and Environment* 29: 909–918.
- Sid**, A., M. Ezziyyani, C. Egea-Gilabert and M.E. Candela. 2003. Selecting bacterial strains for use in the biocontrol of diseases caused by *Phytophthora capsici* and *Alternaria alternata* in sweet pepper plants. *Biologia Plantarum* 47: 569-574.
- Slininger**, P.J., K. D. Burkhead, D. A. Schisler and R. J. Bothast. 2000. Isolation, identification, and accumulation of 2-acetamidophenol in liquid cultures of the wheat take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54:376-381.
- Somers**, E., J. Vanderleyden and M. Srinivasan. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology* 30:205-239.
- Tariq**, M., S. Yasmin and F. Y. Afees. 2010. Biological control of potato black scurf by rhizosphere associated bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 439-451.
- Valencia-Cantero**, E., J. Villegas-Moreno, J. M. Sánchez-Yáñez, J. J. Peña-Cabriales y R. Farías-Rodríguez. 2005. Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *TERRA* 23: 81-88.
- Weete**, J. D. 1992. Induced systemic resistance to *Alternaria cassiae* in sicklepod. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40: 437-445.
- Wei**, G., J. Kloepeper and S. Tuzun. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *The American Phytopathological Society* 86:221-224.
- Ye**, S. F., J. Q. Yu, Y. H. Peng, J. H. Zheng and L. Y. Zou. 2004. Incidence of *Fusarium* wilt in *Cucumis sativus* L. is promoted by cinnamic acid, an autotoxin in root exudates. *Plant and Soil* 263:143-150.
- Yao**, H and F. Wu. 2010. Soil microbial community structure in cucumber rhizosphere of different resistance cultivars to fusarium wilt. *FEMS Microbiology Ecology* 72: 456–463.

CAPÍTULO 8

ANÁLISIS ECONÓMICO-FINANCIERO COMPARATIVO DE LA PRODUCCIÓN DE PEPINO MEDIANTE EL USO DE BIOFERTILIZANTE Y FERTILIZACIÓN MINERAL

8.1. RESUMEN

El cultivo del pepino (*Cucumis sativus* L.) es muy importante a nivel mundial debido a su elevado índice de consumo, pues sirve de alimento tanto en fresco como industrializado. En México el pepino se exporta a Estados Unidos y para su producción se requiere de altas dosis de fertilizante mineral. Lo anterior conduce a la búsqueda de alternativas que disminuyan el uso de fertilizantes, debido a que estos en exceso causan daños en el ambiente. Una alternativa para el aprovechamiento del fertilizante mineral es el uso de inoculantes microbianos. El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis económico-financiero de la producción de pepino, bajo condiciones de invernadero basado en la fertilización mineral y en la aplicación de biofertilizantes. Para realizar este análisis se estableció un diseño experimental de bloques al azar con arreglo factorial 2X3, donde los factores fueron: inoculación (con cepa y sin cepa) y fertilización (testigo, 50% y 100%), resultando un total de seis tratamientos, y cada uno con tres repeticiones; los datos fueron ajustados a un área de 1,000 m², y los costos fueron los representativos para el Valle de Mexicali. Los resultados muestran que para el Valle de Mexicali se necesita una inversión inicial de \$172.57 por m², los costos variables fueron de \$28.16 por m² y un ingreso bruto de \$88.02 por m². De acuerdo a la relación costo beneficio el tratamiento más rentable fue el de la inoculación más el 100% de fertilizante con un valor de \$ 1.7, mientras el menos rentable fue el tratamiento sin la inoculación y sin fertilizante con un valor negativo de \$-0.05.

Palabras clave: *Cucumis sativus*, dosis de fertilizante, relación costo/beneficio

ECONOMIC AND FINANCIAL ANALYSIS OF CUCUMBER PRODUCTION WITH MINERAL FERTILIZATION AND BIOFERTILIZER

8.2. ABSTRACT

Cucumber (*Cucumis sativus* L.) is very important horticultural crop at worldwide level due to its high consumption rate as both fresh and industrialized food. In Mexico, cucumber is exported to United States and its production requires high doses of mineral fertilizer. The search for options that reduce the use of high fertilization rates is essential since excess of fertilizers causes damage to the environment. An alternative to reduce the excessive use of mineral fertilizer is using microbial inoculants. The aim of this study was to carry out an economic and financial analysis of greenhouse cucumber based on mineral fertilization and application of biofertilizers. An experiment was established using a randomized block experimental design in a 2x3 factorial arrangement, where factors were: inoculation (with strain and without strain) and fertilization (control, 50% and 100% of full rate), resulting in six treatments with three replicates each one; the data obtained were adjusted to an area of 1000 m², and costs were representative for the Mexicali Valley. These results show that it is required an initial investment of \$ 172.57 per m²; variable costs were \$ 28.16 per m² and a gross income \$ 88.02 per m². According to the cost-benefit ratio more benefit can be obtained with treatment of inoculation plus 100% of fertilizer with a value of \$ 1.7, while the less profitable treatment was the one without inoculation and without fertilizer with a negative value of \$ -0.05 .

Keywords: *Cucumis sativus*, dose of fertilizer, cost / benefit ratio

8.3. INTRODUCCIÓN

La agricultura convencional intensiva ha causado una considerable contaminación (Miaet *al.*, 2010), dañando en muchas ocasiones la capa de ozono, a causa del uso de plaguicidas como el bromuro de metilo (Engindeniz y Engindeniz, 2006), además de un deterioro en la calidad del suelo y agua, siendo sistemas claramente insostenibles (Kanget *al.*, 2010). Una alternativa a este problema es la producción bajo un sistema de agricultura sustentable, ya que se basa en mejorar el suelo a través del reciclaje de nutrientes y los atributos físicos del suelo (Eifediyi y Remison, 2010) y en el ahorro de energía, agua y nutrientes (Engindeniz y Gül, 2009), y por lo tanto en la búsqueda de energías renovables que a su vez reducen costos en los fertilizantes (Eifediyi y Remison, 2010).

El uso de inoculantes biológicos (biofertilizantes) preparadas con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV), contribuyen a mejorar el suelo incorporando nutrientes (Villanueva, 2006), ya que fijar hasta un 65% de nitrógeno en cultivos agrícolas (Olubukola, 2010), además de competir con microorganismos causantes de enfermedades en las plantas (Dastageret *al.*, 2011). La justificación de la aplicación de RPCV, es necesario corroborarla con un análisis financiero, debido a que permite identificar las fortalezas y debilidades de los resultados técnicos de la producción bajo esta práctica agronómica (Rezendeet *al.*, 2011). Así mismo, el análisis permite la administración de los recursos disponibles de manera más eficiente, favoreciendo su maximización en el ingreso y la minimización de costos (Russo y Taylor, 2006).

La producción de hortalizas en sistemas intensivos es una actividad altamente demandantes de fertilizantes químicos (Avendaño y Schwentesius, 2004) como es el caso del Valle de Mexicali, Baja California. El pepino es una hortaliza que se produce en invernadero en

un tipo de climas cálidos sus temperaturas óptimas de crecimiento son entre 24 y 29 °C (Soleimani *et al.*, 2009), y es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial (Eifediyi y Remison, 2010). En México es uno de los cultivos más rentables con un valor promedio de la producción de 1331.6 millones de pesos (Financiera rural, 2010). Este cultivo necesita una alta cantidad de energía para su producción, su transformación y su distribución, debido a su alta demanda en fertilizantes (Mohammadi y Omid, 2010).

El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis económico-financiero de la producción de pepino bajo condiciones de invernadero basado en el uso de fertilización mineral y la aplicación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

8.4. MATERIAL Y MÉTODOS

Elaboración de los inoculantes bacterianos

Se utilizaron las cepas *Pseudomonas tolaasii* (A46), *P. tolaasii* (P61) y *Bacillus pumilus* (R44), obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillos. Para la elaboración del inóculo líquido, las cepas fueron crecidas por separado en caldo nutritivo a 24°C por 72h hasta obtener una concentración 1×10^9 UFC mL⁻¹. El inóculo sólido se preparó creciendo las cepas por separado en caldo nutritivo a 24°C por 72h hasta obtener una concentración 1×10^9 UFC mL⁻¹, y después cada inóculo bacteriano fue mezclado con turba estéril y neutra en proporción 1:3 v/p. Los inoculantes se obtuvieron después de un proceso de maduración de dos semanas. La carga bacteriana final en el soporte fue en promedio de 5×10^9 UFCg¹.

Condiciones de invernadero y material vegetal

El experimento se llevo a cabo en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, en el Valle de Mexicali. Las semillas de pepino (*Cucumissativus* cv. Alcazar) fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 2 % por 30 s, y posteriormente lavadas con agua destilada estéril.

Los almácigos de 128 cavidades se llenaron parcialmente con peat moss (marca Premier®) esterilizado; y en cada cavidad se colocó una semilla de pepino a la cual se aplicaron dos mililitros de la correspondiente suspensión bacteriana, mientras que al tratamiento testigo solo se aplicaron dos mililitros de caldo nutritivo por cavidad.

Las plántulas fueron trasplantadas en el invernadero a los 25 días después de la siembra, realizando en este momento una segunda aplicación de bacterias a partir del inoculante descrito, en proporción de 1kg por hectárea.

El experimento se estableció en un diseño experimental de parcelas divididas, donde la parcela grande se refiere a las dosis de fertilizante (testigo, 50% y 100% de dosis de fertilización) (Cuadro 8.1), y la parcela pequeña correspondió a la inoculación con las cepas bacterianas (tres cepas aplicadas por separado y el testigo), cuya combinación da un total de 12 tratamientos, con tres repeticiones cada uno.

Cuadro 8.1. Dosis de fertilizante utilizando durante el experimento

N-P-K	Dosis de Fertilizante 100 % (g)			Dosis de Fertilizante 50 % (g)		
	Etapa 1 15 dds	Etapa 2 30 dds	Etapa 3 50 dds	Etapa 1 15 dds	Etapa 2 30 dds	Etapa 3 50 dds
11-00-00-16Mg	9.2	8.3	8.3	4.6	4.15	4.15
15.5-00-00-19 CaCO ₃	77.0	108.7	63.15	38.5	54.35	31.575
13-2-44	72.2	60.6	60.6	36.1	30.3	30.3
12-61-00	30.4	13.3	23.06	15.2	6.65	11.53

ddt: días después de la siembra

* La dosis empleada se diluía en 200 L de agua.

El experimento se realizó en condiciones bajo invernadero bajo un sistema de riego por goteo, donde la dosis de fertilizante aplicada en el riego fue establecida de acuerdo a los análisis de suelo (Cuadro 8.2) y a la etapa fenológica del cultivo. Las plantas fueron conducidas verticalmente a un solo tallo, y para ello se podaron los brotes laterales. La parcela pequeña contenía un total de 48 plantas, con un tamaño de 8 X 3m, la distancia entre plantas fue de 0.50 m, y la distancia entre surcos de 0.75 m. El experimento se mantuvo por un periodo de 75 días.

A partir del día 50 después del trasplante, se llevo a cabo la cosecha de frutos, realizando cortes cada tercer día. El último corte se realizó a los 70 días después del trasplante, y las variables evaluadas fueron rendimiento por planta (kg) y el rendimiento por m² (kg m⁻²).

Cuadro 8.2. Análisis químico de suelo

Variable	Valor
pH (1:2) H ₂ O	8
Conductividad eléctrica	3 dsm ⁻¹
Materia orgánica	6 %
Nitrógeno	0.30 %
Fósforo	284 mg Kg ⁻¹
Potasio	11 cmolesKg ⁻¹

Análisis Económico-Financiero

El costo de los materiales para la producción del invernadero fueron clasificados como: costos de inversión inicial, costos variables y costos fijos. Los costos variables fueron todas las entradas que se relacionan directamente con la producción del cultivo de pepino como lo son el capital humano, los fertilizantes, el biofertilizante, plántulas, electricidad etc. Los costos fijos incluyeron, el costo total de la inversión y la rentabilidad del uso de tierra.

Se utilizó una tasa del 12%¹ para los costos de la inversión total y costos variables, y se dividió en dos debido a que en este tipo de cultivos se pueden obtener dos producciones al año. Los costos de administración se estimaron en un 3% del total de los costos de producción, de acuerdo a Engindeniz y Gül (2009). Para determinar la factibilidad del proyecto se calculó el ingreso total neto. Los datos fueron analizados para un invernadero de 1000 m² para su representación en el mercado.

¹Basado en el costo de oportunidad del capital al momento de la puesta en marcha del experimento

Análisis estadístico

Los datos de producción fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey con una significancia de $\alpha=0.05$ utilizando el paquete estadístico SYSTAD 10.2 (Systat Software Inc., California, USA).

8.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tratamientos con una dosis baja de fertilizante (0 % y 50 %) más los inoculantes microbianos fueron los que obtuvieron los mayores rendimientos en comparación con sus respectivos testigos (Cuadro 8.3). Así mismo, se encontró que los tratamientos con una dosis alta de fertilizante en combinación con el inoculante no ejerció un efecto en rendimiento (Cuadro 8.3).

De acuerdo con Castro-Sowinski et al. (2007) la inoculación con microorganismos no ejerce ningún efecto sobre la planta, lo cual lo atribuyen a que en una alta dosis de fertilización mineral la rizobacteria pudo estar siendo inhibida (Adesemoye et al., 2009). No obstante el rendimiento dependerá de las condiciones físico-químicas del suelo y del cultivar que se utilice. Por ejemplo, en el Valle de San Joaquín, Estados Unidos, tienen rendimientos de pepino de 32.95 kg m² (Engindeniz y Gül, 2009), valores muy parecidos a los que se encontraron en este trabajo.

Para llevar a cabo el análisis económico-financiero se utilizó como base la producción de pepino basado en la fertilización mineral. En el cuadro 8.4 se muestran los costos de construcción de un invernadero, y donde los costos de inversión inicial fueron de \$172, 570.00 para un invernadero de 1,000 m² (\$172.57 m²); la estructura galvanizada, la base para puertas y los costos de instalación representan el 53.03% del total de los costos de inversión (Cuadro 8.4).

Cuadro 8.3. Efecto de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal y fertilización en el rendimiento de frutos de pepino (*Cucumissativus* cv. Alcazar).

Inoculación bacteriana	Dosis de fertilización (%)	Rendimiento (kg)		
		Planta	m ²	1,000 m ²
<i>Pseudomonas tolaasii</i> (A46)	0	4.6g	11.6g	11,623.1 g
	50	8.6c	21.5c	21,461.5 c
	100	12.9a	32.3a	32,288.5 a
<i>Pseudomonas tolaasii</i> (P61)	0	5.4f	13.5f	13,546.2 f
	50	8.4c	21.1c	21,100.0 c
	100	11.5b	28.8b	28,761.5 b
<i>Bacillus pumilus</i> (R44)	0	4.3h	10.7h	10,732.7 h
	50	8.3d	20.7d	20,713.5 d
	100	10.9b	27.3b	27,323.1 b
sin inoculación	0	3.2i	8.1 i	8,067.3 i
	50	7.6e	18.9e	18,884.6 e
	100	12.6b	31.4b	31,436.5 b

Valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes $\alpha=0.05$, n=3.

La inversión anual fue calculada como \$14,660.67; así mismo, la inversión anual se dividió en dos ya que del cultivo en la región se obtienen dos cosechas al año; por lo tanto, los costos de la inversión anual fueron calculados en \$7,330.33 para la producción de cada ciclo de pepino.

Aunque los costos de producción en invernadero son más altos en comparación a la producción a cielo abierto, las ventajas de utilizar el invernadero se basa en propiciar un ambiente

poco restrictivo para el crecimiento y el desarrollo del pepino comparado con lo que ocurre a cielo abierto (Cereceres *et al.*, 2009).

Cuadro 8.4. Costos de inversión inicial para la construcción de un invernadero (1000 m²)

Material	Costo inicial (\$ M.N.)	% de costos	Años de vida útil	Costo anual (\$ M.N.)	% de costos
Estructura galvanizada	95,000	55.05	20	4,750	32.40
Base para puertas	10,500	6.08	20	525	3.58
Cubierta de polietileno	13,000	7.53	5	2,600	17.73
Conexión de agua	7,500	4.35	10	750	5.12
contenedores de agua	2,200	1.27	10	220	1.50
Medidor de pH y conductividad eléctrica	2,250	1.30	10	225	1.53
Bomba de agua	2,500	1.45	15	167	1.14
Ensamblaje e instalación	25,000	14.49	10	2,500	17.05
Material de tutoreo	9,350	5.42	5	1,870	12.76
Material de invernadero	5,270	3.05	5	1,054	7.19
Total	172,570	100.00		14,660.67	100.00
Total (m²)	172.57			14.66	

En el cuadro 8.5 se muestran los costos variables asociados con la producción de pepino en el Valle de Mexicali. El total de estos costos fue de \$ 28,156 (\$ 28.16 m⁻²), de los cuales, los costos de mano de obra representan el 42.62% del total y los costos de embalaje representan el 17.75%.

Cuadro 8.5. Costos variables para la producción de pepino en una superficie de 1000 m²

Operación	Precio (\$ M.N.)	Consumo total (\$ M.N.)	% de Costos
11-00-11-16 Mg	1.02	1.93	0.007
15.5-00-00-19 CaCO	0.74	12.62	0.045
13-02-44	1.45	19.28	0.068
12-61-00	1.8	8.17	0.029
Quimio azul	5.25	18.45	0.066
Semillas	1331	3327.5	11.818
Semilleros	80	800	2.841
Peat-moss (marca Premier®)	250	625	2.220
Fungicidas e insecticidas	1685	842.5	2.992
Arena	350	350	1.243
Composta	650	650	2.309
Embalaje	5000	5,000	17.759
Mano de Obra	200	12,000	42.621
Agua (m ³)	3.00	2,000	7.103
Energía eléctrica		2,500.00	8.879
Total de costos variables		28,155.45	100
Total (m²)		28.16	

Los costos totales de producción de pepino fueron determinados como \$81,596 (\$ 81.60 m²), los costos variables representaron el 34.51% del total de los costos, mientras que el 65.49% está representado por los costos fijos (Cuadro 8.6).

El precio del pepino fue tomado del reporte diario de la Secretaria de Agricultura Ganadería y Pesca (SAGARPA, 2012) de la página de internet en InfoAserca (Información económica y comercial para el sector agropecuario). El precio cotizado para el 2012 fue de \$2.80 M.N, de acuerdo a la literatura se sugirió el precio de \$5.00 pesos en M.N. ya que estos productos en el mercado son considerados como productos orgánicos haciendo que su precio sea mayor (Gómez et al., 2002)

Cuadro 8.6. Costos totales de la producción de pepino en una superficie de 1000 m²

Variable	Costo Total (\$)	% de costos
Costos variables (I)	28,155	34.51
Intereses de los costos totales de la inversión inicial	10,354	12.69
Costo anual de la inversión inicial	7,330	8.98
Costos fijos (II)	33,512	41.07
Interés total de los costos variables	845	1.04
Costos de Administración	1,400	1.72
Renta de la tierra	53,441	65.49
Total	81,596	100
Total (I+II)	81,596	100

El ingreso bruto obtenido calculado para 1000 m² fue de \$88,022.30 (\$ 88.02 m⁻²) (Cuadro 8.7), el costo total de la producción de pepino fue de \$ 81,596; por lo tanto, el ingreso total neto fue de \$6,425 (6.4 m²). Los costos variables y fijos representan respectivamente, el 31.99 y 60.71% de los ingresos brutos, y el resto (7.30 %) corresponde al ingreso total neto (Cuadros 8.7 y 8.8).

Cuadro 8.7. Ingresos brutos obtenidos de pepino

Rendimiento (Kg)	Rango de Precios \$ kg ⁻¹	Total de ingreso bruto (\$ M.N)	Total de ingreso bruto (m ²)
31436.54	2.8	88022.31	88.02

Cuadro 8.8. Ingreso neto obtenido para producción de pepino (1000 m²)

	Total (\$)	% de ingresos
Total de ingreso bruto (I)	88,022	100
Costos variables	28,156	31.99
Costos fijos	53,441	60.71
Total de costos (II)	81,597	92.70
Ingreso total neto (I-II)	6,425	7.30
Ingreso neto (m ²)	6.425	

En el cuadro 8.9 se observa la comparación de los aspectos económicos de la producción de pepino basado en la fertilización mineral y en el biofertilizante bajo tres dosis de fertilización, donde los datos fueron calculados para un área de 1000 m². Para el Valle de Mexicali se puede obtener una producción estimada de aproximadamente 31,437 kg basándose solo en la fertilización mineral (100%); pero además, se observó que al incorporar el inoculante microbiano se puede lograr hasta 32,288.5 kg, es decir, una diferencia de 851.5 kg más por efecto del biofertilizante. Por otra parte, al disminuir la dosis de fertilización mineral, los rendimientos

disminuyen; no obstante, la inoculación del microorganismo aumenta la producción de pepino, aunque no supera la producción de pepino al 100% de fertilizante mineral, además el ingreso actual neto, calculado para la producción obtenida con la sola aplicación de 100% de fertilizante mineral fue de \$6, 425 (\$6.43 m²), mientras que en el tratamiento donde se combinó fertilizante mineral al 100% con el biofertilizante este valor fue de \$8,605 (\$8.60 m²), indicando que la aplicación del fertilizante más el inoculante representa una alternativa para aumentar la producción y el ingreso actual neto. Así mismo, al disminuir la dosis de fertilizante, el ingreso total neto disminuye, dando valores negativos en los otros cuatro tratamientos, indicando que este tipo de alternativas no son viables desde el punto de vista económico-financiero.

El tratamiento que se puede denominar orgánico (en el que sólo se aplicó biofertilizante) fue el que obtuvo el valor menos negativo, debido a que su precio en el mercado es más elevado. Es muy importante considerar este tipo de productos ya que se ha elevado el interés por consumirlos, debido a la demanda que se tiene en los mercados de la Unión Europea, Estados Unidos, Japón y Canadá (Quezada *et al.*, 2002). México apenas está iniciando con la producción de cultivos orgánicos por lo cual es un mercado muy importante si se sigue con la tendencia de producir pepino solo con biofertilizantes.

Cuadro 8.9. Comparación económica de la producción de pepino con dos sistemas basados con fertilización (biofertilizante y fertilizante mineral) a tres dosis de fertilizante (1000 m²)

Variable	100% de fertilizante	50% de fertilizante	0% de fertilizante	Biofertilizante + 100% Fertilizante	Biofertilizante + 50% Fertilizante	Biofertilizante + 0% Fertilizante
Fertilizante o Biofertilizante	61	31	0	261	231	200
Insumos (*)	6595	6595	6595	6595	6595	6595
Costos Variables (I)						
Electricidad y agua	4500	4500	4500	4500	4500	4500
Embalaje	5000	5000	5000	5000	5000	5000
Mano de Obra	12000	12000	12000	12000	12000	12000
Total	28156	28126	28095	28356	28326	28295
Intereses de los costos totales de la inversión inicial (12%)	10354	10354	10354	10354	10354	10354
costos anuales de la inversión inicial	7330	7330	7330	7330	7330	7330
Costos Fijos (II)						
Intereses total de los costos variables	33512	33512	33512	33512	33512	33512
Costos de Administración (3%)	845	844	843	851	850	849
Renta de la tierra	1400	1400	1400	1400	1400	1400
Total	53441	53440	53439	53447	53446	53445
Total de Costos (I+II)	81597	81566	81534	81803	81772	81740
Total de producción (kg)	31436.54	18884.62	8067.31	32288.5	21461.5	11623.1
Precio del pepino (\$/kg)	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	5
Total de ingreso bruto (\$)	88022	52876.9	22588.4	90407.7	60092.3	58115.4
Ingreso total neto (\$)	6425	-28.6885	-58.9	8605	-21680	-23.6
Ingreso neto (\$ m ²)	6.425	-0.0286885	-0.058	8.605	-21.68	-0.023

*Insumos se refiere a semillas, semilleros, compostas etc.

Biofertilizante se refiere al tratamiento donde se inoculó la cepa *Pseudomonas tolaasii* (A46)

La evaluación de un proyecto a cinco años sirve para verificar el comportamiento económico, ya que determina los beneficios y costos financieros y económicos; en el cuadro 8.10 se presenta la tasa interna de rentabilidad (TIR); en éste se observa que el tratamiento donde se utilizó biofertilizante + 100% de fertilizante, mostró una rentabilidad del 36%, mientras que el tratamiento donde no se aplicó biofertilizante y fertilizante mineral mostró inversión negativa, indicando que los flujos generados no pueden hacer frente ni siquiera al costo del capital (al pago de los intereses). El valor actual neto (VAN) mostró que el tratamiento de biofertilizante más 100% fertilizante obtuvo el valor más alto, mientras que los tratamientos donde se utilizó 50% de fertilizante y 0% de fertilizante sin biofertilizante mostraron valores negativos indicando que estos proyectos no son viables, ya que solo se pueden aceptar proyectos con valores superiores a cero. En la relación costo-beneficio, los tratamientos 100% de fertilizante sin bacteria y los tres tratamientos donde se utilizó el biofertilizante mostraron una relación mayor a uno, indicando que se pueden aceptar estos proyectos (Cuadro 8.10). En la actualidad se busca incrementar los rendimientos y disminuir los costos en los sistemas agrícolas (Mohammadi y Omid, 2010).

Cuadro 8.10 Evaluación económica de los proyectos.

Indicador	100% de fertilizante	50% de fertilizante	0% de fertilizante	Biofertilizante + 100% Fertilizante	Biofertilizante + 50% Fertilizante	Biofertilizante + 0% Fertilizante
Tasa Interna de Retorno (TIR)	32%	8%	-40%	36%	14%	12%
Valor Actual Neto (VAN)	\$123,771	-\$21,463	-\$222,274	\$147,350	\$12,753	\$3,817
Relación Costo/Beneficio	\$1.59	\$0.9	\$-0.05	\$1.7	\$1.06	\$1.02

Biofertilizante se refiere al tratamiento donde se inoculó la cepa *Pseudomonastolaasii*

Fuente: elaborado con información personal

8.6. CONCLUSIONES

La aplicación de inoculantes microbianos favoreció el incremento en la producción de pepino, lo que indica que los biofertilizantes son una alternativa para hacer un uso más eficiente de fertilizantes químicos en el Valle de Mexicali. Sin embargo la sola utilización de microorganismos no es suficiente para obtener los rendimientos alcanzados en comparación de la fertilización química, por lo que se deben realizar más estudios del comportamiento de los biofertilizantes y la fertilización mineral.

8.7. LITERATURA CITADA

- Adesemoye, A. O., H. A. Torbert and J. W. Kloepper.** 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology* 58:921–929.
- Avendaño, R. y B. Schwentesius.** 2004. Factores de competitividad en la producción y exportación de hortalizas: en caso del Valle de Mexicali, B.C., México. *Revista Latinoamericana de Economía* 36: 165-192.
- 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* 1:11.
- Dastager, S. G., C. K. Deepa, A. Pandey.** 2011. Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.). *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 27:259–265.
- Eifediyi, E. K and S. U. Remison.** 2010. Growth and Yield of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) as Influenced by Farmyard Manure and Inorganic Fertilizer. *Report and Opinion* 2:1-6.
- Engindeniz, S and A. Gül.** 2009. Economic analysis of soilless and soil-based greenhouse cucumber production in Turkey. *Scientia Agricola* 66: 606-614.
- Engindeniz, S and D. Yücel Engindeniz.** 2006. Economic analysis of pesticide use on greenhouse cucumber growing: A case study for Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection* 113: 193–198.
- Gómez, M. L. Gómez y Schwentesius.** 2002. Dinámica del mercado internacional de productos orgánicos y las perspectivas para México. *Movimiento económico* 120: 54-68.
- Kang, S., M. Hamayun, G. Joo, A. Khan, Y. Kim, S. Kim, H. Jeong and I. Lee.** 2010. Effect of *Burkholderia* sp. KCTC11096B on some physiochemical attributes of cucumber. *European Journal of Soil Biology* 46: 264-268.
- Mia, M. A. B., Z. H. Shamsuddin and M. Mahmood.** 2010. Use of plant growth promoting bacteria in banana: a new insight for sustainable banana production. *International Journal of Agriculture & Biology* 12: 459–467.
- Mohammadi, A and M. Omid.** 2010. Economical analysis and relation between energy inputs and yield of greenhouse cucumber production in Iran. *Applied Energy* 87: 191–196.
- Olubukola, O. B.** 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters* 32:1559–1570.
- Ortiz, C. J., F. Sánchez, M. C. Mendoza y A. Torres.** 2009. Características de plantas de pepino crecidas en invernadero e hidroponía en altas densidades de población. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32: 289 – 294.
- Quezada, Q. F., R. Romo y E. Ortega.** 2002. Evaluación económica y de mercados para la producción de hortalizas orgánicas en la provincia de Ñuble, Chile. *Theoria* 11: 59-67.
- Russo, V. M and M. Taylor.** 2006. Soil amendments in transition to organic vegetable production with comparison to conventional methods: yields economics. *HortScience* 41: 1576-1583.
- Santillana, V. N.** 2006. Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecología aplicada* 5: 87-91.
- Soleimani, A., A. Ahmadikhah and S. Soleimani.** 2009. Performance of different greenhouse cucumber cultivars (*Cucumis sativus* L.) in southern Iran. *African Journal of Biotechnology* 8: 4077-4083.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES GENERALES

1. La inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal incrementó el desarrollo radical de plántulas de pepino, dando como resultado un aumento en la concentración de N, P y K.
2. La inoculación de rizobacterias mejoró la calidad de plántulas en cuanto a tamaño y nutrición, características que pueden conducir a mayor sobrevivencia y adaptación al momento del trasplante en el Valle de Mexicali.
3. La aplicación de este tipo de rizobacterias en plantas de pepino bajo un sistema de fertirriego en invernadero incrementó la altura de planta, área foliar y la concentración de nutrientes, particularmente en las dosis cero y media de fertilizantes.
4. La respuesta del rendimiento a la inoculación con rizobacterias disminuyó al aumentar la dosis de fertilizante y al 100% de la tasa de fertilización sólo la inoculación con la cepa A46 tuvo un ligero efecto en el rendimiento de frutos.
5. La inoculación con rizobacterias mejoró algunos atributos relacionados con la calidad del fruto, ya que ésta aumentó la concentración de sólidos solubles totales en los frutos e incrementó la concentración de ortofosfatos.
6. Las cepas de *Pseudomonas tolaasii* A46 y P61 inhibieron el crecimiento de los hongos patógenos *Fusarium oxysporum* y *Alternaria* sp en condiciones *in vitro*.
7. La inoculación con rizobacterias favorece la producción de pepino, lo que se ve reflejado en la relación beneficio costo, valor actual neto y la tasa interna de rentabilidad.
8. La sola utilización de rizobacterias no es suficiente para obtener rendimientos equivalentes a los alcanzados por la fertilización química. Por lo que se tienen que realizar más estudios enfocados al tema de fertilización mineral y su interacción con rizobacterias.