



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGIA

**INTERACCIÓN ENTRE BACTERIAS PROMOTORAS DE  
CRECIMIENTO Y HONGOS MICORRÍZICOS EN EL  
CRECIMIENTO DE CHILE POBLANO (*Capsicum annuum* L.)**

**APOLINAR GONZÁLEZ MANCILLA**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO**

**FEBRERO 2016**

La presente tesis titulada: “**Interacción entre Bacterias Promotoras de Crecimiento y Hongos micorrízicos en el crecimiento de Chile poblano (*Capsicum annuum* L.)**”, realizada por el alumno: “**Apolinar González Mancilla**”, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EDAFOLOGIA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



---

DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUÁREZ

ASESOR



---

DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESORA



---

DRA. MARÍA DEL PILAR RODRÍGUEZ GUZMÁN

ASESOR



---

DR. OSWALDO REY TABOADA GAYTÁN

ASESOR



---

DR. ANTONIO TRINIDAD SANTOS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero de 2016.

# INTERACCIÓN ENTRE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO Y HONGOS MICORRÍZICOS EN EL CRECIMIENTO DE CHILE POBLANO (*Capsicum annuum* L.)

Apolinar González Mancilla, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2016

## RESUMEN

En el presente trabajo se aislaron cepas de rizobacterias y consorcios de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la región de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México con el fin de estudiar su potencial para promover el crecimiento en chile poblano. Se colectaron muestras de suelo rizosférico y raíz de nueve campos de chile poblano para cuantificar poblaciones microbianas, determinar colonización micorrízica y obtener los consorcios de HMA. De las muestras colectadas, se aislaron cepas de rizobacterias para evaluar sus características promotoras de crecimiento (solubilización de fosfatos, producción de auxinas y fijación de nitrógeno). Las mejores cepas de rizobacterias se identificaron a nivel molecular y con ellas se estableció un experimento donde se evaluó la respuesta de plántulas de chile poblano a la inoculación. Un segundo experimento se estableció para evaluar el potencial de 9 consorcios de HMA para promover el crecimiento de chile poblano. Los consorcios se identificaron a nivel de género o especie por las características morfológicas de sus esporas. Tres cepas de rizobacterias y un consorcio de HMA se usaron para establecer un tercer experimento donde se estudió el efecto combinado de ambos, rizobacterias y HMA, en el crecimiento de chile poblano. Las poblaciones de bacterias (totales, solubilizadoras de fosfato, productoras de auxinas, fijadoras de nitrógeno), así como la colonización micorrízica y número de esporas de HMA variaron en los campos de chile poblano, lo que estuvo asociado en parte al nivel de fertilidad y las características del suelo. Se aislaron 216 cepas de rizobacterias, de estas cepas se obtuvieron 4 con alta capacidad para solubilizar fosfato (BSP), 4 fueron mejores en producción de auxinas (BPA) y 2 tuvieron capacidad de fijar nitrógeno (BFN). Las BSP pertenecieron a las especies *Serratia plymuthica* (CPPC1, CPPC3, CPPC4) y *S. marcescens* (CPPC2); las BPA correspondieron a *Agrobacterium vitis* (CPPC5), *Arthrobacter* sp. (CPPC6), *Bacillus simplex* (CPPC7) y *S. liquefaciens* (CPPC8) y las cepas BFN fueron *Stenotrophomonas maltophilia* (CPPC9) y *S. marcescens* (CPPC10). Los efectos de estas cepas en el crecimiento de las plántulas de chile poblano fueron estadísticamente significativos (Tukey  $p \leq 0.05$ ) y los mayores efectos se obtuvieron con las cepas CPPC5 y CPPC4 con incrementos en biomasa seca de 11 y 26 %, respectivamente. Los géneros de HMA predominantes en los nueve campos de chile poblano fueron *Funneliformis* y *Claroideoglossum*. Los consorcios de HMA tuvieron diferente efecto en el crecimiento, y aquellas plantas inoculadas con el consorcio proveniente del sitio dos (*Funneliformis* aff. *geosporum* + *Claroideoglossum* sp.) tuvieron la mayor biomasa y el más alto contenido de fósforo en el tejido vegetal. La combinación del mejor consorcio de HMA y *S. plymuthica* CPP4 promovió mayor altura en planta y mayor número de esporas de HMA; mientras que la combinación HMA y *Pseudomonas tolaasii* P61 tuvo el mayor efecto en las plantas, incrementando número de hojas, biomasa seca, área foliar y contenido de fósforo en tejido vegetal, y en raíz produjo mayor colonización por hifas, arbusculos y vesículas.

**Palabras clave:** Solubilización de fosfatos, producción de auxinas, contenido de fósforo, colonización micorrízica, rizobacterias promotoras de crecimiento.

# INTERACTION BETWEEN GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA AND MYCORRHIZAL FUNGI ON PLANT GROWTH OF POBLANO PEPPER (*Capsicum annuum* L.)

Apolinar González Mancilla, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2016

## ABSTRACT

In this work rhizobacteria strains and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) consortiums were isolated from Sierra Nevada region at the Puebla state, México in order to study their plant growth promoting potential in poblano pepper. Rhizospheric soil and root samples were collected in nine fields of poblano pepper to determine microbial populations, mycorrhizal fungi colonization and spore number, and to obtain mycorrhizal fungi consortiums. From the collected samples, rhizobacteria strains were isolated to evaluate their plant growth promoting characteristics (phosphate solubilization, auxin production and nitrogen fixation). The best rhizobacteria strains were identified at molecular level and with them an experiment was established to evaluate the poblano pepper seedling response to the rhizobacterial inoculation. A second experiment was carried out to study the potential of nine AMF consortiums for plant growth promoting in poblano pepper. The AMF were identified by their spore morphologic characteristics at species level. Three rhizobacteria strains and a AMF consortium were used to establish a third experiment where the effect of both rhizobacteria and AMF on chili pepper growth was studied. The bacterial populations (total bacteria, phosphate solubilizing bacteria, auxin producing bacteria and nitrogen fixing bacteria), mycorrhizal colonization and spore number of AMF were variable among the poblano pepper field sites, which partially were associated with the fertility and soil characteristics. Two hundred and sixteen rhizobacteria strains were isolated, from these, four strains had high ability for solubilizing phosphate (SPB), four were the best for indole production (APB) and two had capacity to fix nitrogen (NFB). The PSB belong to *Serratia plymuthica* species (strains CPPC1, CPPC3, CPPC4), the APB corresponded to *Agrobacterium vitis* (CPPC5), *Arthrobacter* sp. (CPPC6), *Bacillus simplex* (CPPC7) and *S. liquefaciens* (CPPC8). These strains affected positively (Tukey  $p \leq 0.05$ ) seedling growth and the higher effects were obtained with CPPC5 and CPPC4 strains which increased biomass in 11 and 26%, respectively. The predominant AMF on the nine field of poblano pepper were *Funneliformis* and *Claroideoglobus*. The AMF consortiums had different effects on plant growth and those plants inoculated with the consortium from the site two (*Funneliformis* aff. *geosporum* + *Claroideoglobus* sp.) had the highest biomass and phosphorous content. The inoculation of the best AMF consortium and *S. plymuthica* promoted greater plant height and higher number of spores; while the combination of the AMF consortium and the rhizobacterial strain *P. tolaasii* P61 had the best effect on plants increasing number of leaves, dry biomass, leaf area and phosphorus content in plant tissue, in roots this treatment increased mycorrhizal colonization including hyphae, vesicles and arbuscules.

**Keywords:** Solubilization of phosphates, production of auxin, phosphorus content, mycorrhizal colonization, plant growth promoting rhizobacteria.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por haberme dado la vida y por su gran bondad hacia mi persona.

A mis padres, Benito González Hernández<sup>†</sup> y Ma. Quiteria Mancillas Díaz, quienes me han apoyado material y espiritualmente, y sus sabios consejos aún siguen fructificando en mi vida profesional.

A mi esposa Patricia y mis hijos Yeray y Kerim, que son el regalo más hermoso que Dios me ha dado.

A mis hermanos Irma, Vale, Bersa, Rigo, Flory, Memo, Bella, Chefy y Huicho; con quienes compartí experiencias inolvidables.

A todos mis amigos y amigas del laboratorio de Microbiología de Suelos quienes me apoyaron y soportaron mi actitud durante mi estancia en la investigación.

A los Doctores Juan José, Ronald, Alejandro, Jesús y Julián, del Área de Microbiología de Suelos quienes me permitieron formar parte de un excelente grupo de investigación.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, Quien ha sido mi guía espiritual y la luz a seguir, de todo corazón GRACIAS.

Al CONACYT por el financiamiento otorgado para la culminación de este trabajo de investigación.

Al Colegio de Postgraduados Campus-Montecillo por permitir que forme parte de un excelente ambiente laboral y académico.

Al Dr. Juan José Almaraz Suárez, por todas las facilidades proporcionadas a mi persona para la culminación de este trabajo, por su apoyo otorgado desde la maestría y ahora como mi Consejero en el trabajo doctoral. Agradezco su amistad, su confianza, su dedicación y su paciencia durante el tiempo que duro esta etapa profesional.

Agradezco a los miembros de mi Comité de Tesis: al Dr. Ronal Ferrera Cerrato por su apoyo incondicional, consejos y valiosas aportaciones al trabajo; a la Dra. María del Pilar Rodríguez Guzmán por su disposición y apoyo a la investigación, además de su valiosa amistad; al Dr. Oswaldo Rey Taboada Gaytán, por sus acertadas aportaciones y valiosos comentarios a la tesis; al Dr. Antonio Trinidad Santos por su gentileza y sabias aportaciones al trabajo.

A los Doctores Alejandro Alarcón, Julián Delgadillo Martínez, Jesús Pérez Moreno, por su amistad y apoyo incondicional; a las MC María Encarnación Lara y Cristina Heredia, quienes hicieron más agradable el trabajo de laboratorio, gracias por su apoyo.

A la MC Alicia Franco, por su apoyo y amistad incondicional, y la MC Laura V. Hernández Cuevas por su ayuda en la identificación taxonómica de los HMA.

Al MC Rigoberto Gonzalez Mancilla por la realización del mapa de la zona donde se colectaron las muestras.

A todos mis amigos del área, compañeros y personal del laboratorio quienes dieron su valiosa aportación para la realización de esta tesis.

A mi familia Paty, Yeray y Kerim, quienes gracias a su apoyo y comprensión se terminó satisfactoriamente la investigación.

# CONTENIDO

	Páginas
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....</b>	<b>5</b>
2.1. Objetivo general.....	5
2.1.1. Objetivos particulares.....	5
2.2. Hipótesis general.....	6
2.2.1. Hipótesis particulares .....	6
<b>III. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>7</b>
3.1. El cultivo de chile ( <i>Capsicum</i> sp.).....	7
3.1.1. Importancia.....	9
3.1.1.1. Importancia en México.....	10
3.1.2. Chile poblano .....	13
3.1.2.1. Características y usos .....	13
3.1.2.2. Requerimientos edafoclimáticos.....	14
3.1.2.3. Limitantes para el cultivo .....	14
3.2. Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV) .....	16
3.2.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	18
3.2.2. Bacterias solubilizadoras de fosfatos .....	20
3.2.3. Bacterias productoras de auxinas .....	23
3.3. Las micorrizas.....	24
3.3.1. Definición y tipos de micorrizas .....	24
3.3.2. Simbiosis entre hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las plantas.....	25
3.3.3. Beneficios de los HMA en <i>Capsicum</i> sp.....	27
3.3.3.1. Interacción de los HMA y los nutrientes.....	29
3.3.3.2. Mecanismos de protección contra enfermedades .....	30
3.3.3.3. Resistencia a condiciones ambientales adversas .....	31
3.4. Interacción HMA-RPCV .....	32

#### **IV. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLÁNTULAS DE CHILE POBLANO (*Capsicum annuum* L.)** 35

RESUMEN .....	35
ABSTRACT.....	36
4.1. INTRODUCCIÓN .....	37
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
4.2.1. Aislamiento y selección de cepas de rizobacterias colectadas en la rizósfera de chile poblano .....	40
4.2.1.1. Colecta de suelo rizosférico.....	40
4.2.1.2. Cuantificación de rizobacterias promotoras de crecimiento.....	42
4.2.1.3. Actividad antagónica de las rizobacterias .....	45
4.2.2. Identificación molecular.....	45
4.2.3. Efectividad de las rizobacterias en la promoción del crecimiento en plántulas de chile poblano .....	47
4.2.3.1. Preparación del inóculo a base de rizobacterias .....	47
4.2.3.2. Establecimiento del experimento y variables evaluadas en plántulas .....	48
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	49
4.3.1. Aislamiento y selección de cepas de rizobacterias.....	49
4.3.1.1. Solubilización de fosfatos y producción de auxinas por las rizobacterias .....	51
4.3.1.2. Actividad antagónica de las rizobacterias .....	56
4.3.2. Caracterización de las cepas.....	61
4.3.3. Efectividad de las rizobacterias en la promoción del crecimiento en plántulas de chile poblano. ....	63
4.4. CONCLUSIONES .....	67
4.5. LITERATURA CITADA .....	68
<b>V. HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN EL CRECIMIENTO DE CHILE POBLANO .....</b>	<b>76</b>
RESUMEN .....	76



ABSTRACT.....	77
5.1. INTRODUCCIÓN.....	78
5.2. MATERIALES Y METODOS.....	79
5.2.1. Características del suelo.....	79
5.2.2. Caracterización de los consorcios de las muestras colectadas.....	80
5.2.3. Efectividad de consorcios de HMA en la promoción del crecimiento de chile poblano.....	81
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	83
5.3.1. Propagación y selección de consorcios de HMA colectados en la rizósfera de chile poblano.....	83
5.3.2. Efectividad de consorcios de HMA en la promoción del crecimiento de chile poblano.....	85
5.3.3. Contenido de fósforo en planta.....	90
5.3.4. Consorcios de HMA.....	92
5.4. CONCLUSIONES.....	96
5.5. LITERATURA CITADA.....	96
<b>VI. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE RIZOBACTERIAS Y HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN EL DESARROLLO DE CHILE POBLANO (<i>Capsicum annuum</i> L.) EN INVERNADERO.....</b>	<b>101</b>
RESUMEN.....	101
ABSTRACT.....	102
6.1. INTRODUCCIÓN.....	103
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	104
6.2.1. Material biológico, siembra e inoculación.....	104
6.2.2. Tratamientos y diseño experimental.....	106
6.2.3. Medición de variables en planta.....	108
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109

6.3.1. Número de esporas y colonización radical por HMA .....	109
6.3.2. Respuestas en variables de crecimiento .....	111
6.3.3. Intercambio de gases .....	118
6.3.4. Contenido de fósforo en plantas.....	122
6.4. CONCLUSIONES .....	124
6.5. LITERATURA CITADA .....	125
<b>VII. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>128</b>
<b>VIII. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>130</b>

## LISTA DE CUADROS

	<b>Páginas</b>
Cuadro 3.1. Fluctuación de la producción total de chile (fresco y seco) en México, en el periodo 2000-2014 (SIAP-SAGARPA, 2015). .....	12
Cuadro 3.2. Efectos de la inoculación de HMA en el crecimiento de algunos cultivares de <i>Capsicum</i> spp. ....	28
Cuadro 4.1. Características de los suelos colectados en nueve sitios cultivados con chile poblano en la Sierra Nevada, estado de Puebla, México. ....	42
Cuadro 4.2. Cepas aisladas de suelo rizosférico y seleccionadas para el experimento en plántulas de chile poblano, en Montecillo, Texcoco estado de México.....	48
Cuadro 4.3. Unidades formadoras de colonias (UFC) cuantificadas en suelo rizosférico de chile poblano en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México.....	50
Cuadro 4.4. Correlaciones el número de microorganismos y algunas características del suelo rizosférico de chile poblano colectado en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México.....	53
Cuadro 4.5. Afiliación genética de las cepas obtenidas en este estudio según las secuencias de amplificación del gen 16S rARN comparadas con el GenBank. ....	61
Cuadro 4.6. Altura, número de hojas y biomasa seca en plántulas de chile poblano por efecto de la inoculación de rizobacterias a los 68 días después de la inoculación. ....	64
Cuadro 5.1. Colonización por HMA en plantas de chile poblano colectados en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México. ....	84
Cuadro 5.2. Correlación entre la colonización por HMA en raíces de chile poblano y las características del suelo de muestras provenientes de nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México.....	85
Cuadro 5.3. Consorcios de HMA, colonización total (CT), vesículas (V) y número de esporas (E) presentes en la rizósfera de chile poblano, a los 64 días después de la siembra en invernadero. ....	94

Cuadro 6.1. Tratamientos de HMA y RPCV usados en el experimento de chile poblano cultivadas en invernadero.....	107
Cuadro 6.2. Colonización por HMA, altura y número de hojas en plántulas de chile poblano al momento del trasplante en invernadero. ....	107
Cuadro 6.3. Porcentaje de colonización por HMA en raíces de chile poblano y número de esporas en 100 g de suelo seco a los 94 días después del trasplante.....	111

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Páginas</b>
Figura 3.1. Representación botánica de una planta de <i>Capsicum</i> (Heiser <i>et al.</i> , 1969). ....	9
Figura 3.2. Producción total de chile (fresco y seco) a nivel mundial en millones de toneladas (Mt), datos del 2012 (FAOSTAT, 2016). ....	10
Figura 4.1. Ubicación geográfica de los nueve sitios donde se colectaron muestras de suelo rizosférico de chile poblano en la Sierra Nevada, estado de Puebla, México. ....	41
Figura 4.2. Solubilización de fosfatos ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por las cepas de BSP aislados en suelo rizosférico de chile poblano colectado en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México. Medias $n = 3, \pm \text{EE}$ . ....	54
Figura 4.3. Producción de auxinas ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por las cepas de BPA aislados en suelo rizosférico de chile poblano colectado en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México. Medias $n = 3, \pm \text{EE}$ . ....	55
Figura 4.4. Porcentaje de inhibición de <i>Fusarium</i> sp., y <i>Phytophthora capsici</i> por efecto de las BSP aisladas de suelo rizosférico de chile poblano colectado en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México. Medias $n = 4, \pm \text{EE}$ . ....	58
Figura 4.5. Porcentaje de inhibición de <i>Fusarium</i> sp., y <i>Phytophthora capsici</i> por efecto de las BPA aisladas de suelo rizosférico de chile poblano colectado en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México. Medias $n = 4, \pm \text{EE}$ . ....	59
Figura 4.6. Porcentaje de inhibición de <i>Fusarium</i> sp., y <i>Phytophthora capsici</i> por efecto de las BFN aisladas de suelo rizosférico de chile poblano colectado en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México. Medias $n = 4, \pm \text{EE}$ . ....	60
Figura 4.7. Árbol filogenético de máxima similitud basado en la secuencia 16S rARN de las cepas aisladas en este estudio (en negrita) y secuencias del GenBank con su número de aceción. ....	62
Figura 4.8. Área foliar en plántulas de chile poblano por efecto de la inoculación de RPCV a los 68 días después de la inoculación. Medias $n = 20, \pm \text{EE}$ . Letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha = 0.05, a>b$ ). ....	67
Figura 5.1. Altura (A), número de hojas (B) y área foliar (C) en chile poblano por efecto de la inoculación de consorcios de HMA provenientes de 9 sitios del estado de Puebla,	

después de 65 días de la siembra en invernadero. Medias  $n = 6, \pm EE$ . Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05, a>b$ ). TA = Testigo absoluto, NK = Testigo fertilizado N y K (120-00-100), NPK = Testigo fertilizado N, P y K (120-80-100). ..... 88

Figura 5.2. Peso seco de hojas (A), tallo (B) y raíz (C) en chile poblano por efecto de la inoculación de consorcios de HMA provenientes de 9 sitios del estado de Puebla, después de 65 días de la siembra en invernadero. Medias  $n = 6, \pm EE$ . Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05, a>b$ ). TA = Testigo absoluto, NK = Testigo fertilizado N y K (120-00-100), NPK = Testigo fertilizado N, P y K (120-80-100). ..... 89

Figura 5.3. Contenido de Fósforo (%) en tejido vegetal (tallos y hojas) de chile poblano por efecto de la inoculación de consorcios de HMA provenientes de 9 sitios del estado de Puebla, después de 65 días de la siembra en invernadero. Medias  $n = 6, \pm EE$ . Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05, a>b$ ). TA = Testigo absoluto, NK = Testigo fertilizado sin P (120-00-100), NPK = Testigo fertilizado (120-80-100). ..... 91

Figura 5.4. Esporas de HMA encontrados en la rizósfera de chile poblano, *Funneliformis* aff. *geosporum*: estratos (a) e hifas de sostén (b); *Claroideoglomus* sp.: hifas de sostén (c), estratos y vesículas (d); y *Claroideoglomus* cf. *etunicatum* (e) y (f). ..... 95

Figura 6.1. Altura de plantas de chile poblano por efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias  $n = 8, \pm EE$ . Letras diferentes en las líneas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05, a>b$ ). ..... 112

Figura 6.2. Número de hojas en plantas de chile poblano por efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias  $n = 8, \pm EE$ . Letras diferentes en las líneas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05, a>b$ ). ..... 113

Figura 6.3. Área foliar ( $cm^2$ ) en plantas de chile poblano por el efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias  $n = 8, \pm EE$ . Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05, a>b$ ). ..... 114

Figura 6.4. Número de flores por planta en chile poblano por el efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias  $n = 8, \pm EE$ . Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05, a>b$ ). ..... 116

Figura 6.5. Peso seco de raíz (A), hojas (B) y tallo (C) en plantas de chile poblano por el efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias $n = 8, \pm EE$ . Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha = 0.05, a>b$ ). .....	117
Figura 6.6. Concentración interna de $CO_2$ $C_i$ en el mesófilo de la hoja en plantas de chile poblano por el efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias $n = 8$ . .....	118
Figura 6.7. Tasa de transpiración $E$ en plantas de chile poblano por el efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias $n = 8$ . .....	119
Figura 6.8. Conductancia estomática $g_s$ de chile poblano en respuesta a la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias $n = 8$ . .....	120
Figura 6.9. Tasa de fotosíntesis $P_n$ en plantas de chile poblano por efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias $n = 8$ . .....	122
Figura 6.10. Contenido de fósforo (%) en plantas (tallo más hojas) de chile poblano por efecto de la inoculación con HMA y RPCV en invernadero. Medias $n = 8 \pm EE$ . Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha = 0.05, a>b$ ). .....	123

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

En México, el cultivo de chile (*Capsicum annuum*) tiene gran importancia dentro de las hortalizas, ya que en el año 2012, se ubicó en el segundo lugar en producción mundial con 2 439 736 toneladas, superado únicamente por China, con 16 290 000 toneladas. Con respecto a las exportaciones de esta hortaliza, en el 2011 México ocupó el primer lugar con 699 657 t, seguido de España (511 340 t) y Países Bajos (474 013 t); el rendimiento promedio de chile fresco en el 2012, en nuestro país fue de 17.5 t/ha, cosechadas en 136 132 hectáreas (FAOSTAT, 2016).

Actualmente, la producción de *Cápsicum annuum* no siempre se realiza en condiciones de campo, sino también en agricultura protegida, lo cual permite hacer un manejo adecuado del agua y tener mejor control de plagas y enfermedades (Ibarra-Jiménez *et al.*, 2004). Las enfermedades que con más frecuencia atacan a este cultivo son ocasionadas por hongos patógenos de las raíces tales como *Phytophthora capsici*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani* y *Pythium* (Utkhede y Mathur, 2005; Alejo-Iturvide *et al.*, 2008).

La calidad del fruto, puede ser afectada por factores fisiológicos y ambientales, tales como la disponibilidad de nutrimentos y agua; la disponibilidad de agua es un factor importante, que afecta la nutrición, en exceso induce el aumento de enfermedades, disminuyendo la calidad de plantas y rendimiento. Así mismo, la sequía limita la producción de manera significativa, reduce el crecimiento y la fotosíntesis, hasta causar la muerte de la planta (Mena-Violante *et al.*, 2006).

Para contrarrestar los problemas nutrimentales y la incidencia de enfermedades, es necesario utilizar plantas inoculadas con microorganismos benéficos (bacterias y hongos micorrízicos)



existentes en la rizósfera; estos microorganismos deben ser seleccionados para aumentar la sanidad de plantas y reducir el uso de fertilizantes químicos, lo que puede resultar en efectos positivos en el crecimiento y desarrollo de la planta (Artursson *et al.*, 2006).

La microbiota rizosférica está constituida por una diversidad muy amplia de microorganismos, entre estos, hay grupos de bacterias y hongos que estimulan el crecimiento vegetal a través de mecanismos que incluyen la mejora de la absorción de nutrientes, control biológico de patógenos y la producción de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal (Bais *et al.*, 2006; De-Bashan *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2009).

Las bacterias, que promueven crecimiento vegetal, pueden tener efectos directos sobre las plantas o en la simbiosis entre hongos endomicorrízicos y las plantas hospedantes (Kataoka y Futai, 2009). Estas bacterias, llamadas también auxiliadoras de la micorrización, promueven el establecimiento de la simbiosis, estimulan colonización y crecimiento de las hifas, intensificando el contacto raíz-hongo así como la colonización y la reducción del impacto de condiciones ambientales adversas sobre el micelio del hongo micorrízico (Frey-Klett *et al.*, 2007).

El potencial de los microorganismos benéficos es enorme, muy probablemente su mayor efecto se logre en aquellos cultivos que no son fertilizados con grandes dosis de nutrimentos. En el caso particular de Chile, que se cultiva en todo el país con una gran heterogeneidad en el uso de tecnologías, el uso de biofertilizantes podría ser beneficioso para el cultivo. En la región de la Sierra Nevada, estado de Puebla, se cultiva uno de los chiles de mayor tradición en la cocina Mexicana, el chile poblano. Este tipo de Chile, famoso por su uso en el platillo de “chiles en nogada” y “mole poblano” (Cyphers *et al.*, 2009), es cultivado por pequeños

agricultores que enfrentan diversos problemas como escasez de recursos, acceso a tecnologías e incidencia de fitopatógenos (Huerta *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2011). Incrementar tan sólo la calidad de plántula podría impactar favorablemente al cultivo de chile poblano en la región que es la cuna de este cultivo ancestral.

Por lo anterior, en la presente investigación intitulada “Interacción entre Bacterias Promotoras de Crecimiento y Hongos micorrízicos en el crecimiento de Chile poblano (*Capsicum annuum* L.)” se estudió el efecto de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV) y Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) provenientes de diferentes plantaciones de chile poblano de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México, sobre el crecimiento de la misma especie vegetal en invernadero.

La investigación consta de ocho capítulos. En el capítulo uno se describe la introducción general, en el capítulo dos se redactan los objetivos e hipótesis de la investigación. El capítulo tres esta dedicada a la revisión de literatura en el cual se describe al cultivo de chile poblano y su importancia, además se describen las rizobacterias promotoras de crecimiento y hongos micorrízicos arbusculares, su importancia, definición y aplicación de las mismas como bioinoculantes, además de los efectos que estas podrían proporcionar al inocularlos de manera conjunta.

El capítulo cuatro, “Caracterización y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de chile poblano (*Capsicum annuum* L.)” corresponde al primer artículo de esta investigación, en el cual se probaron los efectos de cepas bacterianas en el cultivo a nivel de plántula en invernadero. El capítulo cinco, que lleva por título “Hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento de chile poblano” trata sobre los efectos de nueve consorcios

micorrízicos arbusculares en el crecimiento de chile poblano, los cuales fueron aislados de campos de cultivo de chile poblano en el estado de Puebla. El capítulo seis, esta dedicado al estudio de la interacción RPCV-HMA en el crecimiento de las plantas, bajo el titulo: “Efecto de la inoculación de rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares en el desarrollo de chile poblano (*Capsicum annuum* L.) en invernadero”. Finalmente, el capítulo siete, dedicada a las conclusiones generales y el capítulo ocho, dedicada a las citas bibliográficas utilizadas en los apartados de introducción general y revisión de literatura.

## II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1. Objetivo general

Aislar y seleccionar rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares asociados con agroecosistemas de chile poblano y estudiar sus efectos en el crecimiento de chile poblano en invernadero.

#### 2.1.1. Objetivos particulares

1. Evaluar la capacidad promotora de crecimiento de cepas de rizobacterias aisladas de la rizosfera de chile poblano (*Capsicum annuum* L.).
2. Estudiar el antagonismo de cepas de rizobacterias contra el desarrollo de hongos fitopatógenos de la raíz a nivel *in vitro*.
3. Estudiar la habilidad de consorcios de hongos endomicorrízicos para promover el crecimiento de plantas de chile poblano.
4. Evaluar los efectos de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento y hongos endomicorrízicos en chile poblano bajo condiciones de invernadero.
5. Caracterizar aquellas cepas de rizobacterias, a nivel molecular, que posean la capacidad para promover el crecimiento en plántulas de chile poblano.

## **2.2. Hipótesis general**

Los agroecosistemas de chile poblano son reservorios de bacterias promotoras de crecimiento y hongos endomicorrízicos arbusculares con potencial de uso en cultivos de importancia agrícola.

### **2.2.1. Hipótesis particulares**

1. Menos del 20 % de las cepas de rizobacterias aisladas promueven el crecimiento de chile poblano.
2. Las cepas de rizobacterias aisladas de chile poblano inhiben el desarrollo de hongos fitopatógenos.
3. Al menos un consorcio de los hongos endomicorrízicos tiene capacidad para incrementar el crecimiento de chile poblano.
4. La inoculación de bacterias y hongos endomicorrízicos en plantas de chile poblano mejora la nutrición y sanidad e incrementan el crecimiento de la planta.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. El cultivo de chile (*Capsicum* sp.)

El género *Capsicum* es originario de América con dos centros de domesticación, uno en América Central y el otro en la región andina. El nombre del género tiene origen en el vocablo griego *kapso* que significa picar, pero también se conoce con otros nombres como pimiento, chile, ají, pimentón, etcétera (Paran *et al.*, 2007). La clasificación taxonómica del chile según Nuez *et al.* (2003), es la siguiente: pertenece al Reino Vegetal, subreino *Embriophyta*, División *Spermatophyta*, Línea *Angiospermae*, Clase *Dicotyledoneas*, Orden *Solanales*, Familia *Solanaceae* y Género *Capsicum*.

Actualmente, se han identificado 31 especies, de las cuales únicamente cinco han sido domesticadas: a) *C. annuum* L. como la especie más popular y más producida en todo el mundo y que incluye al pimiento morrón, chile serrano, chile jalapeño y chile poblano (ancho); b) *C. baccatum* L., como los christmas bells, ajés y piquis; c) *C. chinense* Jacq., como el hábanero y el dátil; d) *C. frutescens* L., que incluye el tabasco y malagueta y; e) *C. pubescens* (Dae-Young *et al.*, 2009; Ramalho *et al.*, 2010).

El género *Capsicum*, ingresó a Europa con la expedición de Colón en el siglo XV, moviéndose rápidamente alrededor del mundo y a su llegada a Europa occidental se utilizó únicamente como condimento; posteriormente fue asumiendo un papel importante en las cocinas de ciertas partes de Europa, África y muchas regiones de Asia (Paran *et al.*, 2007). México se considera uno de los principales centros de domesticación y de mayor diversidad genética de *Capsicum annuum* L. (Crosby, 2008).

El chile es una planta anual o perenne, presenta raíz pivotante con numerosas raíces adventicias que llegan a medir hasta un metro; tiene tallos erectos, herbáceos o arbustivos, de hasta 2 m de alto, ramificados, semileñosos y de color verde a verde oscuro. Las plantas presentan hojas ovoidales alargadas, con un ápice muy pronunciado (acuminado) y con pecíolos alargados (Figura 3.1) (Vilmorin, 1977).

Las flores son hermafroditas, solitarias, con inserción en las axilas de las hojas, corola gamopétala, completa y perfecta, pedunculada, cáliz dentado gamosépalo, color blanco a blanco sucio y en ocasiones púrpura, de 5-11 mm de longitud; según las variedades en una ramificación pueden formarse de 1 a 5 o más flores (Figura 3.1). La polinización es autógama y facultativa, cada antera con dos sacos polínicos, ovario superior con óvulos dispuestos en forma axilar sobre la placenta (Heiser *et al.*, 1969; Montes, 2010).

El fruto de chile es una baya con pericarpio carnoso o semicarnoso que envuelve varios carpelos donde se desarrollan las venas y un tejido placentario al que se unen las semillas; está formado por un pedúnculo, base, vena, semillas, lóculo, pericarpio y septa. Los frutos son de tamaños y formas variables; cuando están inmaduros presentan color verde o amarillo, y rojos, amarillos, naranja y café cuando están maduros. Las semillas son redondeadas, de color amarillo pálido y longitud variable entre 3 y 5 mm, insertadas en una placenta cónica de disposición central (Paran *et al.*, 2007).



Figura 3.1. Representación botánica de una planta de *Capsicum* (Heiser *et al.*, 1969).

### 3.1.1. Importancia

*Capsicum* es un cultivo importante que crece y se desarrolla casi en todos los países del mundo, entre las hortalizas es uno de los cultivos que más se consume y ocupa el sexto lugar en producción mundial superado por el tomate (*Solanum lycopersicum*), la cebolla (*Allium cepa*), el col (*Brassica oleracea*), el pepino (*Cucumis sativus*) y las berenjenas (*Solanum melongena*) (FAOSTAT, 2016). El cultivo crece desde el nivel del mar hasta los 2500 msnm con una estimación de producción de más de 26 millones de toneladas al año (Pozo *et al.*, 1991). La producción mundial estimada en el 2012 fue aproximadamente de 28.5 millones de toneladas de chile en fresco y 3.1 millones de toneladas en seco, cosechadas en 3.5 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2016). En la producción total de chile (fresco y seco) durante el año 2012, fue Asia el continente de mayor producción con 20.47 millones de toneladas (Figura 3.2). En este mismo año, China Continental fue el productor más importante con más de 16



millones de toneladas, seguido por México y Turquía, que produjeron en ese mismo año 2 379 736 y 2 072 132 toneladas, respectivamente (FAOSTAT, 2016).

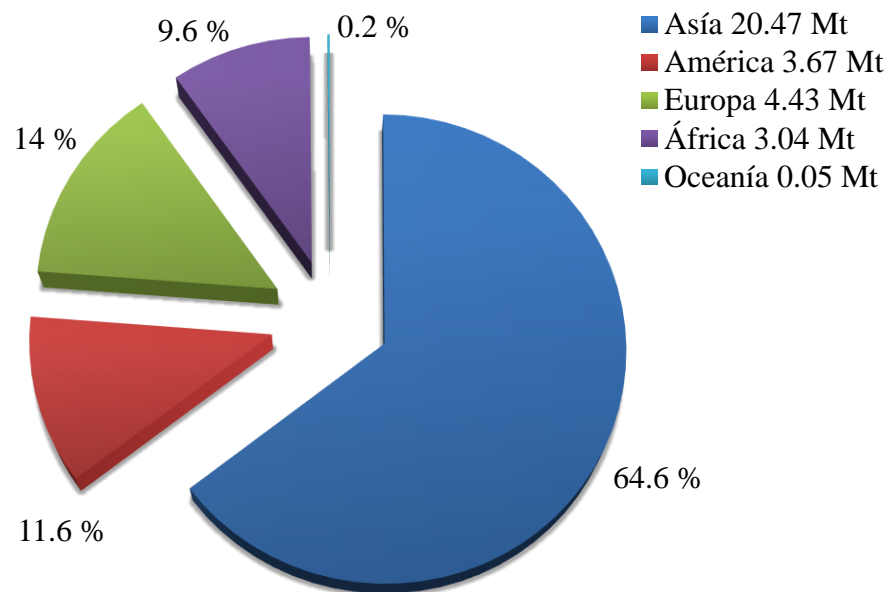


Figura 3.2. Producción total de chile (fresco y seco) a nivel mundial en millones de toneladas (Mt), datos del 2012 (FAOSTAT, 2016).

### 3.1.1.1. Importancia en México

En México, el cultivo de chile representa parte de la historia del país, ya que la presencia del chile entre las culturas mesoamericanas es milenaria y su aprovechamiento se remonta a épocas en que los grupos que habitaban el país eran nómadas y su subsistencia se basaba en la caza y recolección. En la época prehispánica, el nombre de ciertos lugares en México ya se les asociaba al chile y una de las primeras referencias iconográficas se encuentra en un topónimo registrado en el Edificio J de Monte Albán, Oaxaca (hoy día sitio arqueológico del estado)

representado por un cerro de las plantas de chile, mostrando una planta y tres frutos (Cyphers *et al.*, 2009).

Otro lugar relacionado con el chile es Chilixtlahuaca “en el llano del chile”, en la Región de la Montaña, Guerrero, que aparece representado en el *Lienzo de Citlaltépec* identificado por Flor Yenín Cerón (2006), este representa un llano que en medio muestra un chile, el poblado se localiza en los límites de Oaxaca y Guerrero. Otros lugares que llevan al chile como componente de su nombre son: Chilapan “Río de los chiles”, actualmente Chilapa de Álvarez, Guerrero; Chilacachapan “sobre el agua de *chilacáxitl*” (un tipo de chile), ahora Chilacachapa Guerrero; Chiltecpictlán “chilar de chiltepiquines” hoy Tepintla, Puebla; Chilchotla “Chile picante que hace llorar”, Puebla; y Chilcuautla “arboleda de chiles” Hidalgo (Cyphers *et al.*, 2009).

Los frutos se usan principalmente como ingrediente esencial en la comida ya sea en fresco, cocidos o deshidratados; además de su importancia en la alimentación, presentan atributos nutracéuticos. Se han aislado y analizado más de 400 compuestos de diversas variedades de chile, entre los más estudiados destacan los capsaicinoides, carotenoides, compuestos fenólicos, flavonoides, vitaminas A, C y E, y ácido ascórbico (Tundis *et al.*, 2011), que actúan para la prevención de diversas enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer (Maoka *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2012), diabetes (Tundis *et al.*, 2011), hipertensión (Gupta *et al.*, 2002), enfermedades neurológicas (Beltran *et al.*, 2007), debido a que estos fitoquímicos actúan como antioxidantes (Tundis *et al.*, 2011), antiinflamatorios (Tsai *et al.*, 2005) y antimutagénicos (Serrano *et al.*, 2010).

Actualmente, en la economía mexicana la producción de este cultivo es una de las actividades hortícolas más importantes. En el 2014 se registró una superficie sembrada de 148 968

hectáreas, localizadas en diversas condiciones agroecológicas y la producción anual de esta especie en el mismo año fue de 2 732 635 toneladas, permitiendo un ingreso económico superior a 17 896 millones de pesos; del total de la producción México exporta aproximadamente 478 mil toneladas de fruto (SIAP-SAGARPA, 2015).

Los estados con mayor producción de chile fueron Chihuahua (722 709 t), Sinaloa (604 774 t), Zacatecas (295 120 t), San Luis Potosí (169 230 t), Michoacán (154 839 t), Jalisco (121 934 t), Sonora (109 732 t) y Tamaulipas (106 077 t); Puebla ocupó el lugar 23 con 11 251 t producidas en 3 072 hectáreas (Cuadro 3.1). Las variedades más cultivadas (verde y seco) son chile jalapeño (35 623 ha), mirasol (31 245 ha), poblano (28 464 ha), anehim (12 169 ha), serrano (10 591 ha), chilaca (5 690 ha), bell pepper (4 927 ha), pasilla (4 314 ha), piquín (1437 ha), pimiento morrón (1 094 ha) y chile habanero (790 ha) (SIAP-SAGARPA 2015).

Cuadro 3.1. Fluctuación de la producción total de chile (fresco y seco) en México, en el periodo 2000-2014 (SIAP-SAGARPA, 2015).

Estado	2000	2005	2010	2011	2012	2013	2014
Producción (toneladas)							
Chihuahua	409 907	374 709	545 828	576 946	562 167	529 052	722 709
Sinaloa	295 642	469 803	618 110	301 527	556 463	552 121	604 774
Zacatecas	308 320	317 085	288 796	291 206	348 834	279 699	295 120
San Luis Potosí	128 628	127 535	184 853	171 249	174 882	175 881	169 230
Michoacán	38 703	38 195	67 672	52 779	83 821	51 548	154 839
Jalisco	59 989	82 509	65 689	95 210	79 429	99 235	121 934
Sonora	56 909	41 206	79 220	83 938	83 446	70 418	109 732
Tamaulipas	40 097	115 902	85 456	116 166	82 103	91 654	106 077
Puebla	10 433	8 696	9 249	8 114	10 191	11 150	11 251

### **3.1.2. Chile poblano**

#### **3.1.2.1. Características y usos**

El chile poblano (ancho) es una especie de *C. annuum*, con ciclo productivo anual, la planta mide alrededor de 60 cm de altura, sus tallos son erectos, herbáceos, ramificados, semileñosos y de color verde oscuro, hojas de forma lanceolada, con un ápice muy pronunciado (acuminado) y con pecíolos alargados. El fruto con forma cónica llega a medir entre 8 y 15 cm de largo y unos 6 cm de ancho, lo que le hace uno de los tipos de chiles más grandes. Presenta una pared gruesa, de color verde cuando no ha madurado y cuando lo hace puede tornarse rojo en algunas variedades y casi negro en otras. El picor del fruto medida en unidades de Scoville se encuentra entre 1000 y 2000, respectivamente (Cyphers *et al.*, 2009).

Este cultivo es representativo de la cultura mexicana por su uso en los platillos tradicionales ya sea en verde o seco; en el estado de Puebla representa una antigua tradición cultural por su importancia gastronómica, económica y social, debido a su asociación con platillos como “chiles en nogada”, cuyo origen se sitúa en Puebla, y el “mole” de los que el más degustado es el de esta ciudad (Cyphers *et al.*, 2009). Se produce principalmente en la Sierra Nevada del estado de Puebla, en municipios como San Matías Tlalancaleca, San Lorenzo Chiahutzingo, San Rafael Tlanalapa, Moyozingo, Huejotzingo y San Lucas (Huerta *et al.*, 2007). En verde se le conoce también como chile corazón y roque, en seco como chile ancho, mulato, chilhuacle, pasilla, joto y chile de ramos (Cyphers *et al.*, 2009).

### **3.1.2.2. Requerimientos edafoclimáticos**

El chile poblano es muy exigente por lo que generalmente no se adapta a condiciones extremas; para que la planta tenga un buen desarrollo requiere de temperaturas entre los 20 y 25 °C, temperaturas por arriba de 30 °C pueden provocar la caída de flores y por debajo de los 15 °C pueden retrasar el desarrollo de la planta, produciéndose daños significativos cuando la temperatura es inferior a los 10 °C. La humedad relativa óptima para la floración y el cuajado de frutos debe de estar entre 50 y 70 % (Huerta *et al.*, 2007).

El chile en general es muy exigente en cuanto a luminosidad, sobre todo en los primeros estados de desarrollo, en chile poblano la luminosidad es muy importante, por lo que la falta de luz puede afectar la floración y se puede presentar enflaquecimiento de la planta, dando como resultado tallos débiles y sin soporte al peso de frutos. El cultivo se adapta mejor a suelos con textura areno-limosa, no se adapta a suelos arcillosos; por lo que en el cultivo deben de evitarse excesos de humedad, ya que se podría propiciar el desarrollo de enfermedades causadas por hongos patógenos presentes en el suelo; el pH óptimo para este cultivo es de 6.5 a 7.0. (Huerta *et al.*, 2007).

### **3.1.2.3. Limitantes para el cultivo**

El estado de Puebla en 2014 registró una superficie sembrada con chile poblano de 549.5 ha y un volumen de producción de 1588 toneladas, originando ingresos económicos superiores a 143 millones de pesos. La superficie sembrada con chile verde en el estado disminuyó 13.5 % de 2000 al 2005 y la producción en 17 %, en el 2010 la superficie sembrada se mantuvo similar al 2005 pero logró mayor producción con 1255 t y un rendimiento de 8.7 t/ha, estos datos disminuyeron 4 y 12 % para el 2014 (SIAP-SAGARPA, 2015).

Una gran parte de la producción de chile poblano ha sido obtenida en la Región de la Sierra Nevada de Puebla, pero ha decrecido en los últimos años debido a la mala calidad de plántulas producidas y la baja demanda en el mercado (García *et al.*, 2011).

Uno de los principales problemas que enfrenta el cultivo es la enfermedad del “Damping off” o mejor conocida como “la secadera” del chile y es ocasionada por hongos fitopatógenos como *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Alternaria* spp. (Bautista-Calles *et al.*, 2010). Otra enfermedad importante de este cultivo es la marchitez causada por nemátodos como *Nacobbus aberrans*, *Meloidogyne incognita*, *M. arenia*, *M. javanica* y *M. hapla* (Paran *et al.*, 2007). Insectos como áfidos, ácaros y trips pueden ser directos sobre las plantas de chile o indirectos ya que son transmisores de muchas enfermedades virales de importancia económica como el Virus del Mosaico del Tabaco, el Virus del Mosaico del Tomate, el Virus del Mosaico del Pepino y el Virus del Mosaico de la Papa (Huerta *et al.*, 2007; Crosby, 2008).

Así mismo se suma factores ambientales como son la disponibilidad de nutrimentos y agua que también pueden ocasionar problemas en el cultivo del chile; la disponibilidad de agua, es un factor importante, que afecta la nutrición, y en exceso induce el aumento de enfermedades, disminuyendo la calidad de plantas y su rendimiento. La sequía, limita la producción de manera significativa, ya que reduce el crecimiento y la fotosíntesis, provocando la muerte de la planta (Mena-Violante *et al.*, 2006).

Todos los factores mencionados pueden causar pérdidas de hasta el 100 % del cultivo, propiciando la sustitución por otros cultivos (maíz, frijol, frutales, etc.) y el riesgo de la desaparición de variedades locales. A nivel de plántulas la incidencia de enfermedades

causadas por fitopatógenos puede ser de hasta 29 %, lo cual es una fuente de inóculo que se traspasa a campo (Pozo, 1983).

### **3.2. Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV)**

Las bacterias son organismos procariontes, cuyo tamaño varían de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y de largo 2  $\mu\text{m}$  aproximadamente, se encuentran en grandes cantidades en el suelo formando pequeñas colonias que pueden multiplicarse rápidamente por división cada 20 minutos, pueden ser heterótrofos, aerobios, anaerobios o microaerófilos (Porta *et al.*, 1999).

Las bacterias que colonizan la raíz y su zona de influencia (rizósfera), son denominadas rizobacterias. Las benéficas son conocidas como Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV), por sus siglas en inglés PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kim *et al.*, 2011). Estas bacterias pueden clasificarse en dos grupos: las RPCV extracelulares que colonizan la rizósfera, el rizoplano o los espacios celulares de la corteza radical; y las RPCV intracelulares, que existen dentro de las células de la raíz, generalmente en estructuras especializadas llamadas nódulos (Gray y Smith, 2005).

Estos microorganismos desempeñan funciones esenciales en las plantas, como son el control biológico de patógenos, mediante efectos antagónicos e inducción de resistencia sistémica; el incremento de la biodisponibilidad de elementos minerales como fósforo, nitrógeno y hierro; y la fitoestimulación al propiciar la emergencia o enraizamiento (Sandhya *et al.*, 2010). Por todos estos mecanismos, las RPCV permiten mayor crecimiento de los vegetales, además de mejorar la producción de compuestos reguladores como el etileno, auxinas, giberelinas, entre otras (Kim *et al.*, 2010).

Las RPCV son componentes importantes de los ecosistemas, ya que no sólo contribuyen en la disponibilidad de nutrimentos, sino también en la degradación de la materia orgánica (vegetal y animal) al usarla como fuentes de carbono y energía; aunado a ello sintetizan una enzima, la ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACC desaminasa), que regula la producción de etileno y mejora la adaptación de los vegetales a suelos contaminados con metales pesados, induce resistencia a sequía y valores extremos de pH (acidez y alcalinidad), además de actuar como antagonistas de agentes patógenos (Saraf *et al.*, 2010).

Los microorganismos que afectan adversamente el vigor y el crecimiento vegetal son los hongos, bacterias, micoplasma, virus y nematodos; pero sólo dos de ellos son los principales actores en el suelo: hongos patógenos (verdaderos hongos y oomicetos) y nemátodos (Agrios, 2005); para contrarrestar los problemas que ocasionan estos microorganismos se ha aumentado el uso de productos químicos (fungicidas y nemátocidas); sin embargo, el control biológico es considerado como una alternativa para reducir el uso de estos productos en la agricultura (Gerhardson, 2002).

El uso de microorganismos como bioinoculantes permite un mejor desarrollo e incrementa la productividad de los cultivos (Artursson *et al.*, 2006) y por ello son considerados como biofertilizantes. Un biofertilizante se define como una sustancia que contiene microorganismos vivos y que pueden ser aplicados a semillas, plantas o suelo, promoviendo su crecimiento al colonizar la rizósfera y aumentar el suministro y disponibilidad de los nutrimentos para la planta (Altomare y Tringovska, 2011).

Dichos microorganismos promueven el crecimiento al estimular resistencias sistémicas contra agentes patógenos del suelo, que resulta en un incremento de enzimas como la fenilalanina



amonio-liasa y la peroxidasa en las plantas. Las peroxidases participan en muchos procesos fisiológicos en las plantas tales como la suberización y lignificación de paredes celulares, síntesis de fitoalexinas y metabolismo de las especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, procesos que pueden reducir el crecimiento de los agentes patógenos (Bashan y de-Bashan, 2002). Altas concentraciones de peroxidasa permiten lignificar y generar peróxido de hidrógeno, que inhibe los agentes patógenos o generan efectos antimicrobianos (Sharma *et al.*, 2007).

Las bacterias diazotróficas como *Azospirillum*, *Derxia*, *Pseudomonas*, *Beijeirenckia*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, entre otras, tienen la facultad de promover el crecimiento vegetal a través de la síntesis de hormonas reguladoras del crecimiento, como el ácido indolacético, así como de inhibir el crecimiento e incidencia de patógenos de hábito radical, mediante la secreción de sustancias antibióticas (Ferrera y Alarcón, 2001).

La fitoestimulación por medio de la síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento como giberelinas, citoquininas y auxinas, estimulan la densidad y longitud de pelos radicales, incrementando la capacidad de absorción de agua y nutrientes dando efectos positivos en la planta como mayor vigor y producción, y tolerancia a condiciones climáticas adversas como la sequía (Sandhya *et al.*, 2010).

### **3.2.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno**

El nitrógeno (N) se encuentra en la atmósfera como Nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) en un 78 % (Coyne, 2000). En la litósfera representa menos del 0.1 %, localizándose mayoritariamente en las rocas, el 0.03 % del N de la litósfera integra parte del suelo y, de éste, 1-2 % se encuentra en forma asimilable por las plantas, como nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) o amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Mengel, 2008). Por

tanto, a pesar de que el N es el elemento más abundante en la atmósfera, es un factor limitante para el desarrollo vegetal (Martínez *et al.*, 2005; Clement *et al.*, 2006).

Los microorganismos del suelo juegan un papel importante en el ciclo del N, estos transforman el N orgánico en sus formas inorgánicas disponibles para las plantas, mediante procesos de reducción del  $N_2$  a  $NH_4^+$  (Herridge *et al.*, 2008). El índice y dirección de estos procesos dependen de la estructura de los consorcios microbianos y de las actividades en el suelo. Esta fijación biológica del nitrógeno (FBN) ocurre mediante la fijación no simbiótica por bacterias fijadoras de vida libre y por bacterias simbióticas asociadas a plantas leguminosas (Altomare y Tringovska, 2011). Delwiche (1970) y Burns y Hardy (1975), estimaron que la FBN total a nivel mundial se encuentra entre 100 y 175 millones de toneladas de N año<sup>-1</sup>, y la fijación biológica en ecosistemas agrícolas a nivel global se estima entre 50-70 millones de t por año (Herridge *et al.*, 2008).

Existen diversos factores ambientales que pueden influir en la FBN; entre estos se encuentran la humedad del suelo, la presencia de oxígeno ( $O_2$ ), el pH, la cantidad y calidad de carbono, la disponibilidad de nitrógeno y otros elementos como el hierro (Fe), Molibdeno (Mo), fósforo (P) y vanadio (V) (Dixon y Kahn, 2004). Incrementos en la humedad del suelo unido a baja tensión de  $O_2$  generalmente aumentan la FBN, mientras que en suelos con bajo pH este proceso no se ve favorecido (de la Fe-Pérez *et al.*, 2015).

Los agentes nitrificantes más importantes en los sistemas agrícolas son las asociaciones simbióticas entre leguminosas y rizobios del suelo (Coba de la Peña y Puello, 2012). La fijación simbiótica de  $N_2$  requiere una interdependencia metabólica de cada socio simbiótico (Lodwig *et al.*, 2003). La planta proporciona carbono (C) en forma de ácidos dicarboxílicos a

los bacteroides por oxidación para proporcionar ATP, los bacteroides en cambio, proporcionan a la planta amonio derivado de la reducción de N<sub>2</sub> por la enzima nitrogenasa (Reich *et al.*, 2006).

### **3.2.2. Bacterias solubilizadoras de fosfatos**

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de todos los seres vivos, al formar parte de la composición de las moléculas orgánicas esenciales para la vida (Restrepo-Franco *et al.*, 2015); después del N es el segundo elemento limitante para el desarrollo y crecimiento de las plantas, a pesar de su abundancia en los suelos en sus formas orgánicas e inorgánicas (Alexander, 1980). Las principales reservas de P en el suelo son las rocas y los depósitos minerales como los de apatita, hidroxiapatitas y las oxiapatitas (Odum y Barrett, 2005), y que se encuentran formando parte de un estrato rocoso cuya característica principal es la insolubilidad (Bashan *et al.*, 2013).

Mediante los procesos de fijación y precipitación ocurre el desgaste de los minerales primarios, dando lugar a los minerales secundarios; este proceso depende significativamente del pH y tipo de suelo (Restrepo-Franco *et al.*, 2015). Según Rodríguez y Fraga (1999) en suelos ácidos, el P es fijado por óxidos e hidróxidos libres de hierro y aluminio, mientras que en los alcalinos es fijado por calcio; además el P mineral puede asociarse a los óxidos de hierro, aluminio y manganeso que son pobremente solubles y no asimilables por las plantas. La cantidad de fósforo en el suelo se expresa de forma orgánica e inorgánica.

El P inorgánico en disolución es considerado disponible para las plantas y se encuentra en forma de ortofosfato (Arai y Sparks, 2007). El P inorgánico no asimilable por las plantas corresponde al que esta contenido en minerales primarios (apatita, hidroxiapatitas y

oxiapatitas) y secundarios (fosfatos de  $\text{Ca}^{2+}$ , de  $\text{Fe}^{3+}$  y de  $\text{Al}^{3+}$ ); además puede presentarse como P adsorbido sobre las superficies de los minerales de arcilla o como oxihidróxidos de Fe y Al (Fe-P y Al-P), carbonatos de Ca (Ca-P) y P físicamente ocluido dentro de los minerales secundarios, siendo dominantes en suelos neutros y alcalinos los Ca-P [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ], y en suelos ácidos los Fe-P (strengita:  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y Al-P (Variscita:  $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Rajkumar *et al.*, 2009).

La materia orgánica es un reservorio significativo de P inmovilizado, las principales formas de P orgánico son los inositolfosfatos o ácido fítico (ésteres de inositol fosfato), ácidos nucleicos y fosfolípidos (Corrales *et al.*, 2014). Por su gran estabilidad, el inositol fosfato almacena más del 50 % del P orgánico, los fosfolípidos entre 0.5 y 7 % del P orgánico total y los ácidos nucleicos menos del 3 %, debido a que se originan por la descomposición de microorganismos, animales y restos vegetales. El contenido de P orgánico depende de factores como el clima, vegetación, textura, prácticas de fertilización, riegos y drenaje y uso del suelo (Restrepo-Franco *et al.*, 2015).

La mineralización es el proceso mediante el cual se da la liberación del P orgánico a P inorgánico, en el que participan enzimas como las fosfatasas ácidas no específicas, que llevan a cabo la desfosforilación de los enlaces fosfoéster o fosfoanhidro de la materia orgánica; las fitasas, actúan provocando la liberación de fósforo del ácido fítico; y las fosfonatasas y carbono-fósforo liasas pueden romper las uniones carbono-fósforo presentes en los organofosforados (Restrepo-Franco *et al.*, 2015). La principal actividad enzimática corresponde a las fosfatasas ácidas y a las fitasas, debido a la presencia en el suelo de los sustratos sobre los que actúan de forma predominante (Rodríguez *et al.*, 2006).

Los microorganismos del suelo participan en los diversos procesos que involucra el ciclo del fósforo, estos microorganismos permiten la transformación del P orgánico en sus formas inorgánicas mediante la solubilización y la mineralización (Banerjee *et al.*, 2010). La solubilización de fosfatos por microorganismos como bacterias, ha atraído la atención de los agricultores aplicándolos como inóculo del suelo para mejorar el crecimiento y rendimiento de las plantas (Chen *et al.*, 2006).

Las bacterias con capacidad de solubilizar fosfatos liberan ácidos orgánicos de bajo peso molecular, los grupos hidroxilo y carboxilo de estos ácidos permiten la quelatación de los cationes unidos al fosfato, convirtiéndolos de este modo a sus formas solubles (Chen *et al.*, 2006). Los principales mecanismos directos e indirectos, involucrados en la solubilización de fosfatos por microbios según Restrepo-Franco *et al.*, (2015) son los siguientes:

- a) Acidificación del medio: Liberación de protones ( $H^+$ ) o producción de ácidos inorgánicos fácilmente dissociables. Permite la disminución del pH del medio y la formación de hidrofosfatos de mayor solubilidad.
- b) Formación de complejos metálicos. Consiste en la liberación de ácidos orgánicos o complejos (quelantes), permitiendo la formación de complejos metálicos.
- c) Reducción de metales. Actividad redox de bacterias o sus exudados (metabolitos secundarios), permite la reducción de metales con estados de oxidación variable (ligados a fosfatos) a un bajo estado de oxidación (resultando en un fosfato más soluble).
- d) Disolución de fosfatos mediada por enzimas. Las bacterias producen enzimas específicas (fosfatasas), extracelulares que hidrolizan ésteres de fosfatos orgánicos liberando fosfatos inorgánicos.

e) Disolución indirecta de fosfatos. Las bacterias estimulan la exudación de ácidos orgánicos en la planta, propiciado la formación de complejos metálicos, esto se da por la interacción planta-microorganismo.

### **3.2.3. Bacterias productoras de auxinas**

Las bacterias de suelo llamadas RPCV, sintetizan diversas fitohormonas que son esenciales para el desarrollo y crecimiento de las plantas (Zhao, 2010), entre estas las auxinas, el etileno, el ácido abscísico, las citoquininas y las giberelinas (Kim *et al.*, 2011). Las auxinas son hormonas que se encuentran de forma natural en todas las plantas terrestres y en la asociación microorganismo-planta. Este grupo incluye compuestos como el ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido fenil acético y el ácido 4-cloroindol-3-acético (4CIAIA) (Nathan y Cohen 2015).

Las auxinas influyen directamente en el desarrollo de las plantas debido a que ejerce efectos benéficos en la elongación y división celular, la diferenciación de los tejidos y la dominancia apical (Duca *et al.*, 2014). Esta hormona juega un papel regulador en la arquitectura radical, en la filotaxia y en el desarrollo del fruto, ya que existe mayor captación de nutrientes por el aumento de los pelos radicales (Jusoh *et al.*, 2015).

Algunas cepas bacterianas que han sido estudiadas y caracterizadas por la producción de ácido indol acético son *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *actinomicetos*, *Enterobacter* (Couillerot *et al.*, 2013), *Pseudomonas aeruginosa*, *Kocuria turfanensis*, *K. flava*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* (Goswami, *et al.*, 2015), *B. megaterium*, *B. mucilaginosus*, *Azotobacter chroococcum*, (Sokolova *et al.*, 2011), *Azospirillum brasilense* (Meza *et al.*, 2015), *Serratia* sp. (Muller *et al.*, 2009), entre otras.

### **3.3. Las micorrizas**

#### **3.3.1. Definición y tipos de micorrizas**

El término micorriza, que etimológicamente significa “hongo-raíz”, fue propuesto por primera vez por el botánico Alemán A.B. Frank (1885) para definir a las asociaciones simbióticas entre las raíces de las plantas y el micelio de algunos hongos, en la que ambos resultan beneficiados: el hongo favorece las condiciones hídricas de la zona adyacente al sistema radical, incluyendo los nutrientes, y a cambio recibe carbohidratos de la planta (Honrubia, 2009). Existen más de 6000 especies de hongos micorrízicos, que están incluidas en los phylum Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota, los cuales se han registrado como hongos formadores de micorrizas y que se asocian a la mayoría de las plantas terrestres (Bonfante y Andra, 2009).

A pesar de presentar muchas similitudes en cuanto a la función y, en algunos casos, la morfología, se pueden reconocer cuatro tipos de micorrizas con base en la posición taxonómica de la planta y los tipos de hongos asociados, por lo que la distinción principal es entre endomicorrizas y ectomicorrizas. Las ectomicorrizas (ECM), son características de árboles y arbustos, las hifas permanecen extracelularmente e inducen cambios importantes en la morfogénesis radical modificando las células epidérmicas o corticales. Las endomicorrizas incluyen las arbusculares (HMA), ericoides, y micorrizas de orquídeas, las hifas penetran en las células de la raíz para establecer una simbiosis intracelular con la planta huésped (Bonfante y Andra, 2009).

Los hongos micorrízicos arbusculares pertenecen a un phylum monofilético, el Glomeromycota (Fitter *et al.*, 2011) y se encuentran en casi todos los ecosistemas terrestres

(Parniske, 2008). Colonizan las raíces por medio de hifas, penetran las estructuras celulares y forman apresorios característicos de esta simbiosis, denominados arbusculos, que se desarrollan dentro de las células corticales (intracelular); estas estructuras se consideran el principal sitio de intercambio de nutrientes entre los dos socios (Harrison, 2005).

Los hongos ectomicorrízicos producen un manto de hifas que cubren herméticamente la punta de la raíz, mientras que las células epidérmicas (en algunos casos también las corticales) se separan por el desarrollo de un laberinto de hifas conocidas como red de Harting, que aumenta la superficie de contacto con las células de la raíz; son característicos de árboles y arbustos de las familias Pinaceae, Betulaceae, Fagaceae y Dipterocarpaceae (Bending *et al.*, 2006).

En las micorrizas ericoides, la colonización es simple: el hongo se desarrolla dentro de las células de la epidermis, formando espirales que dan lugar a unidades independientes de infección. En las micorrizas de las orquídeas, los espirales se producen principalmente en las capas internas de la raíz (Smith y Read, 2008).

### **3.3.2. Simbiosis entre hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las plantas**

La simbiosis HMA-planta se estima que ocurre entre el 70-90 % de las especies de plantas terrestres, en ecosistemas agrícolas o naturales (Smith y Reed, 2008; Zhu *et al.*, 2010). Los HMA son simbiosiontes obligados y adquieren carbono de sus plantas hospederas para completar su ciclo de vida (Bago *et al.*, 2000). En cambio, el hongo proporciona diversos beneficios para la planta, incluyendo la nutrición mineral y tolerancia al estrés ocasionado por factores bióticos y abióticos (Sawers *et al.*, 2008).

La reproducción de los HMA sucede únicamente de forma asexual, aunque las hifas del hongo pueden modificarse por anastomosis (fusión de dos hifas), en el cual existe un intercambio de



su material genético. Sus estructuras reproductivas son las esporas asexuales y éstas pueden albergar cientos o miles de núcleos (Bonfante y Genre, 2010).

La colonización de las raíces por estos hongos se efectúa por medio de hifas. Las hifas se desarrollan de forma intracelular y pueden llegar a formar estructuras ramificadas llamadas arbusculos (Frey-Klett *et al.*, 2007; Imhob, 2009). Las hifas extrarradicales formadas funcionan como extensiones de la raíz favoreciendo la absorción de agua y minerales (Smith y Read, 2008). El micelio externo que forman estos microorganismos puede ampliar la extensión de las raíces de las plantas varios metros, explorar en forma más eficiente el suelo y formar agregados, los cuales ayudan a mantener la estructura y la aireación en el suelo (Bogeat-Triboulot *et al.*, 2004).

Los HMA pueden ser consumidos por otros organismos y probablemente son los principales componentes de las cadenas tróficas en el suelo, afectando positivamente las estructuras de las comunidades vegetales (van der Heijden *et al.*, 2008); factores del suelo como el pH y factores antropogénicos modifican la composición y estructura de las comunidades micorrízicas (Dumbrell *et al.*, 2010). Por ejemplo, el manejo de los cultivos mediante fertilizantes o herbicidas afecta la simbiosis micorrízica (Pasaribu *et al.*, 2011), causando disminución en la diversidad y abundancia de esporas (Oehl *et al.*, 2004).

La función de la simbiosis, mediante la cual el hongo transfiere fosfato y amonio para la planta y ésta provee de carbohidratos al hongo, se produce a través de la interface arbusculos-células corticales, principalmente para fósforo y nitrógeno (Guether *et al.*, 2009). El énfasis de esta simbiosis se encuentra en la translocación de P, N y C por medio del enlace suelo-hongo y hongo-planta. El P inorgánico (Pi) y la forma mineral u orgánica del N, tales como  $\text{NH}_4^+$ ,

$\text{NO}_3^-$  y aminoácidos (AA), son llevados a la planta por transportadores especializados localizados en la membrana fúngica del micelio extrarradical. Los transportadores de hexosa importan el carbón derivado de la planta hacia el hongo, pero aun no se han identificado las proteínas que participan en el transporte de estos nutrimentos (Bonfante y Genre, 2010).

### **3.3.3. Beneficios de los HMA en *Capsicum* sp.**

Diversos autores (Mena-Violante *et al.*, 2006; Kaya *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2011; Douds *et al.*, 2012) coinciden en que la inoculación de hongos formadores de micorriza en cultivares de chile, permite aumentar el desarrollo y crecimiento de las plantas respecto a aquellas que son cultivadas sin ningún inoculante de estos microorganismos. Los beneficios se reflejan en mayor producción de materia seca y mejor rendimiento en la producción de frutos, mejor absorción de nutrientes como P y N, mayor resistencia a factores ambientales adversos como la sequía, y mayor resistencia a organismos patógenos (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Efectos de la inoculación de HMA en el crecimiento de algunos cultivares de *Capsicum* spp.

HMA	Cultivares	VARIABLES con mejores respuestas respecto al testigo	Referencia
<i>G. fasciculatum</i> .	Poblano cv. San Luis.	Biomasa seca, peso y tamaño de fruto, contenido de clorofila y carotenoides.	Mena-Violante <i>et al.</i> , 2006.
<i>G. (mosseae, geosporum)</i> .	Bell pepper.	Biomasa seca, altura, contenido de P y N, producción de frutos.	Douds <i>et al.</i> , 2012.
<i>G. claroideum</i> .	Chile zazón o cacho de cabra.	Biomasa seca, altura, área foliar, calidad de fruto.	Castillo <i>et al.</i> , 2009.
<i>G. (mosseae e intraradices)</i> .	<i>C. annuum</i> L. cv. Cumaovas1.	Biomasa seca, altura, resistencia a salinidad, producción de Superoxido dismutasa, contenido relativo de agua, contenido de P.	Cekic <i>et al.</i> , 2012.
<i>G. clarum</i> .	<i>C. annuum</i> cv. 11B 14.	Biomasa seca, número de frutos, producción de clorofilas y prolinas, contenido de N, P, K y Na.	Kaya <i>et al.</i> , 2009.
<i>G. (etunicatum y clarum)</i> .	<i>C. annuum</i> L. cv. Demre sivrisi.	Biomasa seca, contenido de P y Zn.	Ortas <i>et al.</i> , 2011.
<i>A. longula</i> + <i>Glomus</i> sp.	<i>C. annuum</i> L.	Altura, contenido de N, P, K, Ca, Mg y micronutrientes.	Kim <i>et al.</i> , 2010.
<i>G. intraradices</i> .	<i>C. annuum</i> L. var. Aviculare.	Germinación de semillas, altura, resistencia a salinidad.	Rueda-Puente <i>et al.</i> , 2010.
<i>G. intraradices</i> y <i>G. margarita</i> .	Karaisali, serrano, Cayenne L.S.	Altura, biomasa seca, contenido de P.	Sensoy <i>et al.</i> , 2007.
<i>A. + E. + G. + S.</i>	<i>C. frutescens</i> L.	Altura, floración, olor del fruto.	Boonlue <i>et al.</i> , 2012.

*G* = *Glomus*, *A* = *Acaulospora*, *Gi* = *Gigaspora*, *S* = *Scutellospora*, *E* = *Entrophospora*.

### 3.3.3.1. Interacción de los HMA y los nutrimentos

Las raíces de las plantas de Chile generalmente forman asociaciones simbióticas con los hongos micorrízicos arbusculares (Davies *et al.*, 1992). Estas asociaciones micorrízicas, han demostrado ser benéficas para la planta huésped mediante el aumento de la absorción de nutrimentos, particularmente fósforo (P), nitrógeno (N) y potasio (K) (Perner *et al.*, 2007), así como de elementos menores como zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe), azufre (S), calcio (Ca) (Allen, 2009), Magnesio (Mg) y Boro (Subramanian *et al.*, 2006; Altomare y Tringovska, 2011).

Los HMA mejoran indirectamente las propiedades del suelo mediante el micelio del hongo, el cual aumenta el volumen de exploración, principalmente de aquellos poros demasiado pequeños, en donde las raíces no pueden llegar (Cho *et al.*, 2009), aumentando la absorción de agua y la mineralización de P orgánico por la producción de fosfatasa; además, favorece la colonización radical por RPCV (Marschner, 2007). Por otra parte, los micelios mejoran la estabilidad de los agregados mediante la producción de glomalina (Cavagnaro *et al.*, 2006; Kahiluoto *et al.*, 2009).

En climas áridos y semiáridos la movilidad de los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en el suelo es significativamente reducida y, por lo tanto, la inoculación de hongos formadores de micorriza hace más efectiva la absorción y asimilación del N inorgánico en estas condiciones (Hodge y Fitter, 2010). McFarland *et al.* (2010), indican que más del 50 % del nitrógeno requerido en la planta es abastecido por la simbiosis arbuscular.

La eficiencia de los HMA está determinada por la cantidad de fosfatos que se encuentran en el suelo, ya que estos microorganismos trabajan eficientemente cuando en la solución del suelo

hay bajos contenidos de fósforo (Javaid, 2009). Por otra parte, las simbiosis HMA es afectada por las adiciones externas de nutrientes al suelo, como P, N, y Zn (Wu *et al.*, 2007; Cavagnaro, 2008). Diversos estudios han encontrado que la inoculación de diferentes especies de HMA en *Capsicum annuum* (Mena-Violante *et al.*, 2006; Sensoy *et al.*, 2007; Ortas *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010) y *C. frutescens* (Boonlue *et al.*, 2012) permiten mayor absorción de elementos nutritivos por las plantas.

### **3.3.3.2. Mecanismos de protección contra enfermedades**

La simbiosis que establece la planta con los HMA es también una estrategia de supervivencia de la planta en presencia de organismos patógenos del suelo, aunque involucrados no son bien conocidos, diversos autores coinciden en que la inhibición de patógenos y la resistencia de la planta hacia estos organismos se debe principalmente a la producción de sustancias ácidas tóxicas, enzimas y sideróforos que producen ambos simbiontes (Alejo-Iturbide *et al.*, 2008; Haselwandter, 2008).

La inoculación con HMA en cultivares de *Capsicum* puede generar resistencia a diversas enfermedades radicales (Lioussanne *et al.*, 2009) y foliares (Felle *et al.*, 2009) que atacan a las plantas; además, permiten mayor tolerancia a patógenos de las raíces (Elsen *et al.*, 2008). El papel de los HMA como reductores de las enfermedades se han estudiado en diversos cultivares de *Capsicum*; por ejemplo, Ozgonen y Erkili (2007) estudiaron la incidencia de *Phytophthora capsici* en *Capsicum annuum* cv. Charleston, en presencia de diferentes HMA, observándose disminución en los daños ocasionados por el patógeno.

En Chile poblano, también se ha estudiado la incidencia de *P. capsici* y se ha demostrado que la enfermedad causada por este hongo disminuye cuando se inocula con *G. fasciculatum*,

debido a compuestos tóxicos y enzimas producidos durante las primeras etapas de la colonización, como son enzimas antioxidantes ( $H_2O_2$ ), especies reactivas de oxígeno (ERO), aumento en la actividad superóxido dismutasa (SOD) y la peroxidasa (POX) (Alejo-Iturbide *et al.*, 2008).

### **3.3.3.3. Resistencia a condiciones ambientales adversas**

Los hongos formadores de micorriza como *Glomus*, mejoran el desempeño de las plantas bajo condiciones de sequía (Álvarez *et al.*, 2009), permiten mayor adaptación a suelos salinos (Sheng *et al.*, 2008; Evelin *et al.*, 2009) y a suelos alcalinos (Labidi *et al.*, 2011). Las condiciones cálidas del suelo alteran la actividad de los HMA, pues generalmente la colonización de raíces disminuye a temperaturas mayores de 30 °C (Bowen, 1987) y temperaturas superiores a 40 °C suelen ser letales para los HMA (Bendavid Val *et al.*, 1997). Martin y Stutz (2004), estudiaron los efectos de los HMA en el cultivo de pimiento (*C. annuum* L.) bajo diferentes temperaturas, encontrando menor colonización por HMA, menor crecimiento de las plantas y menor absorción de fosfatos cuando las temperaturas eran altas (32-38 °C).

En otros trabajos se ha estudiado el efecto de los HMA en las plantas bajo condiciones de sequía; por ejemplo, Mena-Violante *et al.*, (2006) al inocular especies de *Glomus* en chile poblano (*Capsicum annuum* L. cv San Luis), observaron mayor crecimiento y rendimiento de la planta, incremento en la calidad del fruto (alto, ancho, longitud del pedicelo) y mejor coloración del mismo por altas concentraciones de clorofila y carotenoides en comparación con plantas no inoculadas.

Los estudios sobre el efecto de la inoculación de HMA en cultivos indican que en las plantas micorrizadas se incrementa la conductividad del agua existente en el suelo hacia el sistema radical y además la simbiosis ayuda a que el índice de transpiración se reduzca cuando la planta se encuentra estresada por la sequía (Aroca *et al.*, 2008). Así mismo, la respuesta de la planta a condiciones de sequía parece estar relacionada con su capacidad para regular la producción de ácido abscísico, el cual permite un equilibrio más adecuado entre la transpiración foliar y el movimiento del agua hacia las raíces (Aroca *et al.*, 2008).

La salinidad es otro de los problemas que afecta los cultivares de Chile, algunos estudios indican que la inoculación con HMA aumenta la resistencia de las plantas a condiciones de salinidad (Al-Khaliel, 2010). Cekic *et al.*, (2012) encontraron que la inoculación de *Glomus mosseae* y *G. intraradices* mejora el crecimiento y rendimiento de *C. annuum* cv. Cumaovas1 cultivado en condiciones salinas, debido a que estos microorganismos permiten mayor absorción y concentración de P en la planta, ayudan a utilizar el agua eficientemente, acumulando mayor contenido de humedad provocando mayor producción de enzimas benéficas como el superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascórbico peroxidasa y enzimas reductasas.

#### **3.4. Interacción HMA-RPCV**

La interacción entre RPCV y HMA ha sido ampliamente estudiada, principalmente por los efectos benéficos que estas proporcionan a las plantas cuando ambos microorganismos son inoculados, pues producen como resultado una mayor sanidad y crecimiento de las mismas (Barea *et al.*, 2005; Bending *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Armada *et al.*, 2015). Estas interacciones ocurren en la zona del suelo que rodea la raíz y el micelio fúngico conocido

como micorrizósfera (Artursson *et al.*, 2006). Los mecanismos por los cuales ocurre la interacción entre estos microorganismos aún no son bien conocidos, pero se han proporcionado elementos que indican la importancia de esta asociación en el que ambos organismos se benefician para desarrollarse (Nadeem *et al.*, 2014).

En algunos casos se han descrito la vía de como se da la interacción, por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens* tiene la capacidad de producir polisacáridos extracelulares que le dan alta habilidad para adherirse en la superficie de los HMA y en las raíces de las plantas (Bianciotto *et al.*, 2001). Las bacterias endosimbiontes y de vida libre pueden asociarse intracelularmente a las micorrizas; es decir, penetran y viven dentro de los hongos micorrízicos. Así, *Paenibacillus validus* es altamente eficiente al mantener el crecimiento y germinación de esporas en *Glomus intraradices* sin la presencia de plantas, posiblemente por liberar rafinosa y un trisacárido aún no identificado (Hildebrandt *et al.*, 2006).

Los HMA favorecen la interacción benéfica entre las bacterias, el suelo y las raíces de las plantas (Singh *et al.*, 2008). *Glomus mosseae* favorecen el crecimiento de diversos géneros bacterianos, ya que aquéllas propician el medio adecuado para el crecimiento de las bacterias debido a la producción exudados miceliales (Toljander *et al.*, 2007). Por ello, los hongos se consideran vectores o medios de transporte de las comunidades bacterianas (Kohlmeier *et al.*, 2005).

Algunas bacterias pueden favorecer la colonización por HMA, estas son llamadas bacterias ayudantes de micorrización (BAM). Los mecanismos de las BAM se basan en la producción de factores de crecimiento, que estimulan la germinación de esporas y el desarrollo micelial en los HMA (Frey-Klett *et al.*, 2007). La inoculación con BAM de los géneros *Bacillus*,



*Pseudomonas*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* y *Rhodococcus* inducen mayor colonización por HMA (Bending *et al.*, 2006). *P. putida* promueve la micorrización por *Gigaspora rosea* en plantas de pepino (*Cucumis sativus*), debido a que la bacteria produce la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxil (ACC) desaminasa (Gamalero *et al.*, 2008).

En adición, el uso de inóculos a base de HMA como *Glomus* sp. más RPCV como *Azospirillum* sp., *Pseudomonas* sp. y *Rhizobium* sp., permite mejorar el desempeño de las plantas al producir un mejor crecimiento (Bending *et al.*, 2006). Esta asociación ejerce influencia directa en el crecimiento de las plantas al mejorar la asimilación de nutrientes (Barea *et al.*, 2005), inhibiendo los hongos patógenos y permitiendo mayor desarrollo radical (Artursson *et al.*, 2006).

Diversos estudios han encontrado que además de los efectos en planta, cuando se inoculan de manera combinada éstos microorganismos, ambos resultan beneficiados favoreciendo su desarrollo y establecimiento en el sistema radical. Así por ejemplo, la inoculación combinada de *Bacillus pabuli* con *G. clarum* (Xavier y Germida, 2003), *Paenibacillus* sp. (Budi *et al.*, 1999) o *Pseudomonas* sp. (Barea *et al.*, 1998) con *G. mosseae* y *Pseudomonas* sp. con *G. versiforme* (Mayo *et al.*, 1986) o *Endogone* sp. (Mosse, 1962), inducen mayor germinación de esporas y mayor colonización radical por los HMA, mientras que la interacción de *G. intraradices* con cualquiera de las rizobacterias *B. subtilis*, *Enterobacter* sp. (Toro *et al.*, 1997), *P. aeruginosa* o *P. putida* (Villegas y Fortin, 2002), además de los beneficios anteriores permiten mayor solubilización de fosfatos por parte de las cepas bacterianas.

#### **IV. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLÁNTULAS DE CHILE POBLANO (*Capsicum annuum* L.)**

##### **RESUMEN**

Se colectaron muestras de suelo rizosférico en nueve sitios donde se cultiva chile poblano en la región de la Sierra Nevada en Puebla, México. De las muestras colectadas se aislaron cepas de rizobacterias con el fin de estudiar su capacidad para promover el crecimiento de plántulas de chile poblano. Se cuantificaron bacterias totales, solubilizadoras de fosfato (BSP), fijadoras de nitrógeno (BFN) y productoras de auxinas (BPA). La selección de las mejores cepas de BSP se realizó mediante la cuantificación de fosfato soluble; las cepas de BPA que dieron positivo al reactivo de Salkowski en cajas Petri fueron evaluadas por producción de indoles; cepas de BFN fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en ausencias de nitrógeno disponible en el medio de Rennie. Las mejores cepas con características para promover crecimiento fueron identificadas a nivel molecular y con ellas se estableció un experimento en plantulas de chile poblano. Se aislaron un total de 74 cepas que solubilizan fosfatos, 70 fijadoras de nitrógeno y 71 cepas que producen ácido indol acético. Las BSP correspondieron a *Serratia plymuthica* (CPPC1, CPPC3, CPPC4) y *S. marcescens* (CPPC2); las BPA pertenecieron a *Agrobacterium vitis* (CPPC5), *Arthrobacter* sp. (CPPC6), *Bacillus simplex* (CPPC7) y *S. liquefaciens* (CPPC8), y las cepas de BFN fueron identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* (CPPC9) y *S. marcescens* (CPPC10). Los efectos de las cepas en el crecimiento de las plántulas de chile poblano fueron estadísticamente significativos (Tukey  $p \leq 0.05$ ) y los mejores efectos se encontraron con la inoculación de las cepas identificadas como *A. vitis* y *S. plymuthica* ya que se observaron incrementos en altura (15 y 23 %), área foliar (34 y 30 %) y biomasa seca (11 y 26 %) respecto a las plantas no inoculadas.

**Palabras clave:** Solubilización de fosfatos, producción de auxinas, microorganismos, crecimiento de plántula, *Serratia plymuthica*, *Agrobacterium vitis*.

#### **IV. CHARACTERIZATION AND SELECTION OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA IN POBLANO PEPPER SEEDLINGS (*Capsicum annuum* L.)**

##### **ABSTRACT**

Rhizospheric soil samples were collected in nine field sites of poblano pepper at the region of the Sierra Nevada in Puebla, Mexico. From the samples, rhizobacteria strains were isolated in order to study their ability to promote growth of poblano seedlings. Total bacteria, phosphate solubilizing bacteria (PSB), fixing nitrogen bacteria (FNB) and auxin production bacteria (APB) were quantified. The selection of the best strains of BSP was performed by quantification of soluble phosphate; strains of APB that were positive in petri plates incubated with the Salkowski reagent were evaluated for indole production; strains of NFB were selected by their ability to grow in absence of available nitrogen in Rennie medium. The best rhizobacteria strains with growth promoting characteristics were identified at molecular level and with them an experiment in poblano pepper seedlings was established. A total of 74 solubilizing phosphate strains, 70 nitrogen fixing strains and 71 producing auxin strains were isolated. The best strains of SPB corresponded to *Serratia plymuthica* (CPPC1, CPPC3, CPPC4) and *S. marcescens* (CPPC2); the APB belong to *Agrobacterium vitis* (CPPC5), *Arthrobacter* sp. (CPPC6), *Bacillus simplex* (CPPC7) and *S. liquefaciens* (CPPC8) and the strains of BFN were identified as *Stenotrophomonas maltophilia* (CPPC9) and *S. marcescens* (CPPC10). The effect of the rhizobacterial strains on poblano pepper seedlings were statistically significant (Tukey  $p < 0.05$ ), and the best effects were found with the inoculation of the strains CPPC5 and CPPC4 which increased height (15 and 23 %), leaf area (34 and 30 %) and dry biomass (11 and 26 %) compared to non-inoculated plants.

**Keywords:** Phosphate solubilization, auxin production, microorganisms, seedling growth, *Serratia plymuthica*, *Agrobacterium vitis*.

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annum* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia económica dentro de la horticultura, pues se ubica en sexto lugar entre las hortalizas más producidas a nivel mundial con 31.6 millones de toneladas, superado por el tomate (*Solanum lycopersicum*), la cebolla (*Allium cepa*), el col (*Brassica oleracea*), el pepino (*Cucumis sativus*) y las berenjenas (*Solanum melongena*) (FAOSTAT, 2016). China es el principal productor mundial con más de 16 millones de toneladas producidas en el 2012, mientras que México ocupó el segundo lugar con más de dos millones de toneladas (FAOSTAT, 2016).

El establecimiento del cultivo de chile utilizando trasplantes es muy común (Russo y Perkins-Veazie, 2010) y se realiza con el objeto de garantizar la supervivencia de las plantas en campo, garantizar la sanidad y mejorar el rendimiento (Ruso, 2004). La calidad de plántulas depende de factores como el tipo de sustrato a utilizar (Puerta *et al.*, 2012), nivel adecuado de nutrimentos (Gravel *et al.*, 2012), disponibilidad de riego y manejo apropiado de plagas y enfermedades, los cuales tienen un efecto negativo importante en el rendimiento final del cultivo (Guzmán y Sánchez, 2003).

En la región de la Sierra Nevada de Puebla, la producción de chile Poblano ha disminuido por la mala calidad de plántulas producidas (García *et al.*, 2011), ya que en almácigos a cielo abierto la incidencia de plántulas enfermas por hongos patógenos llega a ser de 29 % y constituyen una fuente de inóculo que los agricultores transfieren al campo durante el trasplante (González *et al.*, 2004). Las pérdidas del cultivo en almácigos, invernadero y campo son atribuidas al “damping off”, enfermedad conocida localmente como “secadera”, causada por un complejo de hongos fitopatógenos de las raíces, entre los que se encuentra

*Phytophthora capsici*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp. (Sharma *et al.*, 2007; Alejo-Iturvide *et al.*, 2008).

Actualmente se ha considerado la importancia de utilizar rizobacterias promotoras del crecimiento en la producción de cultivos con el objetivo de bioaumentar el desarrollo y sanidad de plantas (Artursson *et al.*, 2006). Las rizobacterias no sólo proporcionan beneficios en el crecimiento de las plantas, sino que también las protegen contra los patógenos del suelo cuando se inoculan en etapas tempranas de desarrollo (Kloepper *et al.*, 2004). Además, la inoculación de plántulas en semilleros resulta más rentable y más práctica si se compara con la inoculación en grandes contenedores o directamente en campo.

Las rizobacterias poseen varios mecanismos para promover el crecimiento de las plantas, entre los que se incluye un aumento de la movilización de nutrimentos, mejoramiento en la absorción de nutrientes, control biológico de patógenos y producción de hormonas del crecimiento vegetal (Bais *et al.*, 2006; De-Bashan *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2009). Además pueden ser inoculadas en plantas de manera selectiva para aumentar la sanidad y reducir el uso de productos químicos (Artursson *et al.*, 2006; Arguelles-Arias *et al.*, 2009).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento permiten la liberación de nutrimentos al descomponer la materia orgánica, transforman el N orgánico en sus formas inorgánicas disponibles para las plantas y algunas poseen la capacidad de fijar N atmosférico y solubilizar fosfatos (Altomare y Tringovska, 2011). Además, sintetizan sustancias reguladoras del crecimiento como giberelinas, citoquininas y auxinas y estimulan la densidad y longitud de pelos radicales, con lo que incrementan la capacidad de absorción de agua y nutrientes, lo cual resulta en mayor crecimiento y adaptación a condiciones de sequía, acidez y alcalinidad

(Sandhya *et al.*, 2010; Saraf *et al.*, 2010). Algunas cepas de rizobacterias pueden actuar como agentes de control biológico de patógenos mediante el antagonismo que ejercen sobre dicho microorganismos; también inducen la resistencia sistémica en las plantas al producir enzimas como la fenilalanina amonio-liasa y la peroxidasa, esta última permite lignificar y generar peróxido de hidrógeno, inhibiendo patógenos o generando efectos antimicrobianos (Sharma *et al.*, 2007).

Géneros de rizobacterias como *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter* y *Azotobacter* (Glick *et al.*, 2007; Joseph *et al.*, 2007; Nadeem *et al.*, 2010), causan un incremento significativo en el crecimiento de las plantas debido a mecanismos directos e indirectos como son: fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, ácidos orgánicos y enzimas como la ACC-deaminasa, quitinasa y glucanasa (Berg, 2009; Hayat *et al.*, 2010).

Las rizobacterias diazotróficas como *Azospirillum*, *Derxia*, *Pseudomonas*, *Beijeirenckia*, *Azotobacter* y *Entherobacter* promueven el crecimiento vegetal a través de la síntesis de hormonas del crecimiento vegetal y la inhibición de patógenos mediante la secreción de sustancias antibióticas (Ferrera y Alarcón, 2001). La inoculación con *Pseudomonas mendocina* en cultivos de lechuga permite aumentar la estabilidad de los agregados del suelo (Barassi *et al.*, 2007) y en los cultivos de zanahoria y cebolla incrementa la germinación, el crecimiento y reduce la incidencia de *Alternaria* sp. (Bennett *et al.*, 2009). *Pseudomonas fluorescens* en plántulas de pepino mejora el crecimiento (Gamalero *et al.*, 2008).

En *Capsicum annum* se ha estudiado el efecto de *Ochrobactrum lupini*, *Novosphingobium pentaromativorans* (Hahm *et al.*, 2012), *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. (Datta *et al.*, 2011),

*Pseudomonas fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. aeruginosa*, *Mesorhizobium ciceri*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium gallicum* (Sharma et al., 2007), encontrándose efectos benéficos en el crecimiento, germinación, y resistencia a diversas enfermedades causadas por *Xanthomonas* sp., *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas* sp., *Fusarium* sp., *Pythium* y *Phytophthora* spp. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el potencial de cepas de rizobacterias, colectadas en terrenos de productores en la Sierra Nevada de Puebla y aisladas de la rizósfera de chile poblano (*Capsicum annum* L.), para promover el crecimiento de plántulas en este cultivo.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Aislamiento y selección de cepas de rizobacterias colectadas en la rizósfera de chile poblano**

#### **4.2.1.1. Colecta de suelo rizosférico**

En septiembre del 2012 se colectó suelo rizosférico de chile poblano en nueve sitios de la región de la Sierra Nevada en el estado de Puebla, México. El muestreo se llevó a cabo en localidades con parcelas establecidas de chile poblano en tres municipios: San Matías Tlalancaleca, San Lorenzo Chiautzingo y Huejotzingo (Figura 4.1). Los nueve sitios muestreados presentaron alturas que van de 2284 a 2467 msnm, siendo el sitio uno el de mayor altitud y el nueve con la altitud más baja. Se colectaron cuatro muestras por sitio seleccionadas al azar, obteniendo un total de 36 muestras, que se conservaron en una hielera para su traslado al laboratorio de Microbiología del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, ubicado en Texcoco, Estado de México.

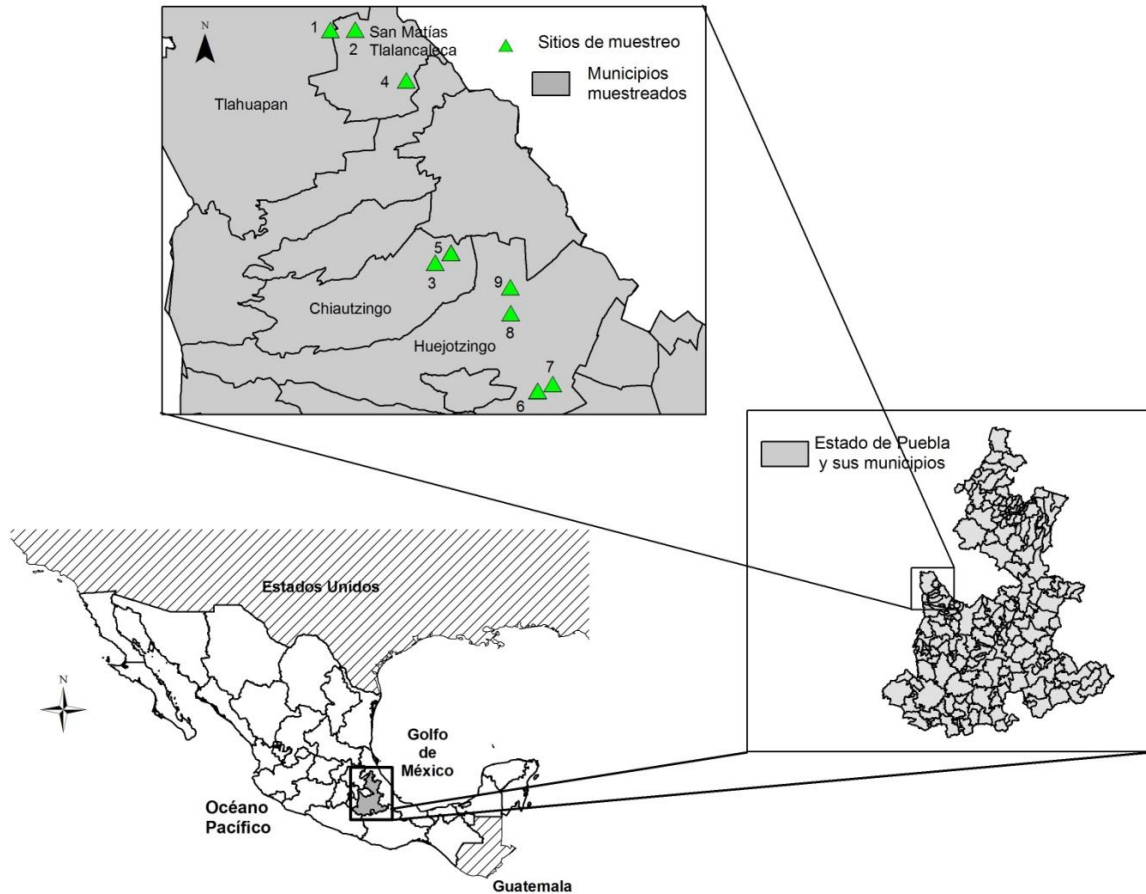


Figura 4.1. Ubicación geográfica de los nueve sitios donde se colectaron muestras de suelo rizosférico de chile poblano en la Sierra Nevada, estado de Puebla, México.

Las características del suelo colectado en los nueve sitios se presentan en el Cuadro 4.1. Los valores de pH (suelo, agua 1:2) fluctuaron entre 4.86 a 7.56. Los más altos contenidos de materia orgánica (MO) y nitrógeno total (NT) fueron encontrados en los sitios 4 y 8, los cuales se localizaron entre 2414 y 2286 msnm. El sitio siete presentó un alto contenido de fósforo ( $428.8 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) y el sitio cuatro presentó altos contenidos de K, Mg y Fe ( $854$ ,  $752$  y  $126.7 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) y alta capacidad de intercambio catiónico (CIC) con  $12.3 \text{ [Cmol (+) Kg}^{-1}]$ . La textura del suelo fue clasificado como franco arenoso (FA) en los sitios 1, 3, 4 y 5; franco



arcillo arenoso (FAA) para el sitio dos; y arena francoso (AF) para los sitios de altitud más baja (sitios 6, 7, 8 y 9).

Cuadro 4.1. Características de los suelos colectados en nueve sitios cultivados con chile poblano en la Sierra Nevada, estado de Puebla, México.

Características	Sitios								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	5.48	5.82	6.85	6.88	4.86	5.8	6.75	7.33	7.56
MO (%)	0.27	0.54	0.94	1.48	0.27	0.40	0.94	1.48	0.67
NT (%)	0.01	0.03	0.05	0.07	0.01	0.02	0.05	0.07	0.03
N (mg Kg <sup>-1</sup> )	24.1	12.1	19.3	9.6	28.9	19.3	26.5	19.3	12.1
P (mg Kg <sup>-1</sup> )	184.7	224.0	153.7	314.5	187.1	41.5	428.8	50.1	44.3
K (mg Kg <sup>-1</sup> )	412	324	546	854	242	266	508	430	410
Mg (mg Kg <sup>-1</sup> )	399	232	444	752	185	206	180	288	300
Fe (mg Kg <sup>-1</sup> )	48.5	60.8	33.3	126.7	78.5	38.7	78.5	37.7	42.4
CIC [Cmol (+) Kg <sup>-1</sup> ]	10.8	11.4	11.6	12.3	4.8	5.2	6.4	6.9	6.1
Arena (%)	58.8	54.8	66.8	60.8	76.8	82.8	76.8	80.8	82.8
Limo (%)	22	24	20	26	14	8	16	14	12
Arcilla (%)	19.3	21.2	13.2	13.2	9.2	9.2	7.2	5.2	5.2
Textura	FA	FAA	FA	FA	FA	AF	AF	AF	AF
Altitud (msnm)	2467	2453	2425	2414	2404	2313	2292	2286	2284

Textura FA = Franco Arenoso, FAA = Franco Arcillo Arenoso, AF = Arena Francoso.

#### 4.2.1.2. Cuantificación de rizobacterias promotoras de crecimiento

Las muestras colectadas fueron procesadas en campana de flujo laminar en condiciones de asepsia. Se pesaron 10 g de cada muestra y se depositaron en botellas con 90 mL de agua destilada estéril (primera dilución) y a partir de ésta se hicieron diluciones decimales seriadas (hasta 10<sup>-4</sup>). Se sembró en cajas petri 0.1 mL de cada dilución y la alícuota fue distribuida

sobre la superficie del medio de cultivo sólido con ayuda de una varilla de vidrio en forma de L. Se usaron medios de cultivos específicos: Agar nutritivo para bacterias totales (BT); Pikovskaya, para detectar bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSP); Rennie, para fijadoras de nitrógeno (BFN); y Luria-Bertani (LB), para bacterias productoras de auxinas (BPA). Las colonias se cuantificaron después de tres días de incubación a 28 °C.

En el caso particular de BPA y una vez que se tuvo crecimiento de colonias, el 50 % de ellas se sembraron por duplicado en microplacas de 96 pozos que contenían 150 µL de medio líquido LB, con el fin de determinar el número de colonias que producen indoles. Las microplacas se incubaron por 48 h. y posteriormente se agregaron 150 µL de reactivo Salkowski a cada pozo de una microplaca y se incubó en oscuridad por 30 minutos adicionales; el cambio de coloración a rosa fue el indicativo de producción de indoles, por lo que se contaron los pozos que dieron positivo. De la segunda replica y sin reactivo Salkowski, se aislaron cepas de las colonias que resultaron positivas en la producción de indoles.

La capacidad promotora de crecimiento de las cepas se evaluó de acuerdo a la metodología propuesta por Díaz *et al.* (2009). En el caso de bacterias solubilizadoras de fosfatos se realizó una preselección de cepas con base en las colonias que presentaron un halo alrededor de ellas, de las cuales se aislaron cepas y se preservaron en agar nutritivo hasta su evaluación. Las cepas posteriormente se cultivaron en medio líquido Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) por 7 días en agitación y se cuantificaron los fosfatos solubilizados.

Los tubos eppendorf se llenaron con 1 mL de cultivo bacteriano y se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos. Del sobrenadante obtenido de cada tubo se tomaron alícuotas de 200 µl y

se colocaron en microplacas de poliestireno marca Costar (Corning Incorporated, NY), después se les adicionaron 100 µl de solución de vanadato ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$  0.25 % en 35 %  $\text{HNO}_3$ ) y 100 µl de solución de molibdato [ $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$  en 5 % en agua]. Las muestras se dejaron en reposo durante 5 minutos hasta que desarrollaron un color rojizo y posteriormente se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro a 420 nm.

Los cálculos para la determinación de fosfato soluble se obtuvieron a partir de una curva estándar, la cual se elaboró con diferentes concentraciones de fosfato (0, 20, 40, 60, 100, 150, 200, 250 y 300 µg/mL), que fueron procesadas de la misma forma que los extractos bacterianos.

En las rizobacterias productoras de indoles se realizó también una preselección de cepas considerando únicamente la evaluación cualitativa de cambio de color a rosa intenso al adicionar el reactivo de Salkowski a los cultivos en las microplacas. Las cepas preseleccionadas fueron sembradas en medio de cultivo líquido Luria-Bertani y se mantuvieron en agitación durante 4 días; posteriormente se pasó un mL de cada muestra a tubos Eppendorf y se centrifugó por 20 minutos a 5000 rpm. Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 150 µl y fueron colocadas en microplacas, a las cuales se les adicionaron 100 µl de reactivo Salkowski (2 % 0.5 M  $\text{FeCl}_3$  en 35 % de ácido perclórico). Las muestras fueron incubadas por 30 minutos en oscuridad y después se procedió a tomar las lecturas en el espectrofotómetro a una absorbancia de 530 nm. La producción de indoles se cuantificó mediante una curva estándar usando diferentes concentraciones de ácido indolacético que fueron de 0, 10, 15, 20, 25,30, 40 y 50 µg/mL.

#### **4.2.1.3. Actividad antagónica de las rizobacterias**

Se realizaron pruebas de confrontación entre bacterias promotoras de crecimiento vegetal (fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo y productoras de auxinas) y hongos fitopatógenos del suelo que causan la pudrición radical, aisladas en plantas de chile poblano, principalmente *Fusarium* sp. y *Phytophthora capsici*. Para estas pruebas, primero se reactivaron las cepas bacterianas en medio Agar Nutritivo, posteriormente ambos microorganismos fueron sembrados en cajas petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) a una distancia de 4 cm entre microorganismos. Después de 24 horas de haber sembrado la bacteria, se sembró el patógeno, éste consistió en un disco con micelio del hongo cultivado previamente en PDA y un diámetro de 0.5 cm; se incubaron a 28 °C entre 8 y 11 días después, teniendo cuatro repeticiones por cepa, incluyendo los testigos (patógeno sin bacteria). Para evaluar el porcentaje de inhibición del hongo por las rizobacterias se aplicó la fórmula propuesta por Yu *et al.*, (2011);

$$\% \text{ inhibición} = (1 - \text{diámetro de la cepa} / \text{diámetro control}) (100)$$

#### **4.2.2. Identificación molecular**

Se extrajo el material genético de biomasa equivalente a siete colonias de las cepas a partir de cultivos jóvenes de 24 h con el sistema comercial de extracción EZ-10 Spin® Column Bacterial DNA mini-preps kit (Bio Basic Inc., Canadá). Se realizó la amplificación de un fragmento de  $\approx 1500$  pb del gen 16S rDNA para realizar la asignación de identidad de manera confiable hasta nivel de género y especie. Los iniciadores empleados para la amplificación del gen 16S rDNA fueron el 27f (forward) 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' y el 1492r (reverse) 5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3' (Frank *et al.*, 2008). La mezcla de

reacción de amplificación fue con 1X de regulador de PCR, 2 mM de dNTP's, 0.2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 μM de cada iniciador y 0.05 u/μL, en un volumen final de 25 μL. Se utilizó el programa de termociclador con una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, 30 ciclos de: desnaturalización por 1 min a 94 °C, alineación de 1 min a 57 °C, y extensión de 1.5 min a 72 °C, se utilizó una extensión final a 72 °C por 7 min.

Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5 % y 100 V, se tiñeron con Green-DNA Dye (BIO BASIC INC., Canadá) para visualizar en una transiluminador. Los productos de PCR se purificaron con el sistema comercial de purificación Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, USA), siguiendo las indicaciones de uso del fabricante. Los amplicones purificados fueron enviados al servicio de secuenciación MACROGEN, Corea. Las secuencias fueron editadas con los programas BioEdit versión 7.0.9.0 (Hall, 1999) y Seaview versión 4.0 (Galtier *et al.*, 1996) y la construcción de los árboles filogenéticos se hizo con el programa MEGA versión 6.0 (Tamura *et al.*, 2013); con las secuencias se realizó un análisis en la plataforma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para la búsqueda de genes homólogos, se consideraron los criterios de Rosselló-Mora y Amann (2001) para la asignación a nivel de especie con porcentajes de identidad mayores al 97 % y de género del 95-96 %, y porcentajes de cobertura mayores al 85 %.

Se estableció la filogenia en el programa MEGA versión 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) con una minería de secuencias del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) obtenidas del análisis MegaBLAST (Morgulis *et al.*, 2008) para corroborar la identidad mediante la concordancia de la topología y la identidad del BLAST para cada una de las secuencias de las cepas. Se construyó un árbol filogenético con las secuencias de las cepas y una minería de secuencias de microorganismos asociados a la promoción del crecimiento vegetal, se usó un

alineamiento múltiple del programa ClustalX versión 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) en el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

### **4.2.3. Efectividad de las rizobacterias en la promoción del crecimiento en plántulas de chile poblano**

#### **4.2.3.1. Preparación del inóculo a base de rizobacterias**

Se incluyeron 11 cepas de bacterias para evaluar sus efectos en la promoción de crecimiento, diez de las cuales fueron seleccionados en laboratorio por su capacidad para solubilizar fosfatos, producir auxinas y fijar nitrógeno. Las cepas bacterianas se cultivaron en caldo nutritivo en agitación constante por 3 días a 28 °C con el objeto de obtener una alta concentración de bacterias por mL<sup>-1</sup>. Se compararon con dos testigos: uno sin inocular y otro que consistió en una cepa bacteriana identificada como *Bacillus pumillus* con probada capacidad para promover crecimiento. Cuatro de las diez cepas utilizadas poseen capacidad para solubilizar fosfatos, cuatro más producen ácido indolacético y dos son fijadoras de nitrógeno (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Cepas aisladas de suelo rizosférico y seleccionadas para el experimento en plántulas de chile poblano, en Montecillo, Texcoco estado de México.

Cepas	Identificación	Características	UFC/mL de caldo nutritivo
Testigo	Sin inocular	- - -	0
R44	<i>Bacillus pumillus</i>	BSP	13.68 x 10 <sup>9</sup>
CPPC1	<i>Serratia plymuthica</i>	BSP, inhibe <i>Fusarium</i> sp. y <i>P. capsici</i>	6.87 x 10 <sup>8</sup>
CPPC2	<i>S. marcescens</i>	BSP, inhibe <i>Fusarium</i> sp. y <i>P. capsici</i>	15.44 x 10 <sup>9</sup>
CPPC3	<i>S. plymuthica</i>	BSP, inhibe <i>Fusarium</i> sp. y <i>P. capsici</i>	1.08 x 10 <sup>9</sup>
CPPC4	<i>S. plymuthica</i>	BSP, inhibe <i>Fusarium</i> sp. y <i>P. capsici</i>	3.99 x 10 <sup>9</sup>
CPPC5	<i>Agrobacterium vitis</i>	BPA, inhibe <i>Fusarium</i> sp.	11.07 x 10 <sup>9</sup>
CPPC6	<i>Arthrobacter</i> sp.	BPA, inhibe <i>P. capsici</i>	6.29 x 10 <sup>9</sup>
CPPC7	<i>Bacillus simplex</i>	BPA, inhibe <i>P. capsici</i>	2.33 x 10 <sup>7</sup>
CPPC8	<i>S. liquefaciens</i>	BPA, inhibe <i>Fusarium</i> sp. y <i>P. capsici</i>	3.39 x 10 <sup>9</sup>
CPPC9	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	BFN, inhibe <i>P. capsici</i>	51.84 x 10 <sup>9</sup>
CPPC10	<i>S. marcescens</i>	BFN, inhibe <i>P. capsici</i>	6.53 x 10 <sup>7</sup>

BSP = Bacterias solubilizadoras de fosfato, BPA = Bacterias productoras de auxina y BFN = Bacterias fijadoras de nitrógeno.

#### 4.2.3.2. Establecimiento del experimento y variables evaluadas en plántulas

El sustrato utilizado para el crecimiento de las plántulas de chile poblano fue una mezcla de peat moss, perlita y vermiculita (relación 1:1:1), mismo que fue esterilizado en autoclave a 18 lb de presión. Antes de la siembra, la semilla de chile fue desinfectada con cloro al 1 % por 3 minutos y lavada tres veces con agua destilada estéril. A los 68 días después de la inoculación las plántulas fueron cosechadas para evaluar la altura final; la medición se hizo con una regla graduada y se expresó en cm. El área foliar se determinó con un medidor de área foliar (Area

Meter, Modelo LI-3100; Nebraska, USA). La biomasa se determinó mediante el peso seco de las partes aérea (tallo y hojas) y radical de la planta, secándolas a humedad constante en un horno (FELISA, Modelo 242-A, D.F. México) a 70 °C por 72 horas; el peso seco de las plántulas se cuantificó en una balanza analítica (Sartorius, Modelo Analytic AC 210S, Illinois, USA).

El experimento fue establecido utilizando un diseño experimental completamente al azar con 17 tratamientos (incluyendo testigo) y 20 repeticiones. Cada tratamiento consistió de una cepa de rizobacterias previamente seleccionada. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS para Windows (SAS Institute Inc. 2002), realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

### **4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.3.1. Aislamiento y selección de cepas de rizobacterias**

Las poblaciones de bacterias rizosféricas variaron entre sitios de manera significativa estadísticamente (Tukey  $p \leq 0.05$ ). El sitio siete presentó las poblaciones más altas de BT ( $53 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$ suelo) y BPA ( $92 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  suelo), mientras que el sitio uno tuvo las poblaciones más altas de BSP ( $46 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$ suelo) y fijadoras de nitrógeno ( $36 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$ suelo). El número de BT más bajo ( $10 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$ suelo) se presentó en el sitio uno y el más bajo para las BSP ( $1 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$ suelo) en el sitio 4; las poblaciones más bajas de BPA ( $4 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$ s.s.) y BFN ( $10 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$ suelo) se tuvieron en el sitio 5 (Cuadro 4.3).

La población bacteriana está influenciada por diversos factores como la especie vegetal, edad y estado nutricional de la planta (Adeboye *et al.*, 2006) y por las características del suelo como la humedad, estructura, pH, materia orgánica y contenido nutrimental, entre otros



(Nelson y Mele, 2007). En este trabajo el pH, la MO, el N y K, presentaron correlación altamente significativa y negativa ( $\alpha = 0.01$ ) con el número de BSP (Cuadro 4.4), lo cual significa que la cantidad de BSP disminuye a medida que se incrementan los valores de pH, MO, N y K en el suelo. La correlación entre el número de BPA con el P fue positiva y altamente significativa ( $\alpha = 0.01$ ), lo que indica que cuando el P del suelo aumenta también se incrementa la población de estas rizobacterias.

Cuadro 4.3. Unidades formadoras de colonias (UFC) cuantificadas en suelo rizosférico de Chile poblano en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México.

Sitios	BT UFC g <sup>-1</sup> suelo (10 <sup>5</sup> )	BSP UFC g <sup>-1</sup> suelo (10 <sup>4</sup> )	BPA UFC g <sup>-1</sup> suelo (10 <sup>4</sup> )	BFN UFC g <sup>-1</sup> suelo (10 <sup>5</sup> )
1	10h	46a	7bc	36a
2	11g	36ab	6bc	18ab
3	26c	8ab	10bc	12ab
4	16e	1c	22b	11b
5	20d	20ab	4c	10b
6	27b	26ab	5c	10b
7	53a	6b	92a	15ab
8	15f	9ab	4c	11b
9	16e	9ab	11bc	14ab

BT = Bacterias totales, BSP = bacterias solubilizadoras de fosfatos, BPA = bacterias productoras de auxinas y BFN = bacterias fijadoras de nitrógeno. Letras diferentes dentro de la misma columna presentan diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05$ , a>b).

#### 4.3.1.1. Solubilización de fosfatos y producción de auxinas por las rizobacterias

La concentración de fosfato soluble en los 74 cultivos de las cepas bacterianas fluctuó entre 10 y 881  $\mu\text{g/mL}$ . El 31 % de las cepas (23) solubilizaron más de 400  $\mu\text{g/mL}$  de fosfato. Seis de las cepas fueron aisladas del sitio 4 (cepas 23, 24, 25, 26, 28, 29), teniendo la concentración más alta la cepa 25, con 881  $\mu\text{g/mL}$  de fosfato solubilizado (Figura 4.2). Diversos estudios han evidenciado géneros de bacterias con capacidad para solubilizar fosfatos, destacando *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pantotea*, *Klebsiella*, *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Serratia* y *Erwinia* (Khan *et al.*, 2010; Datta *et al.*, 2011), los cuales han sido utilizados en plantas de arroz (Chaiharn y Lumyong, 2009), trigo (Ahmad *et al.*, 2008), soya (Son *et al.*, 2006), maíz (Fitriatin *et al.*, 2014), tomate (Banerjee *et al.*, 2010) y chile (Datta *et al.*, 2011; Hahm *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2013; Reyes-Ramírez *et al.*, 2014).

En el caso de la producción de ácido indolacético, se realizó una preselección de 71 cepas con base en la evaluación cualitativa del cambio de color a rosa (indicativo de producción de indoles). En una segunda etapa se determinó la producción de indoles de esas cepas preselccionadas; todas presentaron entre 21 y 26  $\mu\text{g/mL}$  de indoles; de éstas, el 17 % fueron encontradas en el sitio cuatro (cepas 23-34), el 15 % en el sitio siete (cepas 45-55), el 13 % en los sitios tres (cepas 14-22) y nueve (cepas 63-71); la cantidad más alta de indoles producidos fue encontrada en la cepa 52, proveniente del sitio siete, con 26.4  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 4.3). La producción de auxinas por parte de las cepas está condicionada por el tipo y edad del cultivo asociado, además de la especie y género al cual pertenece la bacteria (Ponmurugan y Gopi, 2006).

La cantidad solubilizada de fosfatos por las cepas evaluadas en este estudio fue alta respecto a lo encontrado por Datta *et al.* (2011), quien al evaluar cepas de rizobacterias aisladas en rizósfera de *C. annuum* var “Suryamukhi” encontró la cantidad más alta de fosfato solubilizado (55 µg/mL) por la cepa de *Streptomyces* sp. C32, el ácido indol acético producido por esta cepa fue menor a 10 µg/mL. En otro estudio, *Arthrobacter* sp. y *Bacillus* sp., aislados en rizósfera de tomate tuvieron valores altos de solubilización de fosfatos, que fueron entre 150 y 200 µg/mL (Banerjee *et al.*, 2010).

Cuadro 4.4. Correlaciones entre el número de microorganismos y algunas características del suelo rizosférico de chile poblano colectado en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México.

	Ph	MO	N	Nt	P	K	Mg	Fe	CIC
BFN	-0.134	-0.196	0.055	-0.202	0.067	-0.031	0.030	-0.071	0.202
BSP	-.337(**)	-.360(**)	0.079	-.356(**)	-0.093	-.298(*)	-0.176	-0.157	0.040
BPA	0.134	0.131	0.174	0.168	.457(**)	0.181	-0.074	0.207	-0.070
BT	0.047	0.025	0.211	0.059	0.231	0.028	-0.140	0.039	-0.152
pH		.752(**)	-.508(**)	.752(**)	-0.101	.545(**)	.331(**)	-0.106	0.120
MO			-.398(**)	.990(**)	0.187	.764(**)	.568(**)	.311(**)	.317(**)
N				-.391(**)	0.176	-.453(**)	-.554(**)	-0.157	-.515(**)
Nt					.241(*)	.757(**)	.529(**)	.285(*)	.351(**)
P						.480(**)	0.199	.720(**)	.318(**)
K							.886(**)	.609(**)	.622(**)
Mg								.527(**)	.722(**)
Fe									.269(*)

BFN = Bacterias fijadoras de nitrógeno, BSP = bacterias solubilizadoras de fosfato, BPA = bacterias productoras de auxina, BT = bacterias totales, pH = potencial hidrógeno, MO = materia orgánica, N = nitrógeno, Nt = nitrógeno total, P = fósforo, K = potasio, Mg = magnesio, Fe = hierro y CIC = capacidad de intercambio catiónico. \*Correlación significativa ( $\alpha = 0.05$ ) y \*\*altamente significativa ( $\alpha = 0.01$ ).

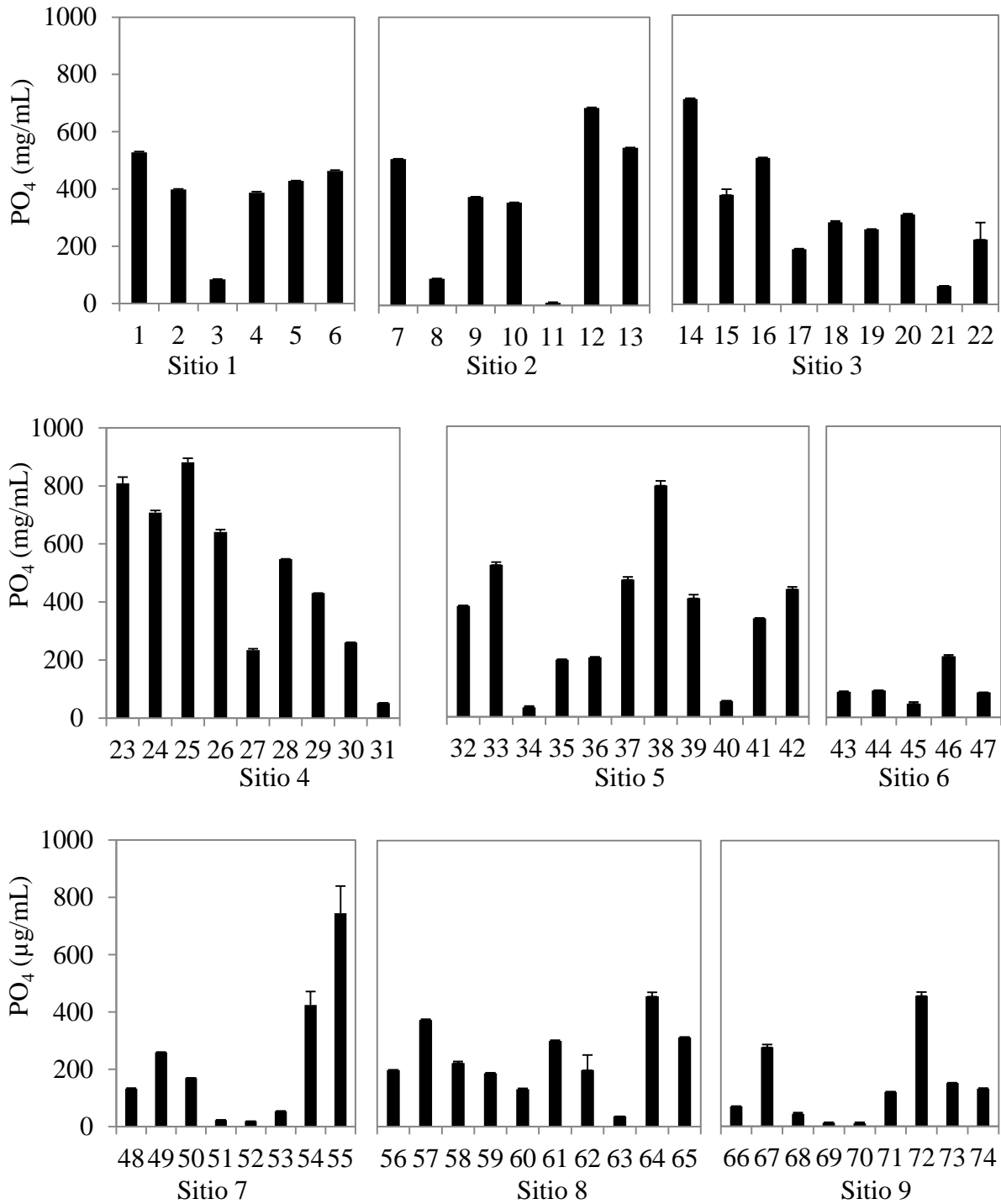


Figura 4.2. Solubilización de fosfatos ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por las cepas de BSP aislados en suelo rizosférico de chile poblano colectado en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México. Medias  $n = 3, \pm \text{EE}$ .

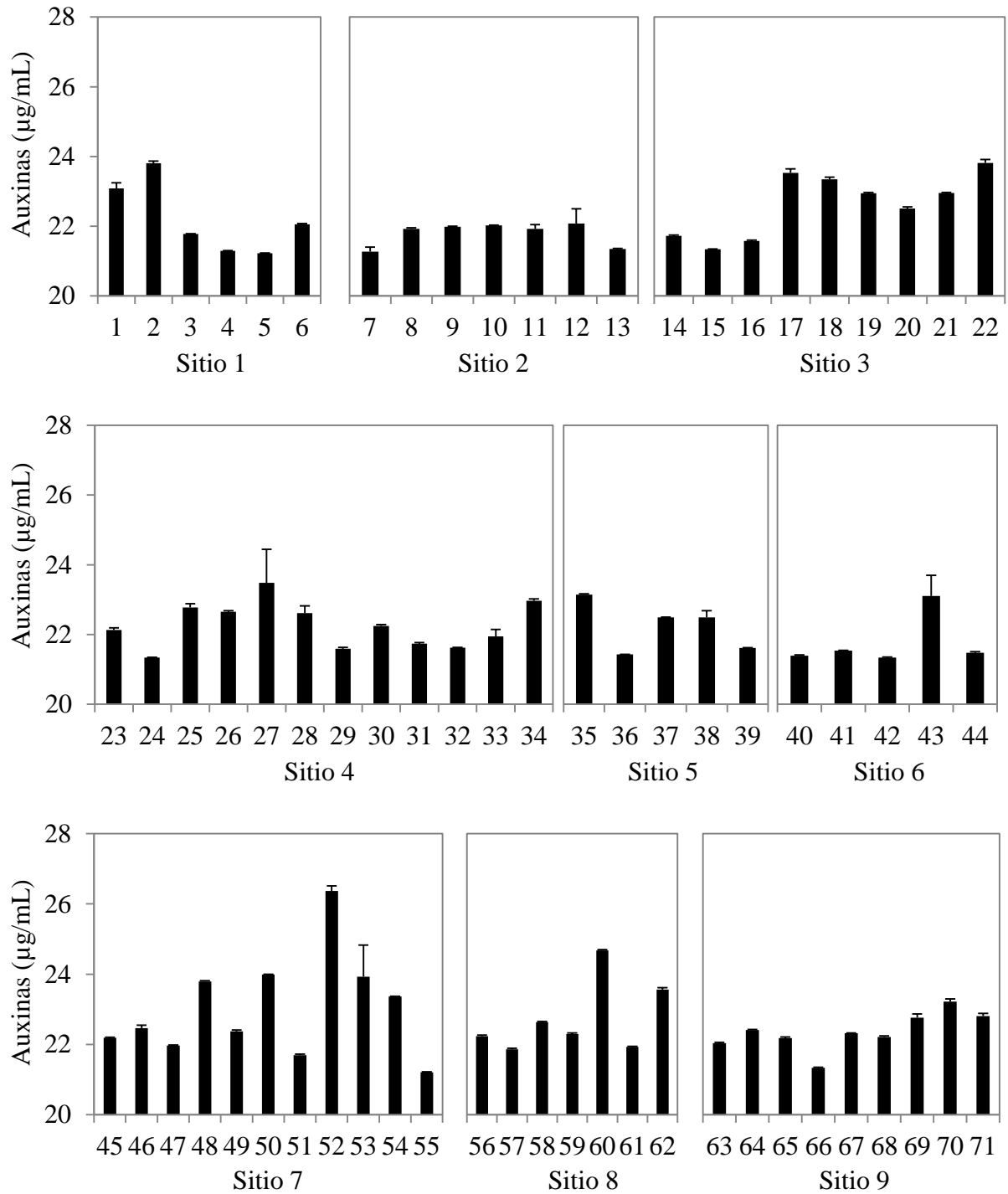


Figura 4.3. Producción de auxinas ( $\mu\text{g/mL}$ ) por las cepas de BPA aislados en suelo rizosférico de Chile poblano colectado en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México. Medias  $n = 3$ ,  $\pm$  EE.

#### 4.3.1.2. Actividad antagónica de las rizobacterias

La actividad antagónica hacia *Fusarium* sp., fluctuó entre 0 y 39 %, mientras que la inhibición de *P. capsici* fue de 0 y 63 % por el efecto de las BSP. Del total de cepas, 27 presentaron baja inhibición de *Fusarium* sp. ( $\leq 10$  %), 29 de ellas inhibieron el patógeno entre 11-20 % y 8 tuvieron los mayores efectos con valores de inhibición entre 21-39 %, destacándose las cepas 6 y 32 de los sitios dos y cinco con 38 y 39 % de inhibición. Respecto al porcentaje de inhibición de *P. capsici* por las BSP, se encontraron 16 cepas que tuvieron valores de inhibición  $\leq 10$  % del patógeno, 25 cepas limitaron su desarrollo entre 21-39 % y otras 20 detuvieron el crecimiento del hongo entre 40 y 63 %, las mejores cepas (6, 10 y 32) fueron encontradas en los sitios 2, 3 y 5 al disminuir 63, 60 y 61 % el crecimiento fúngico (Figura 4.4).

El crecimiento de *Fusarium* sp., se redujo entre 0 y 39 % por efecto de la confrontación con las rizobacterias productoras de auxinas. Se encontraron 36 cepas que inhibieron el crecimiento del patógeno entre 0-10 %, 10 cepas disminuyeron el crecimiento fúngico entre 11-20 % y otras tres (cepas 15, 23 y 36) pertenecientes a los sitios 4, 5 y 7 impidieron el crecimiento del patógeno en un 24, 36 y 39 %, respectivamente. El desarrollo de *P. capsici* se redujo entre 0-45 % por efecto de las BPA, 15 cepas presentaron inhibición  $\leq 10$  %, 12 cepas disminuyeron entre 11-20 % el crecimiento fúngico, 18 cepas inhibieron entre 21-39 % y cuatro disminuyeron 41 (cepas 1 y 19) y 45 % (cepas 11 y 24) el crecimiento del patógeno, siendo estas las mejores cepas provenientes de los sitios 1, 3, 4 y 5 (Figura 4.5).

El efecto de las BFN sobre la inhibición de *Fusarium* sp. fluctuó entre 0 y 23 %, encontrándose 26 cepas con baja capacidad de reducir el crecimiento de este patógeno (entre 0

y 10 %), mientras que siete de ellas lograron disminuir el desarrollo del patógeno entre 11 y 23 % siendo las mejores (cepas 8 y 16) aquellas provenientes de los sitios 2 y 4 al limitar el crecimiento fúngico en 22 y 23 % respectivamente. Estas rizobacterias inhibieron *P. capsici* entre 0-57 %, de los cuales 10 cepas inhibieron al hongo ligeramente con valores  $\leq 10$  %, 12 cepas inhibieron entre 21-39 %, cinco de ellas redujeron el crecimiento del patógeno entre 40-57 %, estas últimas fueron aislados de los sitios 1, 3, 5, 6 y 9, siendo las más alta la cepa 19 (sitio 5) (Figura 4.6).

En este trabajo las cepas 4, 45 y 46 identificadas como *Serratia plymuthica* inhibieron *Fusarium* sp. (26, 20 y 37 %) y *P. capsici* (45, 38 y 42 %), en otros estudios se ha demostrado que esta especie de rizobacteria puede ser antagónica a *Rhizoctonia solani* (Grosch *et al.*, 2005), *Phytophthora capsici* (Kim *et al.*, 2008), *Pythium* sp. (Ovadis *et al.*, 2004) y *Fusarium* sp. (Frommel *et al.*, 1991), que son los fitopatógenos causantes de la secadera o “damping-off” en cultivos de importancia agrícola. Las bacterias solubilizadoras de fosfatos, fijadoras de nitrógeno y productoras de auxinas pueden inhibir la incidencia de enfermedades radicales, debido a que sintetizan sideróforos, antibióticos y enzimas hidrolíticas (Hayat *et al.*, 2010; Saharan y Nehra, 2011) como la quitinasa, proteasa, celulasas o glucanasas que pueden degradar la pared celular del hongo (Wang *et al.*, 2002).



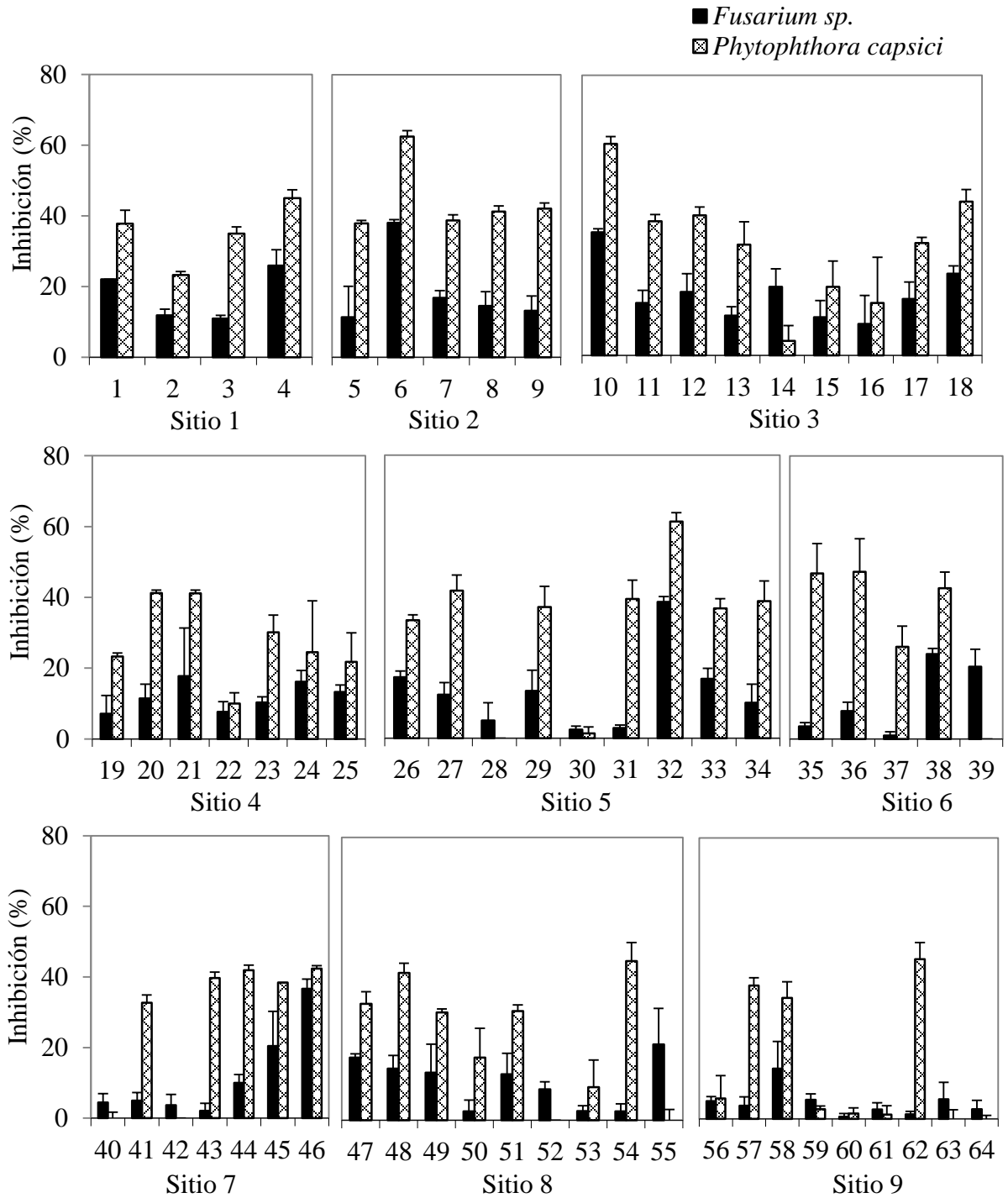


Figura 4.4. Porcentaje de inhibición de *Fusarium sp.*, y *Phytophthora capsici* por efecto de las BSP aisladas de suelo rizosférico de chile poblano colectado en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México. Medias n = 4, ± EE.

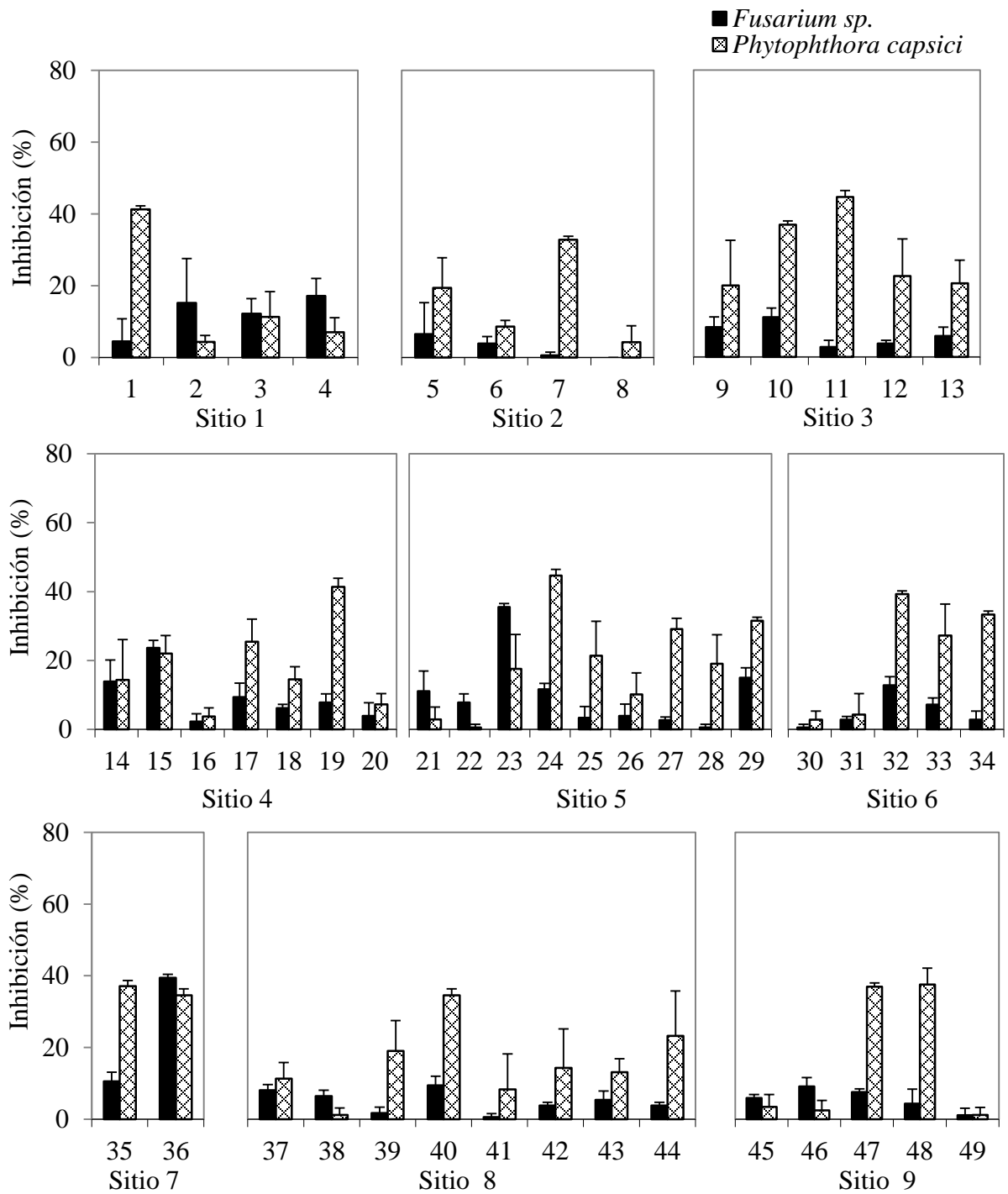


Figura 4.5. Porcentaje de inhibición de *Fusarium sp.*, y *Phytophthora capsici* por efecto de las BPA aisladas de suelo rizosférico de chile poblano colectado en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México. Medias  $n = 4$ ,  $\pm$  EE.

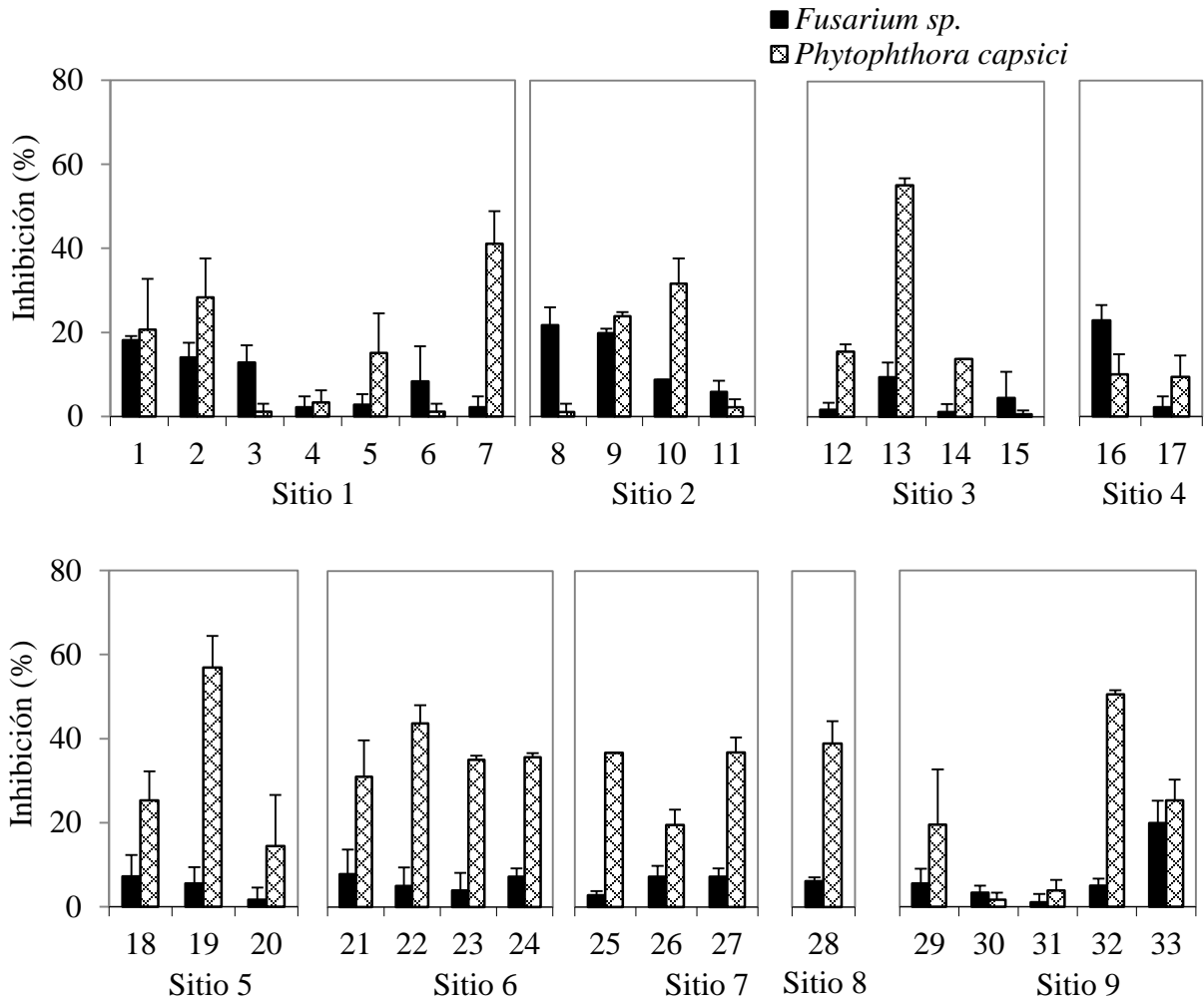


Figura 4.6. Porcentaje de inhibición de *Fusarium sp.*, y *Phytophthora capsici* por efecto de las BFN aisladas de suelo rizosférico de chile poblano colectado en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México. Medias  $n = 4$ ,  $\pm$  EE.

### 4.3.2. Caracterización de las cepas

La asignación filogenética de las cepas y sus identidades, secuenciadas con la amplificación del gen 16S rDNA de las cepas aisladas y seleccionadas para probar su efecto en plántulas de chile poblano, se muestran en la Figura 4.7. La afiliación genética de las cepas se muestra en el Cuadro 4.5. Seis cepas pertenecen al género *Serratia*; de éstas, tres (CPPC1, CPPC3 y CPPC4) son de la especie *S. plymuthica* (100 y 99 % de similitud), dos (cepas CPPC2 y CPPC10) fueron de la especie *S. marcescens* (99 %), y una (CPPC8) correspondió a la especie *S. liquefaciens* (99 %). Las cepas CPPC5, CPPC6, CPPC7 y CPPC9 pertenecieron a *Agrobacterium vitis*, *Arthrobacter* sp., *Bacillus simplex* y *Stenotrophomonas maltophilia*, respectivamente.

Cuadro 4.5. Afiliación genética de las cepas obtenidas en este estudio según las secuencias de amplificación del gen 16S rARN comparadas con el GenBank.

Cepas	Identificado como	Pares de bases	Número de accession GenBank	Cobertura (%)	Similitud (%)
CPPC1	<i>Serratia plymuthica</i>	1308	LC003619.1	100	100
CPPC2	<i>Serratia marcescens</i>	1316	KC683719.1	100	99
CPPC3	<i>Serratia plymuthica</i>	1464	KR054980.1	100	99
CPPC4	<i>Serratia plymuthica</i>	1464	KR054980.1	100	99
CPPC5	<i>Agrobacterium vitis</i>	1063	KJ642232.1	100	99
CPPC6	<i>Arthrobacter</i> sp.	1474	KF956676.1	100	99
CPPC7	<i>Bacillus simplex</i>	1473	KR055037.1	100	99
CPPC8	<i>Serratia liquefaciens</i>	1544	NR_122057.1	100	100
CPPC9	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1445	KM488438.1	100	99
CPPC10	<i>Serratia marcescens</i>	1391	KJ535325.1	100	99

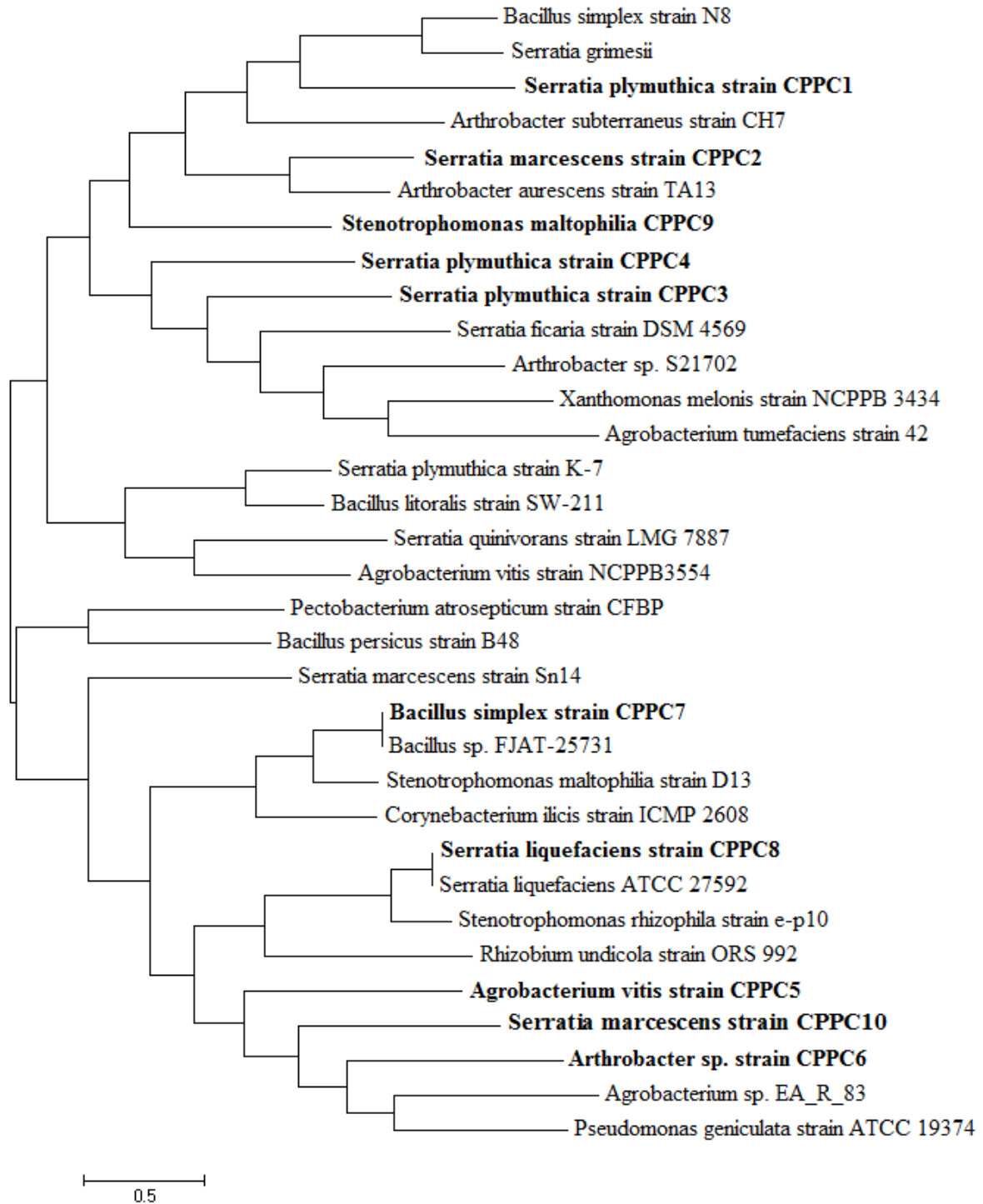


Figura 4.7. Árbol filogenético de máxima similitud basado en la secuencia 16S rARN de las cepas aisladas en este estudio (en negrita) y secuencias del GenBank con su número de aceción.

### **4.3.3. Efectividad de las rizobacterias en la promoción del crecimiento en plántulas de chile poblano.**

Las mejores cepas para cada uno de los atributos estudiados (solubilización de fosfatos, producción de auxinas y fijadoras de nitrógeno) se utilizaron para evaluar su capacidad para promover el crecimiento en plántulas de chile poblano. Estas cepas fueron identificadas como *S. plymuthica* (CPPC1, CPPC3 y CPPC4), *S. marcescens* (CPPC2 y CPPC10), *S. liquefaciens* (CPPC8), *Agrobacterium vitis* (CPPC5), *Arthrobacter* sp. (CPPC6), *B. simplex* (CPPC7), y *Stenotrophomonas maltophilia* (CPPC9).

Las cepas bacterianas inoculadas en plántulas de chile mostraron diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Los resultados evidenciaron que el 49 % de los tratamientos inoculados con las rizobacterias mostraron incrementos en altura, número de hojas y producción de biomasa seca total respecto al testigo. Los mejores tratamientos fueron las plántulas inoculadas con la cepa CPPC5 (*A. vitis*) y CPPC4 (*S. plymuthica*), ya que en el caso del tratamiento con la cepa CPPC5 se obtuvo una altura final promedio de 9.6 cm, siete hojas y 0.082 g de biomasa seca total, valores que fueron 22.5, 7.6 y 26.04 % mayores en comparación con el testigo, respectivamente. Los incrementos de la CPPC4 fueron de 15 % en altura y 11 % en número de hojas y 11 % en producción de biomasa seca (Cuadro 4.6).

*Serratia plymuthica* es una bacteria ubicua Gram negativa que se ha aislado en rizósfera de plantas de todo el mundo, ya sea en vida libre o como organismo endófito (De Vleeschauwer y Hofte, 2007) y tiene potencial no sólo para suprimir los agentes patógenos del suelo, sino también para estimular el crecimiento vegetal mediante la exudación de sideróforos, producción de ácido indol acético, creación de películas protectoras de la rizósfera y

biosíntesis de quitinasas y proteasas (Muller *et al.*, 2009). Sus efectos benéficos como rizobacteria promotora del crecimiento han sido evaluados en plantas de papa (Czajkowski *et al.*, 2012), pepino (McCullagh *et al.*, 1996), algodón, frijol, manzana, arroz, naranja, lechuga, fresa (De Vleeschauwer y Hofte, 2007) y chile (Park y Shen, 2002; Kim *et al.*, 2008), encontrándose incrementos en altura, biomasa radical y foliar, y rendimiento de fruto en el cultivo. Específicamente en *C. annuum*, Kim *et al.* (2008) reportaron que esta rizobacteria tiene la capacidad de disminuir la incidencia de patógenos como *P. capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *F. solani*.

Cuadro 4.6. Altura, número de hojas y biomasa seca en plántulas de chile poblano por efecto de la inoculación de rizobacterias a los 68 días después de la inoculación.

Cepas	Altura final (cm)	Número hojas	Biomasa seca (mg)		
			Radical	Aérea	Total
Testigo	7.8 (±0.6)cde	6.6(±0.9)ab	23bc	42bc	65(±0.008)bc
R44	8.5(±0.9)bc	7.0(±0.9)a	20cde	46ab	66(±0.010)bc
CPPC1	7.9(±0.9)cde	6.2(±1.2)abc	23bc	41bcd	64(±0.012)bcd
CPPC2	7.7(±1.0)cde	6.7(±1.0)ab	15f	36cde	51(±0.006)e
CPPC3	8.1(±0.9)bcd	7.1(±0.8)a	18def	41bcd	59(±0.008)cde
CPPC4	9.0(±1.1)ab	7.3(±0.9)a	21cde	51a	72(±0.009)b
CPPC5	9.6(±1.2)a	7.1(±1.4)a	30a	53a	82(±0.009)a
CPPC6	7.5(±1.4)cde	6.5(±1.4)abc	19def	41bcd	60(±0.008)cde
CPPC7	7.2(±0.6)de	5.6(±0.9)bc	22cd	34de	55(±0.008)de
CPPC8	7.8(±0.8)cde	7.1(±0.9)a	23bc	42bc	65(±0.006)bc
CPPC9	6.9(±0.6)e	5.5(±1.1)c	17ef	33e	50(±0.010)e
CPPC10	7.4(±1.1)de	7.1(±1.1)a	27ab	40bcde	66(±0.011)bc

Letras diferentes dentro de la misma columna, presentan diferencias estadísticas significativas. Medias n = 20, ± EE. (Tukey,  $\alpha = 0.05$ , a>b).

En otros trabajos también se han encontrado incrementos en la calidad de plántulas de *Capsicum annuum* (Datta *et al.*, 2011, Hahm *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2013) y *Capsicum chinense* jacq. (Reyes-Ramírez *et al.*, 2014) al evaluar parámetros como la germinación, altura, diámetro, biomasa seca, área foliar y rendimiento mediante la inoculación de rizobacterias. A pesar de encontrar efectos positivos en este trabajo al inocular *A. vitis* (Cepa CPPC5), otros trabajos han reportado que este género de bacterias puede causar crecimientos neoplásicos (agallas o tumores) en plantas huéspedes (Gelvin, 1990; Farrand *et al.*, 2003) debido a la presencia del plásmido pTi (inductor del tumor) en respuesta a la gran concentración de ácido indol acético secretado por la bacteria. Se ha establecido que la producción de IAA es la responsable de la patogenicidad de la bacteria y los genes de esta se localizan en el plásmido (pIAA1) (Aguilar-Piedras *et al.*, 2008), la pérdida o disminución de pIAA1 torna avirulenta a la bacteria (Comai y Kosuge, 1980), lo que podría explicar el porqué en este trabajo no se observaron tumores por efecto de la cepa, pero si un crecimiento positivo de las plántulas.

El 75 % de las plántulas inoculadas con las rizobacterias mostraron un incremento en área foliar comparadas con las plantas sin inóculo (Figura 4.8). Los tratamientos inoculados con *S. plymuthica* (CPPC4, 12.7 cm<sup>2</sup>) y *A. vitis* (CPPC5, 12.4 cm<sup>2</sup>) fueron estadísticamente superiores, ya que presentaron 34.2 y 30.1 % más área foliar que el testigo, respectivamente. En contraste, los tratamientos CPPC7 y CPPC9 (*Bacillus simplex* y *Stenotrophomonas maltophilia*) presentaron menor área foliar que el tratamiento testigo. En un estudio similar Yau *et al.* (2013) encontraron incrementos en altura, diámetro, número de hojas, biomasa seca y área foliar por efecto de la inoculación de *S. marcescens* y *Bacillus cereus* en plantas de



chile pimiento, debido a que estos microorganismos tienen la capacidad de producir ácido indolacético e inhibir fitopatógenos como *P. capsici* hasta en un 75 %.

*Serratia liquefaciens* (cepa CPPC8) indujo mayor producción de hojas y por consiguiente mayor área foliar respecto al testigo, siendo similares los valores obtenidos en altura y producción de biomasa seca. Se han realizado diversos estudios para evaluar los efectos de *S. liquefaciens*, encontrándose efectos benéficos en el crecimiento y rendimiento de trigo (Muhammad *et al.*, 2015), tomate (Manas *et al.*, 2010), soya (Pan *et al.*, 2002) y maíz (Pan *et al.*, 1999), pero no se han encontrado reportes en cultivos de chile, siendo éste uno de los primeros estudios en cuanto a la calidad de plántulas en chile poblano.

En este trabajo se ha demostrado la importancia de inocular rizobacterias debido a que, por su efecto promotor del crecimiento, se producen plántulas de chile poblano de mayor calidad. Probablemente los beneficios de un mayor vigor en las plántulas son una consecuencia de la producción de sideróforos y ácido indolacético, y solubilización de minerales como P, K, Zn (Sarathambal *et al.*, 2015) y de sus propiedades antagónicas a fitopatógenos causantes de la secadera, como *R. solani*, *Fusarium* sp. (Kavroulakis *et al.*, 2010), *P. capsici* (Yau *et al.*, 2013), *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum capsici*, *F. oxysporum* y *Pythium* sp. (Amaresan *et al.*, 2012), debido a la producción de enzimas quitinolíticas que degradan las paredes celulares de los patógenos (Jaiganesh *et al.*, 2007). En un estudio similar Amaresan *et al.* (2012) encontraron que la inoculación de *Bacillus* sp., *Serratia* sp., *Arthrobacter* sp., y *Serratia marcescens* incrementan la calidad de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y chile (*C. annuum*) al haber aumentos en la longitud radical y número de raíces secundarias, mayor altura y producción de biomasa seca.

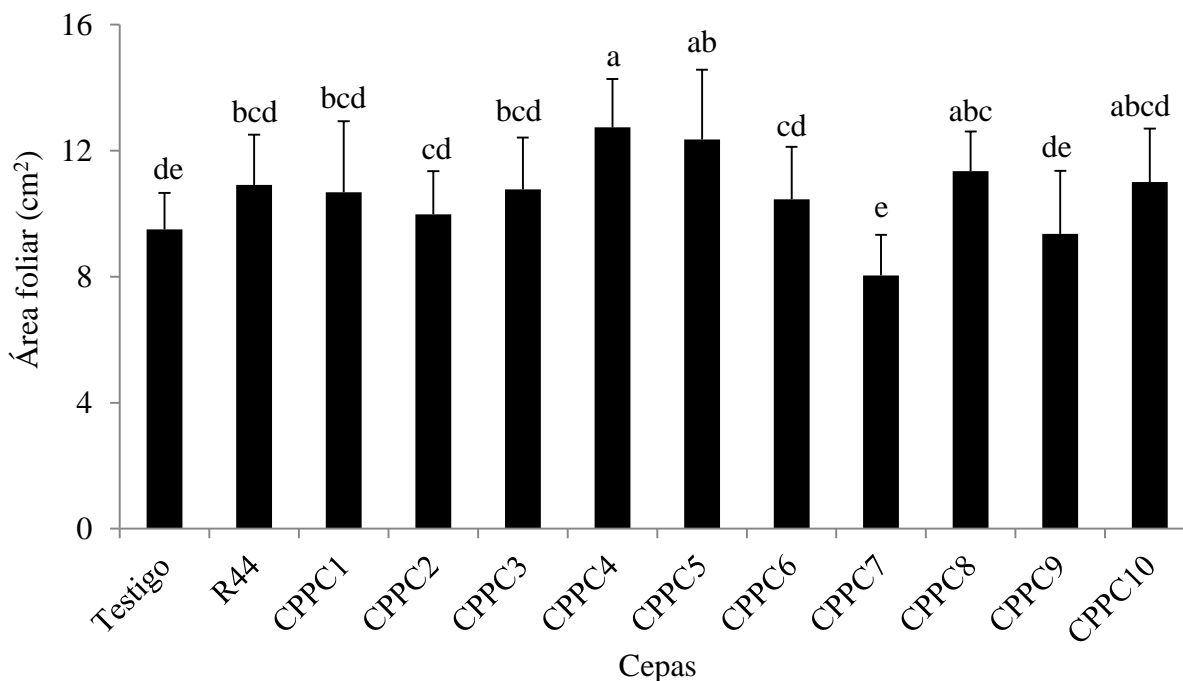


Figura 4.8. Área foliar en plántulas de chile poblano por efecto de la inoculación de RPCV a los 68 días después de la inoculación. Medias  $n = 20$ ,  $\pm$  EE. Letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ).

#### 4.4. CONCLUSIONES

Las poblaciones más altas de bacterias totales y productoras de auxinas fueron encontradas en el sitio 7 a una altitud de 2292 msnm, con un pH de 6.8, 0.9 % de materia orgánica y textura areno francoso; no así para las solubilizadoras de fosfatos y fijadoras de nitrógeno que fueron mejores en el sitio 1, localizado a 2467 msnm, pH de 5.5, materia orgánica de 0.3 % y con textura franco arenoso. La mayor cantidad de cepas productoras de auxinas se encontró en los sitios 4 y 7, mientras que los sitios 5 y 8 mostraron mayor cantidad de BSP. En este estudio, se demostró que el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento con capacidad para solubilizar fosfatos (entre 10-800  $\mu\text{g/mL}$ ) y producir auxinas (20-27  $\mu\text{g/mL}$ ), son efectivas para obtener plántulas de buena calidad en chile poblano. *Serratia plymuthica*, *S. marcescens*,

*Arthrobacter* sp., *S. liquefaciens*, promovieron mayor altura, número de hojas y mejor producción de biomasa seca radical y aérea en plántulas de chile poblano. *S. liquefaciens* no se ha utilizado como promotor de crecimiento en *Capsicum*, pero lo reportado en este trabajo indica que esta especie, al igual que *S. plymuthica*, pueden ser alternativas en la agricultura sustentable para la obtención de plántulas con la calidad necesaria al momento del transplante y que podrían favorecer un mayor rendimiento del chile poblano.

#### 4.5. LITERATURA CITADA

- Adeboye M. K. A., Iwuafor E. N. O., Agbenin J. O. 2006. The effects of crop rotation and nitrogen fertilization on soil chemical and microbial properties in a Guinea Savanna Alfisol of Nigeria. *Plant and Soil* 281: 97-107.
- Aguilar-Piedras J. J., Xiqui-Vásquez M. L., García-García S., Baca B. E. 2008. Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 50(1-2): 29-37.
- Ahmad F., Ahmad I., Khan M. S. 2008. Screening of free-living rhizobacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163: 173-181.
- Alejo-Iturvide F., Márquez-Lucio M. A., Morales-Ramírez I., Vázquez-Garcidueñas M. S., Olalde-Portugal V. 2008. Mycorrhizal protection of chili plants challenged by *Phytophthora capsici*. *Eur J Plant Pathol* 120:13-20.
- Altomare C., Tringovska I. 2011. Beneficial Soil Microorganisms, an Ecological Alternative for Soil Fertility Management. *In: Genetics, Biofuels and Local Farming Systems*. Lichtfouse E. (ed). Springer Netherlands. *Sustainable Agriculture Reviews* 7: 161-214.
- Amaresan N., Jayakumar V., Kumar K., Thajuddin N. 2012. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annuum*) seedling growth. *Annals of Microbiology* 62: 805-810.
- Arguelles-Arias A., Ongena M., Halimi B., Lara Y., Brans A., Joris B., Fickers P. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GAI as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories* 8: 63.

- Artursson V., Finlay R. D., Jansson J. K. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ Microbiol.* 8:1-10.
- Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S., Vivanco J. M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233-66.
- Banerjee S., Palit R., Sengupta C., Standing D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science* 4(6): 378-383.
- Barassi C. A., Sueldo R. J., Creus C. M., Carrozzi L. E., Casanovas E. M., Pereyra M. A. 2007. *Azospirillum* spp., a Dynamic Soil Bacterium Favourable to Vegetable Crop Production. *Dynamic Soil, Dynamic Plant* 1(2): 68-82.
- Bennett A. J., Mead A., Whipps J. M. 2009. Performance of carrot and onion seed primed with beneficial microorganisms in glasshouse and field trials. *Biological Control* 51: 417-426.
- Berg G. 2009. Plant microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 11-18.
- Chaiharn M., Lumyong S. 2009. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. *W J Microbiol Biotechnol* 25: 305-314.
- Comai L., Kosuge T. 1980. Involvement of a plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *Journal Bacteriology* 143: 950-957.
- Czajkowski R., de Boer W. J., van Veen J. A., van der Wolf J. M. 2012. Studies on the interaction between the biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A30, and blackleg-causing *Dickeya* sp. (biovar 3) in potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Pathology* 61: 677-688.
- Datta M., Palit R., Sengupta C., Pandit M. K., Banerjee S. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of chilli (*Capsicum annuum* L.) under field conditions. *Australian Journal of Crop Science* 5(5): 531-536.
- De-Bashan L. E., Holguin G., Glick B. R., Bashan Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *In: Microbiología*

- agrícola. Ferrara- Cerrato R., Alarcón A. (eds.). Editorial Trillas. DF México. pp 170-209.
- De Vleeschauwer D., Hofte M. 2007. Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogens of plants. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 2(46): 1-12.
- Díaz A. C. F., Costa F. E. C., Andreote F. D., Lacava P. T., Teixeira M. A., Assumpcao L. C., Araujo W. L., Azevedo J. L., Melo I. S. 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. World J Microbiol Biotechnol. 25:189-195.
- FAOSTAT. 2016. United Nations, Food and Agriculture Organization. Agricultural trade. <http://www.faostat.fao.org/>.
- Farrand S. K., van Berkum P. B., Oger P. 2003. *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53: 1681-1687.
- Ferrera-Cerrato R., A. Alarcón. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. Ciencia Ergo Sum 8(2): 175-183.
- Fitriatin B. N., Yuniarti A., Turmuktini T., Ruswandi F. K. 2014. The effect of phosphate solubilizing microbe producing growth regulators on soil phosphate, growth and yield of maize and fertilizer efficiency on Ultisol. Eurasian Journal of Soil Science 3: 101-107.
- Frank J. A., Reich C. I., Sharma S., Weisbaum J. S., Wilson B. A., Olsen G. J. 2008. Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. Applied and Environmental Microbiology 74(8): 2461-2470.
- Frommel M. I., Pazos G. S., Nowak J. 1991. Plant-growth stimulation and biocontrol of *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) by co-inoculation of tomato seeds with *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas* sp. Fitopatologia 26: 66-73.
- Galtier N., Gouy M., Gautier C. 1996. SEA VIEW and PHYLO\_ WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. Computer Applications in the Biosciences 12(6): 543-548.
- Gamalero E., Berta G., Massa N., Glick B. R., Lingua G. 2008. Synergistic interactions between the ACC deaminase-producing bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and the

- AM fungus *Gigaspora rosea* positively affect cucumber plant growth. FEMS Microbiology Ecology 64: 459-67.
- García M. C., Taboada G. O. R., López S. H. López P. A., Mora A. G., Tlapal B. B. 2011. Calidad de plántulas de Chile “Poblano” en la Sierra Nevada de Puebla, México. Revista Fitotecnia 34(2): 115-121.
- Gelvin S. B. 1990. Crown gall disease and hairy root disease. Plant Physiology 92: 281-285.
- Glick B. R., Cheng Z., Czarny J., Cheng Z., Duan J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. European Journal Plant Pathology 119: 329-339.
- González P. E., Yáñez M. M. J., Santiago S. V., Montero P. A. 2004. Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. Agrociencia 38: 653-661.
- Grosch R., Faltin F., Lottmann J., Kofoet A., Berg G. 2005. Effectiveness of 3 antagonistic bacterial isolates to control *Rhizoctonia solani* Kuhn on lettuce and potato. Canadian Journal of Microbiology 51: 345-53.
- Gravel V., Dorais M., Ménard C. 2012. Organic Fertilization and Its Effect on Development of Sweet Pepper Transplants. HortScience 47(2):198-204.
- Guzmán M., Sánchez A. 2003. Influence of nitrate and calcium increments on development, growth and early yield in sweet pepper plants. Acta Horticulturae 609: 207-211.
- Hahm M. S., Sumayo M., Hwang Y. J., Jeon S. A., Park S. J., Lee J. Y., Ahn J. H., Kim B. S., Ryu C. M., Ghim S. Y. 2012. Biological Control and Plant Growth Promoting Capacity of Rhizobacteria on Pepper under Greenhouse and Field Conditions. The Journal of Microbiology 50(3): 380-385.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., y Ahmed I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Ann Microbiol 60: 579-98.
- Jaiganesh V., Eswaran A., Balabaskar P., Kannan C. 2007. Antagonistic activity of *Serratia marcescens* against *Pyricularia oryzae*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 35: 123-129.

- Joseph B., Patra R. R., Lawrence R. 2007. Characterization of plant growth promoting Rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Journal of Plant Production 1(2): 141-152.
- Kavroulakis N., Ntougias S., Besi M. I., Katsou P., Damaskinou A., Ehaliotis C., Zervakis G. I., Papadopoulou K. K. 2010. Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and protection of tomato plants from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Plant Soil 333: 233-247.
- Kim Y. C., Kim K. Y., Jung H., Park S. K. 2008. An effective biocontrol bioformulation against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. European Journal of Plant Pathology. 120: 373-382.
- Khan M. S., Zaidi A., Ahemad M., Oves M., Wani P. A. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. Arch Agron Soil Scien 56(1): 73-98.
- Kloepper J. W., Reddy M. S., Rodríguez-Kabana R., Kenney D. S., Kokalis-Burelle N., Martinez-Ochoa N., Vavrina C. S. 2004. Application for rhizobacteria in transplant production and yield enhancement. Acta Horticulturae 631: 217-229.
- Luna M. L., Martínez P. R. A., Hernández I. M., Arvizu M. S. M., Pacheco A. J. R. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Revista Fitotecnia Mexicana 36(1): 63-69.
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23(21): 2947-2948.
- Manas R. S., Ramesh C. R., Lata. 2010. Tomato crop: Plant Growth Promoting Rhizobacteria in growth, yield and productivity. Agricultural Procedures, Pathogen Interactions and Health Effects. 147-159.
- McCullagh M., Utkhede R., Menzies J. G., Punja Z. K., Paulitz T. C. 1996. Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for biological control of *Pythium* root rot of cucumbers grown in rockwool and effects on yield. European Journal of Plant Pathology 102: 747-755.

- Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T. L., Agarwala R., Schäffer A. A. 2008. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24(16): 1757-1764.
- Muhammad A-U., Muhammad N. H., Muhammad J., Guenter B., Muhammad K. N. S., Angela S., Fauzia Y. H. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: An Alternate Way to Improve Yield and Quality of Wheat (*Triticum aestivum*). *International Journal of Agriculture and Biology* 17(1): 51-60.
- Muller H., Westendorf C., Leitner E., Chernin L., Riedel K., Schmidt S., Eberl L., Berg G. 2009. Quorum-sensing effects in the antagonistic rhizosphere bacterium *Serratia plymuthica* HRO-C48. *FEMS Microbiology Ecology* 67: 468-478.
- Nadeem S. M., Zahir Z. A., Naveed M., Ashraf M. 2010. Microbial ACC-deaminase: prospects and applications for inducing salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 29:360-393.
- Nelson D. R., Mele P. M. 2007. Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 340-351.
- Ovadis M., Liu X. G., Gavriel S., Ismailov Z., Chet I., Chernin L. 2004. The global regulator genes from biocontrol strain *Serratia plymuthica* IC1270: Cloning, sequencing, and functional studies. *Journal of Bacteriology* 186: 4986-4993.
- Pan B., Bai Y. M., Leibovitch S., Smith D. L. 1999. Plant-growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy* 11(3-4): 179-186.
- Pan B., Vessey J. K., Smith D. L. 2002. Response of field-grown soybean to co-inoculation with the plant growth promoting rhizobacteria *Serratia proteamaculans* or *Serratia liquefaciens*, and *Bradyrhizobium japonicum* pre-incubated with genistein. *European Journal of Agronomy* 17(2): 143-153.
- Park C., Shen S. 2002. Biocontrol of phytophthora blight of pepper employing *Serratia plymuthica* A21-4 and effect of soil population of *Phytophthora capsici* on the root colonization of the antagonistic bacteria. *Bulletin OILB/SROP* 25: 327-330.
- Pikovskaya R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362-370.



- Ponmurugan P., Gopi C. 2006. In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. *African Journal of Biotechnology* 5(4): 348-350.
- Puerta A. C. E., Russian L. T., Ruiz S. C. A. 2012. Producción de plántulas de pimentón (*Capsicum annuum* L.) en sustratos orgánicos a base de mezclas con fibra de coco. *Revista Científica UDO Agrícola* 12 (2): 298-306.
- Reyes-Ramírez A., López-Arcos M., Ruíz-Sánchez E., Latournerie-Moreno L., Pérez-Gutiérrez A., Lozano-Contreras M. G., Zavala-León M. J. 2014. Efectividad de inoculantes microbianos en el crecimiento y productividad de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agrociencia* 48: 285-294.
- Rosselló-Mora R., Amann R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 39-67.
- Russo V. M. 2004. Greenhouse-grown transplants as an alternative to bare-root transplants for onion. *HortScience* 39: 1267-1271.
- Russo V. M., Perkins-Veazie P. 2010. Yield and Nutrient Content of Bell Pepper Pods from Plants Developed from Seedlings Inoculated, or Not, with Microorganisms. *HortScience* 45(3): 352-358.
- Saharan B. S., Nehra V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*. 1-30.
- Sandhya V., Ali S. Z., Venkateswarlu B., Reddy G., Grover M. 2010. Effect of osmotic stress on plant growth promoting *Pseudomonas* spp. *Archives of Microbiology* 192(10): 867-876.
- Saraf M., Kumar J. C., Patel D. 2010. The Role of ACC Deaminase Producing PGPR in Sustainable Agriculture. *In: Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Maheshwari D. K. (ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Microbiology Monographs* 18: 365-385.
- Sarathambal C., Ilamurugu K., Balachandar D., Chinnadurai C., Gharde Y. 2015. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic isolates from the rhizosphere of semi-arid tropical grasses of India. *Applied Soil Ecology* 87: 1-10.
- SAS (Statistical Analysis System). 2002. Software: the SAS System for Windows version 9.0. SAS Institute Inc., Cary, NC 25513, USA.

- Son H. J., Park G. T., Cha M. S., Heo M. S. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresour Technol* 97:204-210.
- Sharma A., Pathak A., Sahgal M., Meyer J. M., Wray V., Johri B. N. 2007. Molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria that enhance peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities in chile (*Capsicum annuum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Arch Microbiol* 188: 483-494.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729.
- Wang S. L., Hsiao W. J., Chang W. T. 2002. Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *J Agric Food Chem* 50: 2249-2255.
- Yau J. A., Diáñez F., Marín F., Carretero F., Santos M. 2013. Screening and evaluation of potential biocontrol fungi and bacteria foliar endophytes against *Phytophthora capsici* and *Phytophthora parasitica* on pepper. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 11(2): 490-495.
- Yu X., Ai C., Xin L., Zhou G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology* 47: 138-145.

## V. HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN EL CRECIMIENTO DE CHILE POBLANO

### RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo propagar e identificar hongos micorrízicos arbusculares (HMA) colectados en plantaciones de chile poblano, y seleccionar el consorcio micorrízico con mayor capacidad para promover crecimiento vegetal en invernadero. Se realizó la colecta de raíces y suelo rizosférico en nueve sitios de chile poblano en la región Sierra Nevada, estado de Puebla, México. Se evaluó la colonización micorrízica en las raíces de las plantas y el número de esporas de hongos endomicorrízicos. El suelo rizosférico se utilizó como inóculo para propagar los HMA, identificar las especies que forman el consorcio y evaluar su efecto en el crecimiento de chile poblano. Los géneros predominantes fueron *Funneliformis* y *Claroideoglosum*. A los 64 días después de la inoculación, el consorcio proveniente del sitio dos (*Funneliformis* aff. *geosporum* + *Claroideoglosum* sp.) tuvo el mayor efecto en el crecimiento del chile poblano incrementando altura, número de hojas, área foliar, producción de biomasa y contenido de fósforo del tejido vegetal.

**Palabras clave:** Colonización micorrízica, *capsicum annum*, crecimiento, fósforo, hongos micorrízicos.

## V. ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ON PLANT GROWTH OF POBLANO PEPPER

### ABSTRACT

The objective of this research was to propagate and identify arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from samples collected in poblano pepper fields, and to select the best mycorrhizal consortium able to promote plant growth in greenhouse conditions. Roots and rhizospheric soil of poblano pepper were collected at nine field sites in the Sierra Nevada region, Puebla state, Mexico. It was evaluated the mycorrhizal colonization in the plant roots and number of fungal endomycorrhizal spores. The rhizospheric soil was used as inoculum to propagate the AMF, identify the species that form the consortium and evaluate its effect on the growth of poblano pepper. The predominant genera in the field samples were *Funneliformis* and *Claroideoglossum*. At 64 days of inoculation, the consortium from the site two (*Funneliformis* aff. *geosporum* + *Claroideoglossum* sp.) had the greatest effect on the growth of poblano pepper increasing height, number of leaves, leaf area, biomass production and phosphorus content in plant tissue.

**Keywords:** mycorrhizal colonization, *Capsicum annuum*, growth, phosphorus, mycorrhizal fungi.

## 5.1. INTRODUCCIÓN

El término micorriza, que etimológicamente significa “hongo-raíz”, fue propuesto por primera vez por el botánico Alemán A.B. Frank (1885), para definir las asociaciones simbióticas entre las raíces de las plantas y el micelio de algunos hongos, en la que ambos resultan beneficiados. La simbiosis de la micorriza arbuscular se estima que ocurre en el 70-90 % de las plantas terrestres, en ecosistemas agrícolas o naturales (Smith y Reed 2008; Zhu *et al.*, 2010). Los HMA son simbioses obligados y adquieren carbono de sus plantas hospederas para completar su ciclo de vida (Bago *et al.*, 2000); a cambio, el hongo proporciona diversos beneficios para la planta, pues mejora las condiciones hídricas de la zona adyacente al sistema radical, favorece la nutrición mineral e incrementa la tolerancia al estrés ocasionado por factores bióticos y abióticos (Sawers *et al.*, 2008; Honrubia, 2009).

Las raíces de las plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.), como otras especies de plantas, forman asociaciones simbióticas con los hongos micorrízicos arbusculares (Davies *et al.*, 1992). Estas asociaciones micorrízicas han demostrado ser benéficas para la planta huésped mediante el aumento de la absorción de nutrientes, particularmente fósforo (P), nitrógeno (N) y potasio (K) (Perner *et al.*, 2007), así como de micronutrientes como zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe), azufre (S), calcio (Ca) (Allen, 2009), Magnesio (Mg) y Boro (B) (Subramanian *et al.*, 2006; Altomare y Tringovska, 2011).

Los HMA mejoran las propiedades del suelo mediante el micelio del hongo, el cual aumenta el volumen de exploración de suelo, las hifas de los HMA pueden llegar a poros demasiado pequeños, en donde las raíces no pueden llegar (Cho *et al.*, 2009), aumentando la absorción de agua y mineralizando P orgánico a través de la liberación de fosfatasa, además los HMA

facilitan la disponibilidad de nutrimentos menores al favorecer la colonización de la raíz por bacterias promotoras de crecimiento (Marschner, 2007). Por otra parte, los micelios permiten mejorar la estabilidad de los agregados mediante la producción de glomalina que favorece la estructura y evita la erosión del suelo (Cavagnaro *et al.*, 2006; Kahiluoto *et al.*, 2009).

La inoculación con HMA en cultivares de *Capsicum* spp., puede aumentar la resistencia de las plantas a diversas enfermedades radicales (Lioussanne *et al.*, 2009) y foliares (Felle *et al.*, 2009) y la tolerancia a nemátodos que habitan en el suelo (Elsen *et al.*, 2008). Los efectos de los HMA en la reducción de las enfermedades se han estudiado en diversos cultivares de Chile; por ejemplo, Ozgonen y Erkili (2007) estudiaron la incidencia de *Phytophthora capsici* en *Capsicum annuum* cv. Charliston con presencia de HMA y observaron una disminución en los daños ocasionados por el patógeno. La inoculación con *Glomus* mejora el desempeño de las plantas de Chile bajo condiciones de sequía (Álvarez *et al.*, 2009), permite mayor adaptación a suelos salinos (Sheng *et al.*, 2008; Evelin *et al.*, 2009) y alcalinos (Labidi *et al.*, 2011). Por lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivo el propagar e identificar hongos micorrízicos arbusculares (HMA) colectados en plantaciones de Chile poblano, y seleccionar el consorcio micorrízico con mayor capacidad para promover el crecimiento de esta especie vegetal en invernadero.

## **5.2. MATERIALES Y METODOS**

### **5.2.1. Características del suelo**

Se colectó suelo rizosférico de cuatro plantas en etapa de producción en nueve sitios cultivados con Chile poblano localizadas en tres municipios del estado de Puebla, México (San Matías Tlalancateca, San Lorenzo Chiautzingo y Huejotzingo). En los sitios de muestreo los

valores de pH (suelo, agua 1:2) fluctuaron entre 4.9 a 7.6. Los contenidos de materia orgánica (MO) fueron de 0.27 a 1.48 % y de nitrógeno total (NT) fueron de 0.01 a .07 %, siendo los valores más altos de ambas variables los encontrados en los sitios 4 y 8. El fósforo fluctuó de 41.1 a 428.8 mg Kg<sup>-1</sup> en los sitios. La textura del suelo fue clasificado como franco arenoso (FA) en los sitios 1, 3, 4 y 5; franco arcillo arenoso (FAA) para el sitio dos; y areno francoso (AF) para los sitios de altitud más baja (sitios 6, 7, 8 y 9) (Cuadro 4.1).

### **5.2.2. Caracterización de los consorcios de las muestras colectadas**

En las raíces de las plantas de chile poblano se evaluó la colonización por HMA siguiendo el método de clareo y tinción con azul tripano (Phillips y Hayman, 1970); el porcentaje de colonización total (PCT) fue estimado por el método de Biermann y Linderman (1981). Una parte del suelo rizosférico fue utilizado para la extracción y cuantificación de esporas de HMA mediante la técnica de tamizado y decantado en húmedo (Gerdemann y Nicolson, 1963), expresado en 100 g de suelo seco. La otra parte del suelo (100g) se utilizó para evaluar su capacidad en la promoción de crecimiento en plantas de chile poblano a nivel invernadero.

La identificación taxonómica de los consorcios de HMA se realizó al final del experimento siguiendo la técnica de tamizado y decantado en húmedo; la purificación de las esporas se realizó mediante eliminación de la materia orgánica por el método de flotación en gradientes de sacarosa (Daniels y Skipper, 1982, modificado por Brundett *et al.*, 1996). Las esporas obtenidas fueron seleccionadas por sus similitudes morfológicas y colocadas en portaobjetos en grupos de 5 a 10 esporas y montadas en melzer y PVLG. Las preparaciones fueron observadas con un microscopio óptico con contraste de interferencia de Nomarski y reglilla micrométrica. Para la determinación taxonómica se observaron diferentes caracteres

morfológicos, que se compararon y contrastaron con los de las especies descritas hasta la fecha. Se observó la morfología de las esporas considerando el tipo de hifa de sostén, así como el tamaño, la forma y la ornamentación de las esporas; además, se realizó el conteo de estratos y el grosor de las capas que conforman la pared de la espora (Varela-Fregoso y González-Chávez 2007).

### **5.2.3. Efectividad de consorcios de HMA en la promoción del crecimiento de chile poblano.**

Se utilizó 100 g de suelo rizosférico, colectado en cada uno de los nueve sitios, como inóculo micorrízico para establecer un experimento en invernadero. Se usaron macetas con capacidad para un kg, se utilizó como sustrato la mezcla de peat moss, perlita y vermiculita (relación 1:1:1) debidamente esterilizado en autoclave entre 18-20 lb de presión. Los nueve tratamientos de consorcios de HMA fueron comparados con tres tratamientos testigos (sin inóculo): un absoluto (sin HMA y sin fertilización), un fertilizado con base en la dosis recomendada para cultivos de chile poblano en el área de estudio (120-80-100 de NPK) y otro fertilizado pero sin la dosis de fósforo 120-00-100 (NK). Los tratamientos con HMA fueron fertilizados solo con N y K (120-00-100).

Antes de la siembra en invernadero, las semillas de chile fueron desinfectadas durante tres minutos con cloro al 1 % y lavadas tres veces con agua destilada estéril. Las semillas fueron sembradas directamente en las macetas, a las cuales se les aplicaron riegos con agua destilada cada tercer día y solución nutritiva Long Ashton modificada para suministrar  $11 \mu\text{g por mL}^{-1}$  de fósforo (Hewitt, 1966).



Después de 65 días las plantas fueron cosechadas para evaluar la altura final, el número de hojas, el área foliar, la biomasa seca y la colonización por HMA (número de esporas y colonización total). La altura se midió con una regla graduada en cm y el área foliar se determinó con un medidor de área foliar (Area Meter, Modelo LI-3100; Nebraska, USA). La biomasa seca se cuantificó al separar la parte aérea (tallo y hojas) y radical de la planta; el secado de las muestras se hizo en un horno (FELISA, Modelo 242-A, D.F. México) a 70 °C por 72 horas; las partes de las plantas se pesaron por separado en una balanza analítica (Sartorius, Modelo Analytic AC 210S, Illinois, USA). La colonización por HMA fue evaluada mediante las técnicas mencionadas previamente en el apartado 5.2.1.

El contenido de fósforo en el material vegetal se determinó por colorimetría del fosfovanadomolibdato. El material se digesto vía húmeda (digestión ácida) y para ello se pesaron 0.25 g de tejido vegetal (tallo y hojas), se colocaron en matraces, se les agregaron 6 mL de una solución a base de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) y ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) (relación 4:2), se dejaron reposar durante un día (predigestado) y se colocaron en una plancha a 360 °C durante seis horas. Finalizada la digestión (solución madre), se vació la muestra en un matraz de 25 mL y se aforó con agua destilada. Se filtró con papel filtro Watman No. 2 y se tomó una alícuota de 10 mL vaciándolo en un matraz de 50 mL. Se agregaron 7.5 mL de la mezcla (2.5 mL de vanadato de amonio, 2.5 mL de molibdato de amonio y 2.5 mL de ácido nítrico) al matraz de 50 mL aforándose con agua destilada. Se dejó reposar por 30 minutos y se tomaron alícuotas de 150  $\mu\text{l}$ , las cuales se colocaron en microplacas para realizar la lectura en un espectrofotómetro a 470 nm.

El experimento se estableció bajo un diseño de tratamientos completamente al azar con 12 tratamientos y 8 repeticiones. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el paquete

estadístico SAS para Windows (SAS Institute Inc. 2002), realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

### **5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **5.3.1. Propagación y selección de consorcios de HMA colectados en la rizósfera de chile poblano**

La colonización inicial por hongos micorrízicos arbusculares en raíces de chile poblano de los nueve sitios colectados mostraron diferencias estadísticas significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ). Las raíces de las plantas de chile forman asociaciones simbióticas con los hongos micorrízicos arbusculares (Davies *et al.*, 1992); en este trabajo el porcentaje de colonización total fluctuó entre 5 y 68 %, presentando el valor más alto el sitio nueve y el más bajo el sitio cinco (Cuadro 5.1). Posiblemente, el bajo contenido de fósforo ( $44 \text{ mg kg}^{-1}$ ) encontrado en el sitio nueve este favoreciendo la colonización por los HMA, ya que estos son más eficientes en suelos con bajos contenidos de fósforo (Javaid, 2009), el cual no ocurrió con el sitio cinco quien presentó uno de los contenidos más altos de este elemento ( $187 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

La presencia de vesículas fue relativamente bajo, siendo el sitio seis con mayor presencia de estas estructuras micorrízicas con el 5 %, mientras que el sitio nueve no presentó vesículas. Los diferentes sitios presentaron diferencias estadísticas significativas en el número de esporas presentes (Tukey  $p \leq 0.05$ ), siendo el mejor el sitio siete con 896 esporas en 100 gramos de suelo seco (g.s.s.), mientras que en el sitio uno se encontró la menor cantidad con 195.

Cuadro 5.1. Colonización por HMA en plantas de chile poblano colectados en nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México.

Sitios	Origen geográfico	Colonización total (%)	Vesículas (%)	Número de esporas 100 g s.s.
1	San Matías Tlalancaleca	7.7 ± 4.8 de	1.0 ± 0.8 b	195.0 ± 21.5 d
2	San Matías Tlalancaleca	11.7 ± 8.4 de	1.5 ± 1.7 ab	476.9 ± 109.1 bc
3	Chiahutzingo	23.3 ± 23.4 bcde	0.7 ± 1.4 b	485.8 ± 120.0 bc
4	San Matías Tlalancaleca	16.1 ± 14.9 cde	0.3 ± 0.7 b	234.7 ± 120.2 d
5	Chiahutzingo	4.5 ± 4.1 e	0.3 ± 0.7 b	653.7 ± 214.1 b
6	Huejotzingo	43.9 ± 4.8 ab	5.2 ± 6.2 a	446.5 ± 68.7 c
7	Huejotzingo	43.0 ± 10.4 ab	2.8 ± 3.0 ab	895.9 ± 195.7 a
8	Huejotzingo	27.0 ± 14.6 bcd	0.4 ± 0.8 b	354.7 ± 48.8 cd
9	Huejotzingo	67.7 ± 20.9 a	0.0 ± 0.0 c	483.1 ± 142.6 bc

Letras diferentes dentro de la misma columna, presentan diferencias estadísticas significativas. Medias n = 4, ± EE. (Tukey,  $\alpha = 0.05$ , a>b).

La colonización total por HMA en raíz de chile presentó correlación positiva y altamente significativa ( $\alpha = 0.01$ ) con el pH del suelo (Cuadro 5.2); es decir, a medida que el pH cambió de ácido a neutro la colonización fue más alta. En el caso del contenido de P, Fe y CIC ocurrió lo contrario, pues se observó correlación significativa ( $\alpha = 0.05$ ) pero de forma negativa, lo cual indica que al aumentar el P, Fe y CIC disminuye la colonización por HMA; según Javaid (2009) cuando en el suelo existen bajos contenidos de fósforo los HMA colonizan eficientemente las plantas; otros autores afirman que la simbiosis planta-HMA es afectada por altas concentraciones de nutrimentos en el suelo como P, N, y Zn (Wu *et al.*, 2007; Cavagnaro, 2008). El número de esporas cuantificadas en el suelo se correlacionó positivamente obteniendo alto nivel de significancia ( $\alpha = 0.01$ ) con el contenido de N y P en

suelo, pero además tuvo correlación negativa con K, Mg y CIC; la correlación con estos dos últimos fue altamente significativa ( $\alpha = 0.01$ ) (Cuadro 5.2).

Cuadro 5.2. Correlación entre la colonización por HMA en raíces de chile poblano y las características del suelo de muestras provenientes de nueve sitios de la Sierra Nevada, estado de Puebla, México.

	pH	MO	N	P	K	Mg	Fe	CIC
CT	.538(**)	0.066	-0.191	-.246(*)	-0.039	-0.200	-.292(*)	-.402(**)
V	-0.163	-0.186	0.118	0.004	-0.196	-.242(*)	-0.110	-0.193
E	-0.077	-0.180	.471(**)	.364(**)	-.266(*)	-.562(**)	0.006	-.455(**)

CT = Colonización total, V = Vesículas y E = esporas.\*Correlación significativa ( $\alpha = 0.05$ ) y \*\*altamente significativa ( $\alpha = 0.01$ ).

### 5.3.2. Efectividad de consorcios de HMA en la promoción del crecimiento de chile poblano

Los consorcios de HMA provenientes de muestras de suelo de la rizósfera de chile poblano colectadas en los diferentes sitios y cultivadas bajo condiciones de invernadero, incrementaron el crecimiento (altura, número de hojas y área foliar) de las plantas de esta misma especie vegetal comparado con los tratamientos testigo (absoluto y fertilizados). La altura de las plantas en los tratamientos inoculados con los consorcios de HMA provenientes de los sitios uno, dos, cuatro, siete, ocho y nueve no mostraron diferencias estadísticas significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ), pero los mejores resultados se encontraron con el consorcio del sitio dos *Funneliformis* aff. *geosporum* y *Claroideoglosum* spp., mostrando diferencias significativas respecto a los demás tratamientos. La altura obtenida en este tratamiento fue de 20.3 cm,

incrementándose 289 % con respecto al testigo absoluto que presentó una altura promedio de 5.2 cm; el testigo fertilizado a base de N y K (120-00-100) presentó la menor altura promedio con 4 cm (Figura 5.1A).

El mayor número de hojas promedio (14.3) fue obtenido en las plantas inoculadas con los consorcios del sitio nueve (*Claroideoglopus*) seguido por aquellas del sitio dos con 14 hojas, los cuales fueron estadísticamente más altos que los testigos, siendo las plantas del testigo absoluto las que presentaron el menor número de hojas (4.3) (Figura 5.1B). Por otra parte, las plantas inoculadas con los consorcios de HMA provenientes de los sitios dos y cuatro presentaron la mayor área foliar (101 y 92 cm<sup>2</sup>), siendo similares estadísticamente entre ellos y superiores al comparar el comportamiento de esta variable con los tratamientos testigo (Tukey  $p \leq 0.05$ ). Los tres tratamientos testigo tuvieron menor número de hojas y área foliar, siendo el testigo absoluto (sin fertilización y sin micorriza) el que presentó los valores más bajos con cuatro hojas y 3 cm<sup>2</sup> de área foliar (Figura 5.1C).

El peso seco de hojas, tallo y raíz de las plantas de chile poblano fue afectado significativamente (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) por la inoculación de los diferentes consorcios de HMA (Figura 5.2). Los tratamientos inoculados con los consorcios provenientes del sitio dos (CS2) y cuatro (CS4) mostraron mayor producción de biomasa seca de hojas con 0.26 y 0.24 g; estos valores se incrementaron 29 y 26 veces más respecto al testigo absoluto (0.009 g), 24 y 22 veces más respecto al testigo fertilizado a base de NK (0.011 g) y 8 veces más respecto al fertilizado con NPK (0.031 g) (Figura 5.2A).

El tratamiento inoculado con el consorcio del sitio dos (CS2) fue el mejor en la producción de biomasa seca de tallo (0.17 g) y raíz (0.09 g) mostrando diferencias estadísticas significativas

respecto a los demás tratamientos (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) (Figura 5.2B y 5.2C); los tres testigos presentaron los valores más bajos de peso seco tanto en tallo (entre 0.01-0.02 g) como en raíz (entre 0.01-0.03 g). Los incrementos en el peso seco del tallo obtenidos por el tratamiento CS2 fueron de 21, 28 y 11 veces más respecto a los tratamientos testigos.

La inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en cultivos de *C. annuum* influye significativamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas en diversas condiciones, pero principalmente en invernaderos (Douds *et al.*, 2012). Así algunas especies de HMA aplicadas a cultivares de chile poblano cv. San Luis (*Glomus* sp., *G. fasciculatum*), bell pepper (*G. mosseae*, *G. claroideum*, *G. geosporum*, *G. etunicatum*), chile zazón (*G. claroideum*), y otros cultivares de *C. annuum* (*Glomus* spp., *Acaulospora* spp.) incrementaron altura, número de hojas y área foliar, que resultó en mayor producción de biomasa seca aérea y radical, y mayor producción de frutos por plantas (Mena-Violante *et al.*, 2006; Castillo *et al.*, 2009; Kaya *et al.*, 2009; Ortas *et al.*, 2011; Douds *et al.*, 2012; Cekic *et al.*, 2012; Thilagar y Bagyaraj, 2015).

El aumento en el crecimiento de *C. annuum* se debe posiblemente a que los HMA incrementan la absorción de agua y macronutrientes como fósforo, nitrógeno y potasio (Perner *et al.*, 2007), además de elementos menores como zinc, cobre, hierro, azufre, calcio (Allen, 2009), magnesio y boro (Altomare y Tringovska, 2011); adicionalmente, los HMA generan resistencia en las plantas a diversas enfermedades radicales (Lioussanne *et al.*, 2009) y foliares (Felle *et al.*, 2009) y proporcionan cierta tolerancia a nemátodos del suelo (Elsen *et al.*, 2008); también permiten a las plantas soportar condiciones ambientales adversas como la sequía (Alvarez *et al.*, 2009), salinidad (Sheng *et al.*, 2008) o alcalinidad (Labidi *et al.*, 2011).

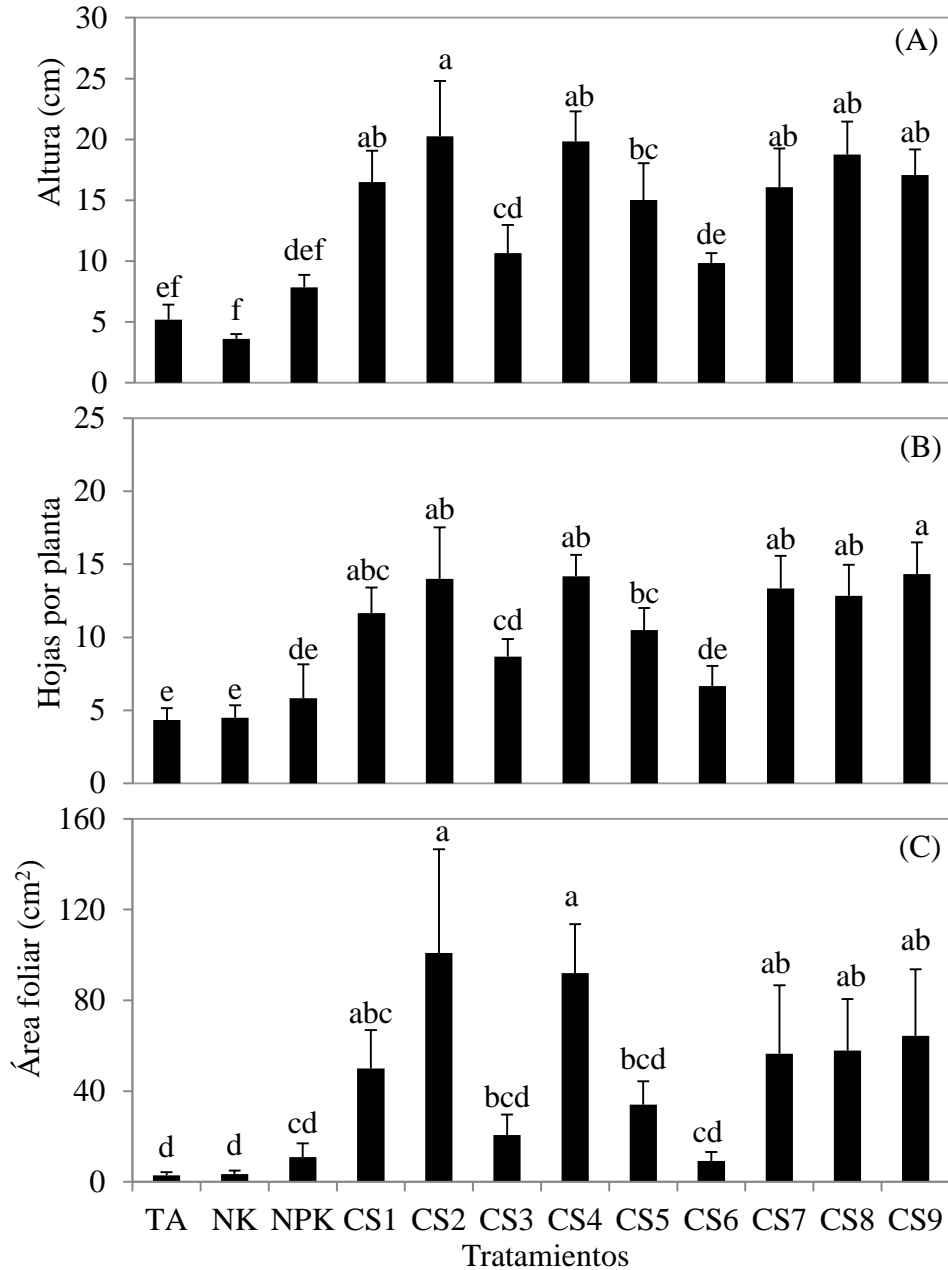


Figura 5.1. Altura (A), número de hojas (B) y área foliar (C) en chile poblano por efecto de la inoculación de consorcios de HMA provenientes de 9 sitios del estado de Puebla, después de 65 días de la siembra en invernadero. Medias  $n = 6$ ,  $\pm$  EE. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ). TA = Testigo absoluto, NK = Testigo fertilizado N y K (120-00-100), NPK = Testigo fertilizado N, P y K (120-80-100).

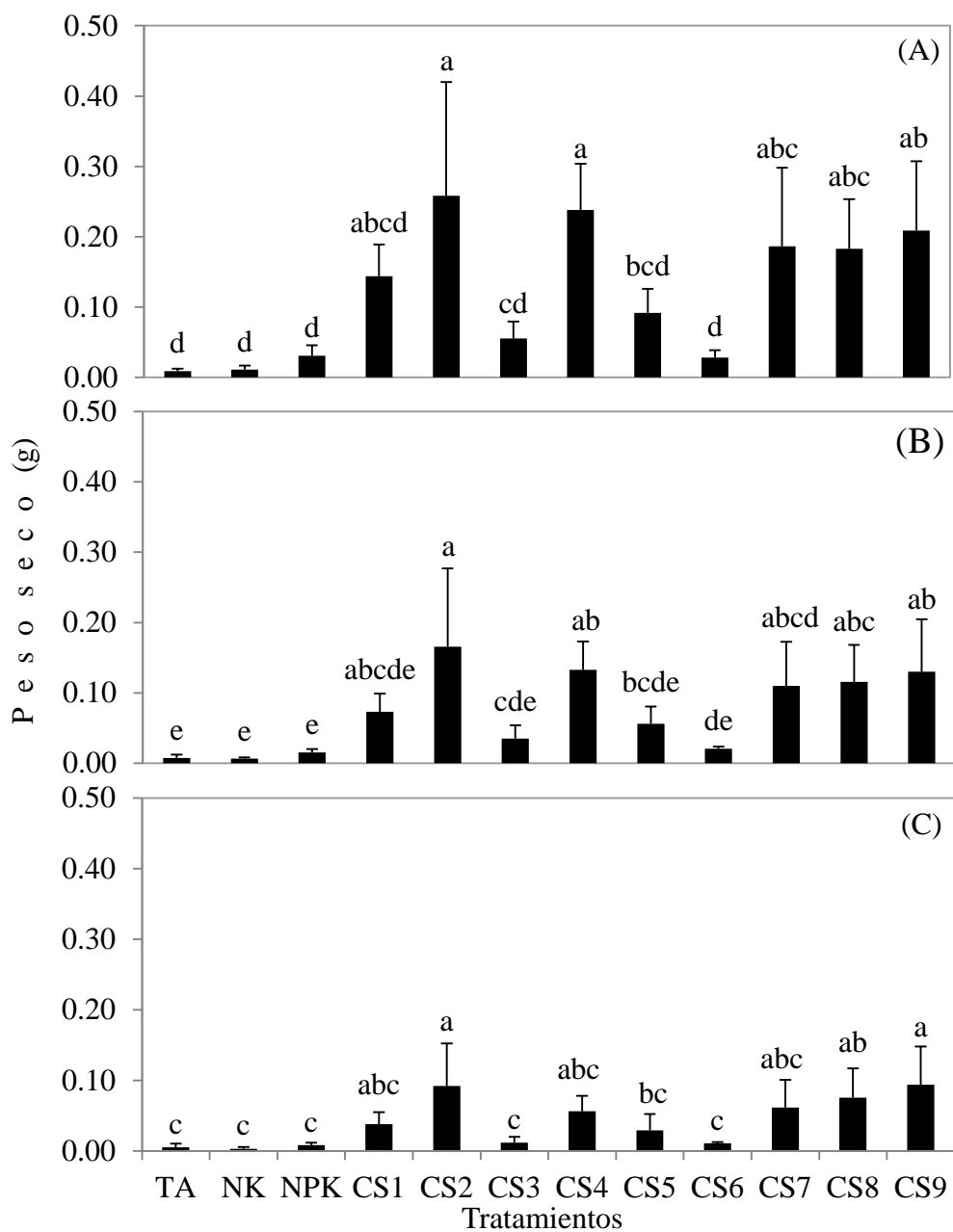


Figura 5.2. Peso seco de hojas (A), tallo (B) y raíz (C) en chile poblano por efecto de la inoculación de consorcios de HMA provenientes de 9 sitios del estado de Puebla, después de 65 días de la siembra en invernadero. Medias  $n = 6$ ,  $\pm$  EE. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ). TA = Testigo absoluto, NK = Testigo fertilizado N y K (120-00-100), NPK = Testigo fertilizado N, P y K (120-80-100).



### 5.3.3. Contenido de fósforo en planta

El contenido de fósforo en planta (tallos y hojas) al final del experimento fluctuó entre 0.22 y 0.35 %, siendo los mejores estadísticamente (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) los tratamientos inoculados con los consorcios de HMA (Figura 5.3). Los niveles de fósforo en los testigos fueron de 0.23 % (testigo absoluto), 0.22 % (fertilizado NK) y 0.25 % de P (fertilizado NPK), mientras que en las plantas tratadas con HMA el contenido de P fluctuó entre 0.24 y 0.35 % en la biomasa seca. El incremento de P en los tejidos de las plantas micorrizadas respecto a los testigos se debe probablemente a que los HMA, mediante la red de micelios, mejoraron el transporte de nutrimentos, principalmente de P como lo indica Bonfante y Genre (2010) y por que existe mayor exploración radical en las plantas colonizadas por HMA, lo que puede incrementar cinco veces más la absorción de fósforo respecto a las plantas sin HMA (Sharif y Claassen, 2011).

El mayor contenido de P (0.35 %) en tejido vegetal fue presentado por las plantas inoculadas con el consorcio 2 (*Funneliformis* aff. *geosporum* + *Claroidoglomus* spp.) (Figura 5.3). Diversos estudios han encontrado que la inoculación de especies de HMA en *Capsicum annuum* (Mena-Violante *et al.*, 2006; Sensoy *et al.*, 2007; Ortas *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010) y *C. frutescens* (Boonlue *et al.* 2012), permite mayor absorción de elementos nutritivos para las plantas, lo que coincide con lo encontrado en este trabajo donde el mayor contenido de P se obtuvo en las plantas inoculadas con HMA.

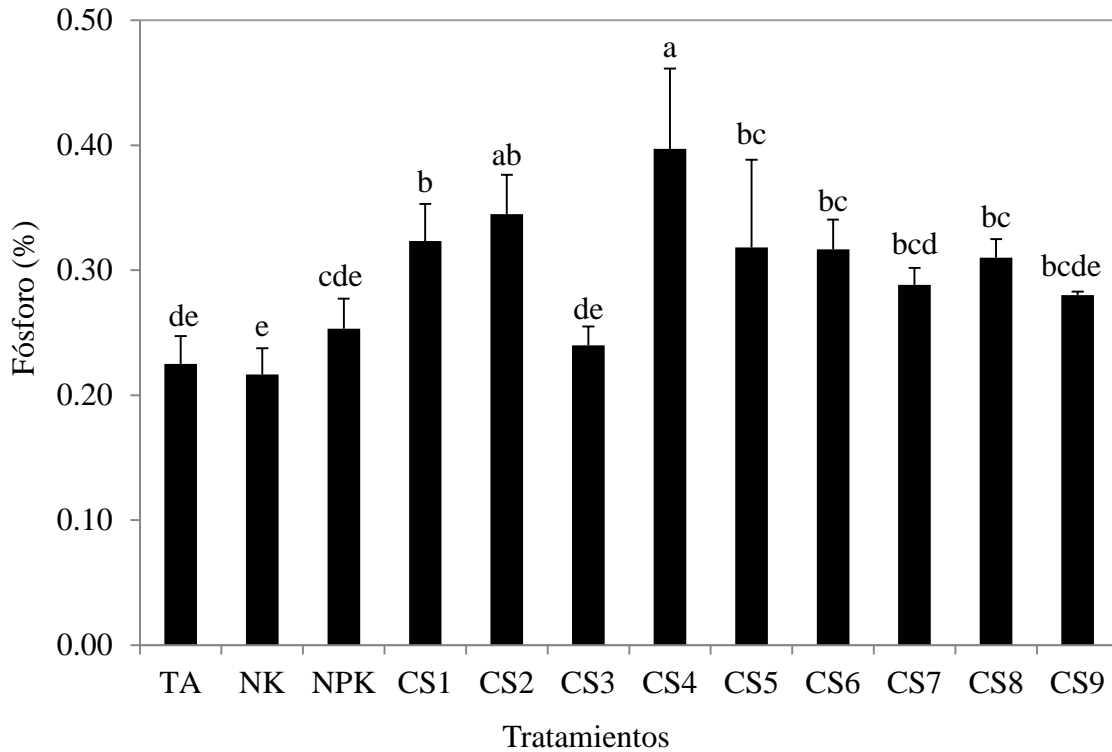


Figura 5.3. Contenido de Fósforo (%) en tejido vegetal (tallos y hojas) de chile poblano por efecto de la inoculación de consorcios de HMA provenientes de 9 sitios del estado de Puebla, después de 65 días de la siembra en invernadero. Medias  $n = 6$ ,  $\pm$  EE. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ). TA = Testigo absoluto, NK = Testigo fertilizado sin P (120-00-100), NPK = Testigo fertilizado (120-80-100).

#### 5.3.4. Consorcios de HMA

Al final del experimento se observó que se propagaron únicamente dos géneros micorrízicos en los nueve sitios inoculados; estos géneros fueron *Funneliformis* y *Claroideoglosum*, observándose mayor predominancia del consorcio *F. aff. geosporum* con *Claroideoglosum* sp., en los sitios 1, 2, 4 y 7, mientras que en el sitio ocho se encontraron tres especies diferentes de HMA (*F. aff. geosporum*, *Claroideoglosum* sp. y *C. cf. etunicatum*) y en los sitios tres y seis únicamente tuvieron la presencia de una sola especie (*C. cf. etunicatum*) (Cuadro 5.3). La predominancia de estas especies de HMA al final del experimento se debe probablemente a que estas se adaptaron mejor a las condiciones del cultivo de las plantas en invernadero, lo que incluye el tipo de sustrato utilizado, la temperatura y humedad relativa dentro del invernadero, el contenido de humedad del cultivo y la evapotranspiración del mismo que obviamente no son similares a los de campo abierto; según Kivlin *et al.* (2011) algunos de los factores que influyen en la distribución de HMA en campo son el tipo, textura y pH del suelo, evapotranspiración, humedad y la temperatura del ambiente.

La especie *Claroideoglosum etunicatum* se ubica como una de las especies más comunes y ubicuas a nivel mundial, por lo que puede ser considerada altamente competitiva debido a su habilidad para adaptarse a condiciones extremadamente diferentes comparadas con los sitios originales (Trejo-Aguilar *et al.*, 2013)

Las esporas de *Funneliformis aff. geosporum* fueron de color café oscuro sin reacción al Melzer, el diámetro fluctuó entre 71-100 µm; la pared tiene tres estratos, que en conjunto van de 4 a 7 µm de ancho; el diámetro de la hifa de sostén en la base de la espora fluctuó entre 6 y 9 µm. Las esporas de *Claroideoglosum* sp., fueron de color amarillo pálido, de 40-60 µm de

diámetro; la pared tiene cuatro estratos, que en conjunto van de 4 a 6  $\mu\text{m}$  de ancho; el diámetro de las hifas de sostén fue de 4  $\mu\text{m}$ . No se detectó reacción al Melzer, se encontraron vesículas externas, de 3-4  $\mu\text{m}$ , formadas a partir de las esporas (Figura 5.4).

La colonización total encontrada al final del experimento fluctuó entre 2 y 35 %, siendo las plantas inoculadas con el consorcio del sitio dos los de mayor colonización (35.4 %), lo que representó 4, 17 y 6 veces más respecto a la colonización encontrada por los testigos (TA, NK y NPK). El porcentaje de colonización por vesículas (V) fue relativamente bajo debido a que las plantas fueron evaluadas antes de llegar a la etapa de floración, el consorcio del sitio 2 mostró mayor colonización de vesículas con 3.6 %. Los tratamientos presentaron diferencias estadísticas significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ) en el número de esporas, siendo mejores los consorcios de los sitios cuatro (CS4) y dos (CS2), con 2370 y 2002 esporas en 100 g.s.s., mientras que los tratamientos con el menor número de esporas fueron los tres tratamientos testigos y fluctuaron entre 22 y 37 esporas en 100 g.s.s. (Cuadro 5.3).

Cuadro 5.3. Consorcios de HMA, colonización total (CT), vesículas (V) y número de esporas (E) presentes en la rizósfera de chile poblano, a los 64 días después de la siembra en invernadero.

T	Géneros de HMA identificados	CT	V	E
		----- % -----		100 g.s.s.
TA		4.0 ± 2.8 cde	0.0 ± 0.0	13.9 ± 7 c
NK		2.1 ± 2.5 e	0.0 ± 0.0	26.5 ± 8 c
NPK		3.8 ± 4.2 de	0.0 ± 0.0	14.5 ± 13 c
CS1	<i>Funneliformis</i> aff. <i>geosporum</i> y <i>Claroideoglopus</i> spp.	10.1 ± 10.5 abcde	0.0 ± 0.0	1451.2 ± 865 abc
CS2	<i>Funneliformis</i> aff. <i>geosporum</i> + <i>Claroideoglopus</i> spp.	35.4 ± 21.7 a	3.6 ± 7.3	2002.4 ± 694 ab
CS3	<i>Claroideoglopus</i> cf. <i>etunicatum</i>	5.9 ± 2.9 bcde	0.0 ± 0.0	1834.7 ± 1199 ab
CS4	<i>Funneliformis</i> aff. <i>geosporum</i> + <i>Claroideoglopus</i> spp.	24.1 ± 16 ab	0.2 ± 0.6	2369.8 ± 114 a
CS5	<i>Claroideoglopus</i> spp.	4.8 ± 5 de	0.0 ± 0.0	639.2 ± 1544 bc
CS6	<i>Claroideoglopus</i> cf. <i>etunicatum</i>	9.4 ± 2.5 abcd	0.0 ± 0.0	1522.0 ± 478 abc
CS7	<i>Funneliformis</i> aff. <i>geosporum</i> + <i>Claroideoglopus</i> spp.	20.5 ± 8.1 ab	1.9 ± 2.8	1775.5 ± 499 abc
CS8	<i>Funneliformis</i> aff. <i>geosporum</i> + <i>Claroideoglopus</i> spp. + <i>Claroideoglopus</i> cf. <i>etunicatum</i>	14.0 ± 5.6 abcd	0.0 ± 0.0	1024.2 ± 513 abc
CS9	<i>Claroideoglopus</i> spp.	19.2 ± 7.8 abc	2.5 ± 3.0	1058.1 ± 917 abc

Letras diferentes dentro de la misma columna, presentan diferencias estadísticas significativas. Medias n = 8, ± EE. (Tukey,  $\alpha = 0.05$ , a>b). T = Tratamientos, TA = Testigo absoluto, NK = Testigo fertilizado N y K (120-00-100), NPK = Testigo fertilizado N, P, K (120-80-100), CS1-CS9 = Consorcios de HMA colectados en diferentes plantaciones de chile poblano.

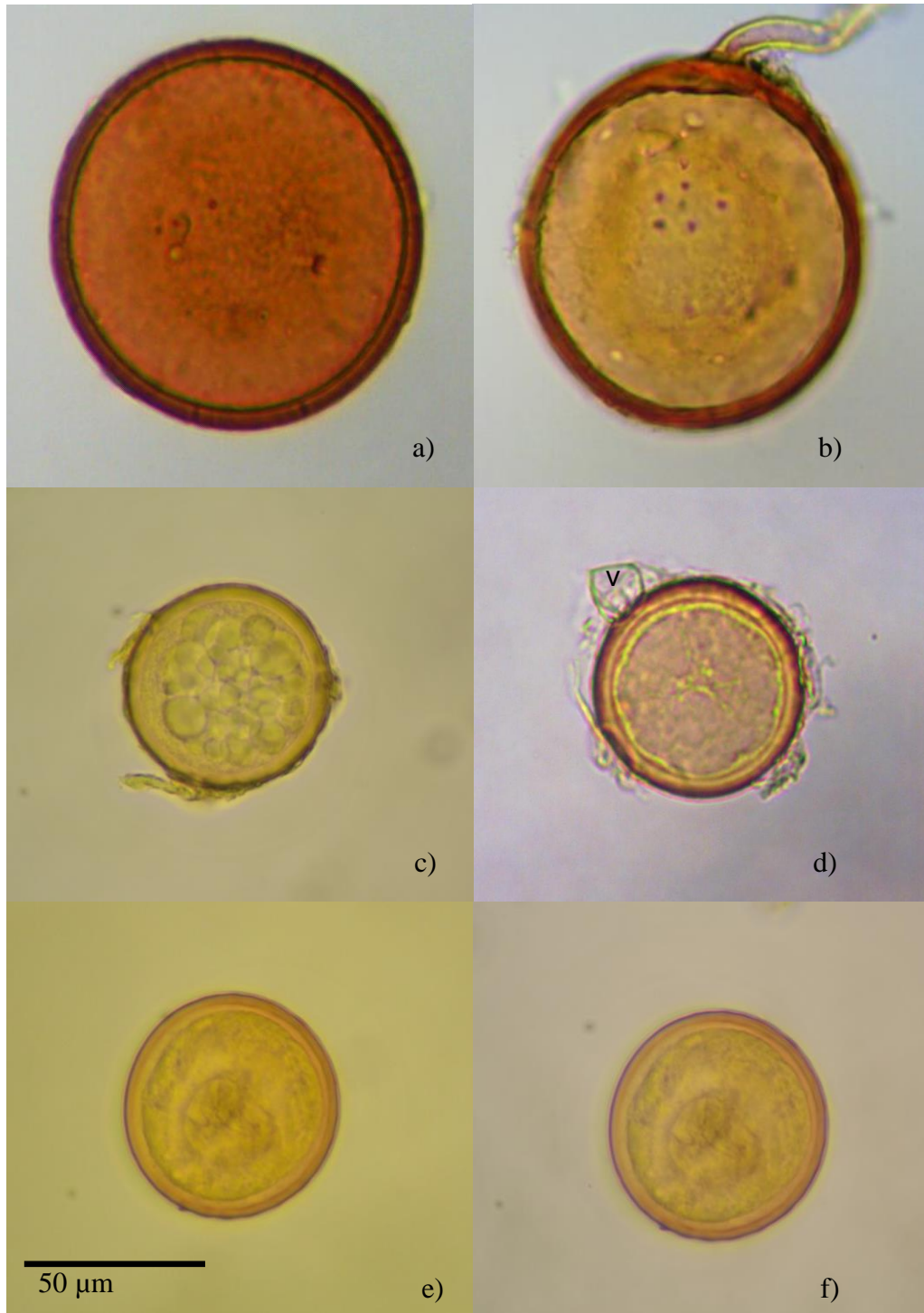


Figura 5.4. Esporas de HMA encontrados en la rizósfera de chile poblano, *Funneliformis* aff. *geosporum*: estratos (a) e hifas de sostén (b); *Claroideoglomus* sp.: hifas de sostén (c), estratos y vesículas (d); y *Claroideoglomus* cf. *etunicatum* (e) y (f).

#### 5.4. CONCLUSIONES

La colonización por HMA (total y vesículas) en la raíz de chile poblano colectados en campo mostraron diferencias significativas entre cada uno de los sitios muestreados. Todos los consorcios de los HMA ejercieron efecto positivo en el crecimiento de chile poblano en invernadero comparado con los testigos, los incrementos fueron de dos a cuatro veces mayor que el testigo absoluto. Se identificaron dos especies de HMA propagadas al final del experimento (*Funneliformis* aff. *geosporum* y *Claroideoglopus* cf. *etunicatum*) y una más identificada a nivel de género (*Claroideoglopus* spp.), los cuales tuvieron un efecto positivo en el crecimiento, reflejándose los mejores resultados en las plantas inoculadas con los consorcios provenientes de los sitios dos y cuatro (*Funneliformis* aff. *geosporum* + *Claroideoglopus* spp.).

#### 5.5. LITERATURA CITADA

- Allen M. F. 2009. Water Relations in the Mycorrhizosphere. *In: Progress in Botany*. Lüttge U., Beyschlag W., Büdel B., Francis D. (Eds). California USA: Springer Berlin Heidelberg. *Progress in Botany* 70: 257-276.
- Altomare C., Tringovska I. 2011. Beneficial Soil Microorganisms, an Ecological Alternative for Soil Fertility Management. *In: Genetics, Biofuels and Local Farming Systems*. Lichtfouse E. (ed). Springer Netherlands. *Sustainable Agriculture Reviews* 7: 161-214.
- Alvarez M., Huygens D., Fernandez C., Gacitua Y., Olivares E., Saavedra I., Alberdi M., Valenzuela E. 2009. Effect of ectomycorrhizal colonization and drought on reactive oxygen species metabolism of *Nothofagus dombeyi* roots. *Tree Physiology* 29(8): 1047-1057.
- Bago B., Pfeffer P. E., Shachar-Hill Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* 124: 949-958.
- Bierman B., Linderman R. G. 1981. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: A proposed method towards standardization. *New Phytologist* 87: 423-432.

- Bonfante P., Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications Review* 1(48): 1-11.
- Boonlue S., Surapat W., Pukahuta C., Suwanarit P., Suwanarit A., Morinaga T. 2012. Diversity and efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from organic chili (*Capsicum frutescens*) farms. *Mycoscience* 53: 10-16.
- Brundett M., Bougher N., Dell B., Grove T., Malajczuk N. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research. Lynch P. (ed). Canberra, Australia. Monograph 32. 374 p.
- Castillo C. R., Sotomayor L. S., Ortiz C. O., Leonelli G. C., Borie F. B., Rubio R. H. 2009. Effect of Arbuscular mycorrhizal fungi on an ecological crop of chili peppers (*Capsicum annuum* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research* 69(1): 79-87.
- Cavagnaro T. R., Jackson L. E., Six J., Ferris H., Goyal S., Asami D., Scow K. M. 2006. Arbuscular mycorrhizas, microbial communities, nutrient availability, and soil aggregates in organic tomato production. *Plant Soil* 282(1-2): 209-225.
- Cavagnaro T. R. 2008. The role of arbuscular mycorrhizas in improving plant zinc nutrition under low soil zinc concentrations: a review. *Plant Soil* 304: 315-325.
- Cekic F. O., Unyayar S., Ortas I. 2012. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on biochemical parameters in *Capsicum annuum* grown under long term salt stress. *Turk Journal Botany* 36: 63-72.
- Cho E. J., Lee J. D., Wee D. C., Kim L. H., Cheong Y. H. S., Cho J., Sohn K. B. 2009. Effects of AMF inoculation on growth of *Panax ginseng* C.A. Meyer seedlings and on soil structures in mycorrhizosphere. *Scientia Horticulturae* 122: 633-637.
- Davies Jr F. T., Potter J. R., Linderman R. G. 1992. Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content. *Journal of Plant Physiology* 139: 289-294.
- Douds Jr. D. D., Lee J., Rogers L., Lohman M. E., Pinzon N., Ganser S. 2012. Utilization of inoculum of AM fungi produced on-farm for the production of *Capsicum annuum*: A summary of seven years of field. *Biological Agriculture & Horticulture* 28(2): 129-145.
- Elsen A., Gervacio D., Swennen R., De Waele D. 2008. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. *Mycorrhiza* 18(5): 251-256.



- Evelin H., Kapoor R., Giri B. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany* 104(7): 1263-1280.
- Felle H. H., Waller F., Molitor A., Kogel K. H. 2009. The mycorrhiza fungus *Piriformospora indica* induces fast rootsurface pH signaling and primes systemic alkalization of the leaf apoplast upon powdery mildew infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(9): 1179-1185.
- Gerdemann J. W., Nicolson T. H. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-244.
- Hewitt E. J. 1966. The composition of the nutrient solution. *In: Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition*. Hewitt E. J. (ed). Commonwealth Bureaux of Horticulture and Plantation Crops, East Malling, Maidstone, Kent. pp 187-246.
- Honrubia M. 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66S1: 133-144.
- Javaid A. 2009. Arbuscular mycorrhizal mediated nutrition in plants. *Journal of Plant Nutrition* 32: 1595-1618.
- Kahiluoto H., Ketoja E., Vestberg M. 2009. Contribution of arbuscular mycorrhiza to soil quality in contrasting cropping systems. *Agriculture Ecosystem and Environmental* 134(1-2): 36-45.
- Kaya C., Ashraf M., Sonmez O., Aydemir S., Levent T. A., Ali C. M. 2009. The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia Horticulturae* 121: 1-6.
- Kim K., Yim W., Trivedi P., Madhaiyan M., Boruah H. P. D., Rashedul M. I., Lee G., Sa T. 2010. Synergistic effects of inoculating arbuscular mycorrhizal fungi and *Methylobacterium oryzae* strains on growth and nutrient uptake of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Soil* 327: 429-440.
- Kivlin S. N., Hawkes C. V., Treseder K. K. 2011. Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 2294-2303.

- Labidi S., Jeddi F. B., Tisserant B., Debiane D., Rezgui S., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj A. S. 2011. Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO<sub>3</sub> stress. *Mycorrhiza* 22(5): 337-345.
- Lioussanne L., Jolicoeur M., St-Arnaud M. 2009. Role of the modification in root exudation induced by arbuscular mycorrhizal colonization on the intraradical growth of *Phytophthora nicotianae* in tomato. *Mycorrhiza* 19(6): 443-448.
- Marschner P. 2007. Plant-Microbe Interactions in the Rhizosphere and Nutrient Cycling. *In*: Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems. Marschner P., Rengel Z. (eds.). Springer Berlin Heidelberg. *Soil Biology* 10: 159-182.
- Mena-Violante H., Ocampo-Jimenez O., Dendooven L., Martínez-Soto G., González-Castañeda J., Davies F. T., Olalde-Portugal V. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance fruit growth and quality of chile ancho (*Capsicum annuum* L. cv San Luis) plants exposed to drought. *Mycorrhiza* 16: 261-267.
- Ortas I., Sari N., Akpinar C., Yetisir H. 2011. Screening mycorrhiza species for plant growth, P and Zn uptake in pepper seedling grown under greenhouse conditions. *Scientia Horticulturae* 128: 92-98.
- Ozgonen H., Erkilic A. 2007. Growth enhancement and *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. *Crop Protection* 26: 1682-1688.
- Perner H., Schwarz D., Bruns C., Mäder P., George E. 2007. Effect of arbuscular mycorrhizal colonization and two levels of compost supply on nutrient uptake and flowering of pelargonium plants. *Mycorrhiza* 17: 469-474.
- Phillips J. M., Hayman D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- SAS Institute Inc. (Statistical Analysis System). 2002. Software: the SAS System for Windows version 9.0. SAS Institute Inc., Cary, NC 25513, USA.
- Sawers R. J. H., Gutjahr C., Paszkowski U. 2008. Cereal mycorrhiza: an ancient symbiosis in modern agriculture. *Trends Plant Science* 13: 93-97.

- Sensoy S., Demir S., Turkmen O., Erdinc C., Burak O. S. 2007. Responses of some different pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to inoculation with two different arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae* 113: 92-95.
- Sharif M., Claassen N. 2011. Action mechanisms of arbuscular mycorrhizal fungi in phosphorus uptake by *Capsicum annuum* L. *Pedosphere* 21(4): 502-511.
- Sheng M., Tang M., Chen H., Yang B., Zhang F., Huang Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza* 18(6-7): 287-296.
- Smith S. E., Read D. J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. 3 edition. New York, USA. 800 p.
- Subramanian K. S., Santhanakrishnan P., Balasubramanian P. 2006. Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Scientia Horticulturae* 107: 245-253.
- Thilagar G., Bagyaraj D. J. 2015. Influence of Different Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth and Yield of Chilly. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 85(1): 71-75.
- Trejo-Aguilar D., Lara-Capistrán L., Maldonado-Mendoza I. E., Zulueta-Rodríguez R., Sangabriel-Conde W., Mancera-López M. E., Negrete-Yankelevich S., Barois I. 2013. Loss of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in trap cultures during long-term subculturing. *IMA Fungus* 4(2): 161-167.
- Varela-Fregoso L. Y., González-Chávez M. C. A. 2007. Taxonomía de los hongos formadores de micorriza arbuscular. *In: Fuentes-Dávila G., Ferrera-Cerrato R. (eds) Ecología de la raíz: Segunda reimpresión. Sociedad Mexicana de Fitopatología, Ciudad Obregón, Sonora. pp 57-72.*
- Wu F. Y., Ye Z. H., Wu S. C., Wong M. H. 2007. Metal accumulation and arbuscular mycorrhizal status in metallicolous and non-metallicolous populations of *Pteris vittata* L. and *Sedum alfredii* Hance. *Planta* 226: 1363-1378.
- Zhu C. X., Song B. F., Xu W. H. 2010. Arbuscular mycorrhizae improves low temperature stress in maize via alterations in host water status and photosynthesis. *Plant Soil* 331: 129-137.

**VI. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE RIZOBACTERIAS Y HONGOS  
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN EL DESARROLLO DE CHILE POBLANO  
(*Capsicum annuum* L.) EN INVERNADERO**

**RESUMEN**

El trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto de un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (*Funneliformis* aff. *geosporum* + *Claroideoglo mus* sp.) y tres cepas de rizobacterias (*Agrobacterium vitis*, *Serratia plymuthica* y *Pseudomonas tolaasii*) en el crecimiento de chile poblano en invernadero. El experimento se realizó de agosto 2014 a enero 2015 utilizando un diseño completamente al azar. En planta se midió altura, número de hojas, la concentración de CO<sub>2</sub> en el mesófilo de las hojas (Ci), tasa de transpiración (E), conductancia estomática (gS) y la tasa de fotosíntesis (Pn), realizadas cada 15 días después del trasplante. Al final del experimento, además de las variables mencionadas se midió la producción de biomasa seca, el área foliar y el número de flores por planta; también se determinó la colonización micorrízica y el contenido de fósforo en tallos y hojas. La inoculación del consorcio de HMA + *S. plymuthica* promovió mayor altura de planta y mayor número de esporas de HMA; la combinación del consorcio HMA + *P. tolaasii* fue el mejor tratamiento el cual incrementó el número de hojas, biomasa seca (radical, foliar y tallo), área foliar, número de flores por planta y contenido de fósforo. En la raíz este tratamiento produjo mayor colonización por hifas, arbusculos y vesículas. Los tratamientos inoculados con los HMA y las rizobacterias (solos o en combinación) no tuvieron un efecto consistente en las variables Ci, E, gS y Pn.

**Palabras clave:** *Funneliformis geosporum*, *Claroideoglo mus* sp., *Agrobacterium vitis*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas tolaasii*, tasa de transpiración, tasa de fotosíntesis.

## VI. EFFECT OF THE INOCULATION OF RHIZOBACTERIA AND ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ON POBLANO PEPPER (*Capsicum annuum* L.) GROWN IN GREENHOUSE

### ABSTRACT

This work was carried out in order to determine the effect of a consortium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (*Funneliformis* aff. *geosporum* + *Claroideoglosum* sp.) and three strains of rhizobacteria (*Agrobacterium vitis*, *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas tolaasii*) on plant growth of poblano pepper in greenhouse conditions. The experiment was conducted from August 2014 to January 2015, using a completely randomized design. The height, leaf number, concentration of CO<sub>2</sub> in the leaf mesophyll (Ci), transpiration rate (E), stomatal conductance (gs) and photosynthetic rate (Pn) were measured every 15 days after transplantation. In addition, at the end of the experiment, dry biomass, leaf area and number of flowers per plant, mycorrhizal colonization and phosphorus content were determined. Inoculation with HMA + *S. plymuthica* promoted greater plant height and number of spores; the combination of consortium HMA + *P. tolaasii* was the best treatment which increased number of leaves, dry biomass (root, leaf and stem), leaf area, number of flowers per plant and phosphorus content. On plant roots this treatment produced higher mycorrhizal colonization, including hyphae, arbuscules and vesicles. The treatments inoculated with AMF and rhizobacteria (alone or in combination) had no consistent effect on the variables of Ci, E, gS and Pn.

**Palabras clave:** *Funneliformis geosporum*, *Claroideoglosum* sp., *Agrobacterium vitis*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas tolaasii*, transpiration rate, photosynthetic rate.

## 6.1. INTRODUCCIÓN

Las interacciones mutualistas entre plantas y microorganismos son un componente importante en el crecimiento y productividad de las plantas (Lambers *et al.*, 2009). Los grupos microbianos más importantes que se asocian a las plantas son los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), mismos que se encuentran en simbiosis con más del 80 % de las plantas terrestres (Smith y Read, 1997), y las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV), que colonizan la raíz y su zona de influencia denominada rizósfera (Kim *et al.*, 2011).

La interacción entre las RPCV y los HMA ha sido ampliamente estudiada, principalmente por los efectos benéficos en las plantas cuando ambos microorganismos son inoculados, pues producen como resultado una mayor sanidad y crecimiento (Barea *et al.*, 2005; Bending *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Armada *et al.*, 2015). Estas interacciones ocurren en la zona del suelo que rodea a la raíz y al micelio fúngico conocido como micorrizósfera (Artursson *et al.*, 2006). Los mecanismos por los cuales ocurre la interacción entre estos microorganismos aún no son bien conocidos, aunque se sabe de su importancia en las plantas (Nadeem *et al.*, 2014).

Ciertas bacterias llamadas “bacterias ayudantes de micorrización” (BAM) por sus siglas en inglés MHB (*mycorrhization helper bacteria*), colonizan el micelio fúngico y la micorrizósfera con lo que aumentan la cantidad de exudados radicales, promoviendo mayor colonización radical por los HMA (Barea *et al.*, 2005) y estimulan la germinación de esporas y crecimiento micelial (Frey-Klett *et al.*, 2007). Los HMA también benefician a las comunidades bacterianas y son considerados como el medio de transporte de las RPCV del suelo hacia las plantas (Kohlmeier *et al.*, 2005), lo que impacta a la composición de las

comunidades bacterianas (Artursson *et al.*, 2006).

Las RPCV y los HMA juegan un papel importante en la mejora del crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos. Las RPCV pueden inhibir la síntesis del etileno, producir fitohormonas, exopolisacáridos y sideróforos, e inducir resistencia sistémica en las plantas (Chauhan *et al.*, 2015); los HMA contribuyen a la nutrición de la planta a través de la producción de enzimas, mejoran el sistema antioxidante, modifican la arquitectura radical, aumentan la eficiencia en el uso del agua y modifican el pH de la rizósfera (Smith y Smith, 2012; Nadeem *et al.*, 2014; Elbon y Whalen, 2014). La inoculación de ambos organismos genera mayor resistencia a factores como la salinidad, la sequía, inundaciones, temperaturas altas o bajas, metales pesados y patógenos del suelo, que pueden ser limitantes para el desarrollo de las plantas (Nadeem *et al.*, 2014).

La inoculación con RPCV y HMA nativos aumentan los beneficios para las plantas debido a que estos se adaptan fisiológica y genéticamente a las condiciones de estrés del entorno de origen (Armada *et al.*, 2015). En este estudio se evaluó el efecto de un consorcio micorrízico a base de *Funneliformis* aff. *geosporum* + *Claroideoglossum* sp. y de las cepas de rizobacterias de las especies *Agrobacterium vitis*, *Serratia plymuthica* y *Pseudomonas tolaasii* en el crecimiento de chile poblano cultivado bajo condiciones de invernadero. El consorcio de HMA y las cepas de RPCV se aislaron de cultivares de chile poblano.

## **6.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.2.1. Material biológico, siembra e inoculación**

Se usaron tres cepas de rizobacterias (*Agrobacterium vitis* CPPC5, *Serratia plymuthica* CPPC4, *Pseudomonas tolaasii* P61) y un consorcio de HMA (*Funneliformis* aff. *geosporum* +

*Claroidoglomus* spp.). Las cepas de rizobacterias CPPC4 y CPPC5 se aislaron de la rizosfera de chile poblano, en la Sierra Nevada del estado de Puebla, mientras que la cepa P61 fue obtenida del Laboratorio de Microbiología del Colegio de Postgraduados. Esta última proviene del Valle de Toluca, estado de México y fue aislada de la rizosfera de papa. El consorcio de HMA se obtuvo de suelo rizosférico de chile poblano, también del estado de Puebla.

El consorcio de HMA utilizado fue el proveniente de San Matías Tlalancaleca, Puebla, el cual fue mantenido como inóculo durante 8 meses en cultivo trampa con pasto Raygrass (*Lolium multiflorum*) y sustrato a base de una mezcla de peat moss, perlita y vermiculita (1:1:1). Se utilizó una variedad criolla de chile poblano de la región de la Sierra Nevada, estado de Puebla. Las semillas fueron desinfectadas con cloro al 1 % durante tres minutos y lavadas tres veces con agua destilada estéril, el sustrato utilizado fue una mezcla de peat moss, perlita y vermiculita (1:1:1) debidamente esterilizado en autoclave a 18 lb de presión durante tres horas por tres días consecutivos.

El HMA fue inoculado al momento de la siembra en charolas de poliestireno de 200 cavidades, para esto se colocó en cada cavidad el sustrato y el inóculo de HMA en proporción 1:1. El número de esporas en promedio fue de 94 ( $\pm$  8 EE) en 6 g de inóculo utilizado por cavidad. Después de colocar el inóculo de HMA se sembraron dos semillas de chile poblano en cada cavidad. Los semilleros se regaron con suficiente agua para matener la humedad.

Las tres cepas de rizobacterias fueron cultivadas en caldo nutritivo en agitación constante por 3 días a 28 °C con el objeto de obtener una alta concentración de bacterias. Las plántulas fueron inoculadas 18 días después de la siembra agregando un mL de cultivo bacteriano



conteniendo en promedio  $16 \times 10^9$  (B1),  $11 \times 10^9$  (B2) y  $2 \times 10^9$  (B3) UFC mL<sup>-1</sup>. El trasplante se realizó 87 días después de la siembra, tiempo que se consideró una apropiada colonización por los HMA en las raíces de chile poblano, se transplantaron dos plantas por macetas (bolsas), eliminando una de ellas después de diez días.

### **6.2.2. Tratamientos y diseño experimental**

Se tuvieron ocho tratamientos con ocho repeticiones cada uno, los cuales se muestran en el Cuadro 6.1. Los tratamientos se establecieron en un diseño experimental completamente al azar. En total fueron 64 unidades experimentales donde cada unidad experimental consistió en una bolsa de polietileno color negro de 30 x 30 cm, a la cual se le agregó aproximadamente 5 kg de la mezcla del sustrato antes mencionada y debidamente homogenizada; en cada bolsa se trasplantó una plántula.

La altura inicial y el número de hojas para cada tratamiento al momento del trasplante mostraron diferencias significativas entre ellas por efecto de la combinación HMA-RPCV. La colonización por HMA fluctuó entre 6 y 25 % de hifas, sobresaliendo el tratamiento tres (HMA + B3) (Cuadro 6.2). Se aplicaron riegos con agua destilada cada tercer día, y cada 15 días con solución nutritiva Long Ashton modificada para suministrar 11 µg por mL<sup>-1</sup> de fósforo (Hewitt, 1966).

Cuadro 6.1. Tratamientos de HMA y RPCV usados en el experimento de chile poblano cultivadas en invernadero.

Tratamiento	Clave
Hongo micorrízico arbuscular + Cepa CPPC5	HMA+B1
Hongo micorrízico arbuscular + Cepa CPPC4	HMA+B2
Hongo micorrízico arbuscular + Cepa P61	HMA+B3
Hongo micorrízico arbuscular	HMA
Cepa CPPC5	B1
Cepa CPPC4	B2
Cepa P61	B3
Testigo sin HMA y sin rizobacteria	TA

Cuadro 6.2. Colonización por HMA, altura y número de hojas en plántulas de chile poblano al momento del trasplante en invernadero.

Tratamiento	Colonización HMA (%)			Variables en planta	
	CT	Arbúsculos	Vesículas	Altura (cm)	Número de hojas
HMA+B1	16.7	2.8	2.3	15.6	11.1
HMA+B2	6.9	0.5	0.5	17.8	10.9
HMA+B3	24.5	4.2	3.2	16.3	11.3
HMA	5.6	0.5	0.5	16.1	8.5
B1	0	0	0	11.0	6.0
B2	0	0	0	11.4	6.6
B3	0	0	0	11.6	6.0
TA	0	0	0	11.6	5.9

CT = Colonización total

### 6.2.3. Medición de variables en planta

En planta se midió altura, número de hojas, concentración de CO<sub>2</sub> en el mesófilo de la hoja (Ci), tasa de transpiración (E), conductancia estomática (gS) y la tasa de fotosíntesis (Pn); dichas mediciones se realizaron cada 15 días aproximadamente después del trasplante. Al final del experimento, 94 días después del trasplante, se evaluaron además de las variables mencionadas la producción de biomasa seca, área foliar, número de flores, colonización por HMA y el contenido de fósforo en las plantas.

La altura se midió con una regla graduada y se expresó en cm. El área foliar se determinó con un medidor de área foliar (Area Meter, Modelo LI-3100; Nebraska, USA). La biomasa seca se determinó al separar parte aérea (tallos y hojas) y radical de la planta y secarlas a peso constante en un horno (FELISA, Modelo 242-A, D.F. México) a 70 °C por 72 horas; el peso seco de las plántulas se cuantificó en una balanza analítica (Sartorius, Modelo Analytic AC 210S, Illinois, USA).

En una hoja joven y totalmente expandida de cada planta se determinó la Ci (ppm), E (mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), gS (mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y la Pn (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), dicha evaluación se realizó en las horas de mayor iluminación (10:00-15:00 horas) con un medidor portátil de fotosíntesis PPSystems (modelo CIRAS-II, MA, USA).

La colonización por HMA en las raíces de chile poblano se evaluó mediante la técnica de clareo y tinción con azul tripano (Phillips y Hayman, 1970) y el porcentaje de colonización total (PCT) fue estimado por el método de Biermann y Linderman (1981). El número de esporas se determinó en 100 g de sustrato siguiendo el método de tamizado y decantado en húmedo (Gerdemann y Nicolson, 1963) y fue expresado en 100 g de suelo seco.

El contenido de fósforo en el material vegetal se determinó por colorimetría del fosfovanadomolibdato. El material se digesto vía húmeda (digestión ácida) y para ello se pesaron 0.25 g de tejido vegetal (tallo y hojas), se colocaron en matraces, se les agregaron 6 mL de una solución a base de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) y ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) (relación 4:2), se dejaron reposar durante un día (predigestado) y se colocaron en una plancha a  $360\text{ }^\circ\text{C}$  durante seis horas. Finalizada la digestión (solución madre), se vació la muestra en un matraz de 25 mL y se aforó con agua destilada. Se filtró con papel filtro Watman No. 2 y se tomó una alícuota de 10 mL vaciándolo en un matraz de 50 mL. Se agregaron 7.5 mL de la mezcla (2.5 mL de vanadato de amonio, 2.5 mL de molibdato de amonio y 2.5 mL de ácido nítrico) al matraz de 50 mL aforándose con agua destilada. Se dejó reposar por 30 minutos y se tomaron alícuotas de 150  $\mu\text{l}$ , las cuales se colocaron en microplacas para realizar la lectura en un espectrofotómetro a 470 nm.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS para Windows (SAS Institute Inc. 2002), realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

### **6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **6.3.1. Número de esporas y colonización radical por HMA**

El mayor porcentaje de colonización por HMA ocurrió en los tratamientos inoculados con el hongo micorrízico arbuscular, solos o en combinación con las cepas bacterianas, encontrándose diferencias estadísticas significativas respecto a los tratamientos inoculados con rizobacterias o al testigo absoluto (Tukey  $p < 0.05$ ). Estadísticamente, los cuatro grupos de plantas tratados con HMA no mostraron diferencias estadísticas entre ellos, pero

numéricamente fue mejor el tratamiento tres (HMA + B3) al presentar mayor porcentaje de colonización en hifas (39 %), arbuscúlos (27 %) y vesículas (28 %). El número de esporas cuantificado mostró diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, siendo numéricamente mejor el tratamiento HMA + B2 con 1830 esporas en 100 de sustrato seco. Las plantas que no fueron inoculadas con HMA incluyendo al testigo, no presentaron colonización en raíces (hifas, arbuscúlos y vesículas) ni esporas en el sustrato (Cuadro 6.3).

Las plantas inoculadas con HMA y con la cepa *P. tolassii* P61 (HMA + B3) presentaron mayor colonización por hifas, arbuscúlos y vesículas aun cuando la colonización no fue significativa con respecto a los otros tratamientos inoculados con HMA, puede considerarse que la cepa P61 puede estimular la micorrización, esta es una cepa bacteriana que ayuda la micorrización (BAM); al respecto Tanwar y Aggarwal (2014) mencionan que *P. tolassii* permite mayor germinación de esporas y crecimiento micelial de HMA, mientras que *P. putida* induce mayor micorrización por *Gigaspora rosea* en pepino (Gamalero *et al.*, 2008); otros géneros identificados como BAM son *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* y *Rhodococcus* (Bending *et al.*, 2006).

Cuadro 6.3. Porcentaje de colonización por HMA en raíces de chile poblano y número de esporas en 100 g de suelo seco a los 94 días después del trasplante.

Tratamientos	Hifas	Arbúsculos	Vesículas	Esporas
	----- (%) -----			(100 gss)
HMA+B1	33 ± 14 a	23 ± 6 a	24 ± 9 a	1436 ± 446 ab
HMA+B2	28 ± 7 a	22 ± 4 a	22 ± 5 a	1830 ± 903 a
HMA+B3	39 ± 19 a	27 ± 12 a	28 ± 16 a	1543 ± 986 ab
HMA	31 ± 16 a	25 ± 7 a	27 ± 15 a	977 ± 559 b
B1	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 c
B2	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 c
B3	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 c
T	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b	0 ± 0 c

Letras diferentes dentro de la misma columna, presentan diferencias estadísticas significativas. Medias n = 8, ± EE. (Tukey,  $\alpha = 0.05$ , a>b).

### 6.3.2. Respuestas en variables de crecimiento

Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para altura de planta (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Las plantas inoculadas con HMA en combinación con rizobacterias (tratamientos HMA + B1, HMA + B2, HMA + B3) mostraron incrementos de 25, 41 y 35 % más en altura comparado con el testigo (tratamiento TA). La mejor combinación fue el HMA con *S. plymuthica* (tratamiento HMA + B2), la altura final de este tratamiento fue de 37.4 cm, siendo 41 % mejor respecto al testigo (26.5 cm) (Figura 6.1).

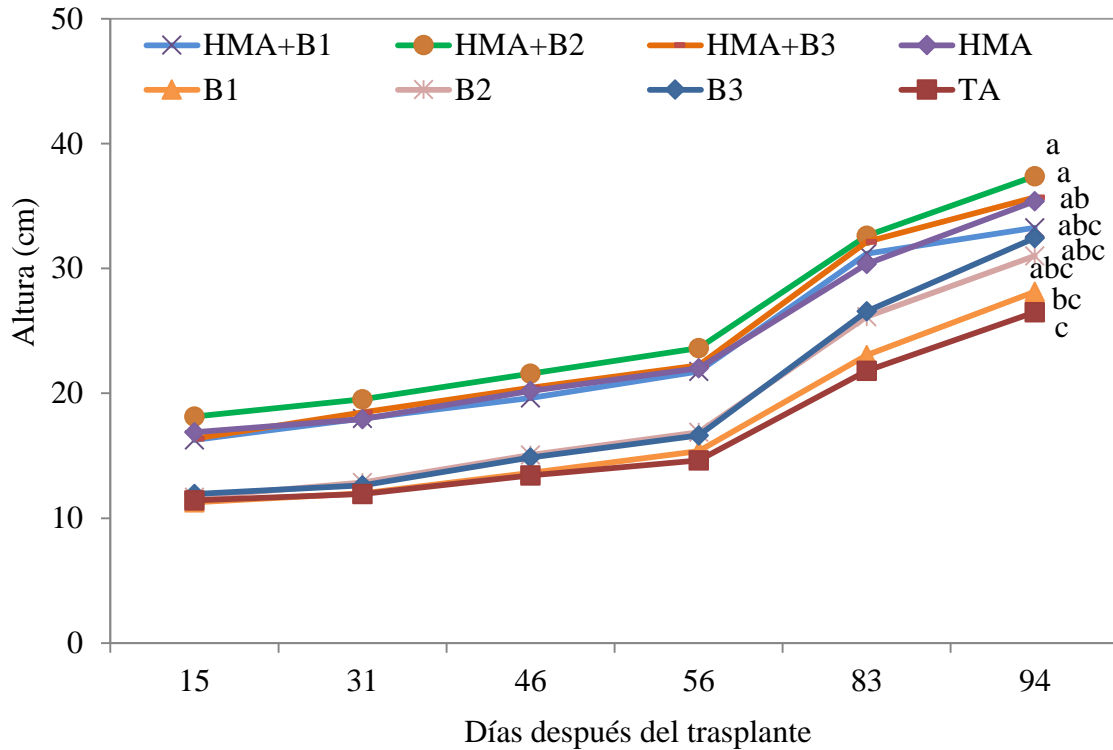


Figura 6.1. Altura de plantas de chile poblano por efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias  $n = 8$ ,  $\pm$  EE. Letras diferentes en las líneas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ).

El mayor número de hojas por plantas se encontró en el tratamiento que combinó los HMA y la cepa de rizobacteria P61 (tratamiento HMA+B3). La mayoría de los tratamientos donde se inocularon los HMA-RPCV tuvieron incrementos entre 38 y 66 % más el número de hojas que el testigo. El tratamiento inoculado con *Agrobacterium vitis* (B1) no incrementó significativamente el número de hojas. Estadísticamente durante todo el desarrollo de las plantas, el mejor tratamiento fue el de HMA+B3 como se observa en la Figura 6.2. Este tratamiento al final del experimento tuvo 30 hojas por plantas.

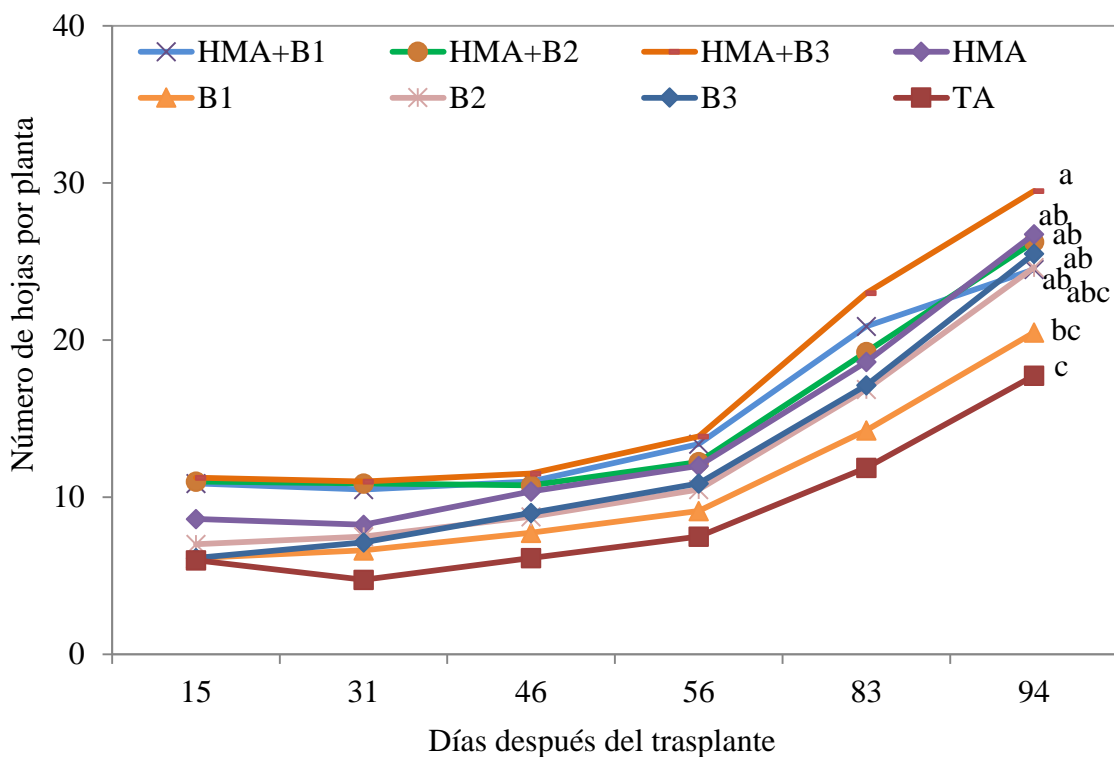


Figura 6.2. Número de hojas en plantas de chile poblano por efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias  $n = 8, \pm EE$ . Letras diferentes en las líneas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05, a > b$ ).

Las plantas de los tratamientos inoculados con HMA y las RPCV, sean solas o en combinación, mostraron incrementos significativos (Tukey  $p < 0.05$ ) en área foliar respecto a las plantas no inoculadas (testigo). Los incrementos fueron entre 30 y 62 % cuando se combinaron los HMA con las rizobacterias, el HMA sin la rizobacteria incrementó 58 % más el área foliar que el testigo, mientras que las RPCV sin el HMA incrementaron entre 2-49 % más que el testigo. La mejor combinación fue el del HMA y la cepa *P. tolaasii* (tratamiento HMA+B3) que presentó un área foliar de 209 cm<sup>2</sup>, siendo 62 % más respecto al testigo (TA,



130 cm<sup>2</sup>). El tratamiento cinco HMA+B1 no tuvo efecto en el área foliar comparado con el testigo (Figura 6.3).

Al final del experimento las plantas se encontraban en inicios de floración. En promedio el número de flores fluctuó entre 4 a 6 flores por planta. Estadísticamente todos los tratamientos fueron similares (Figura 6.4).

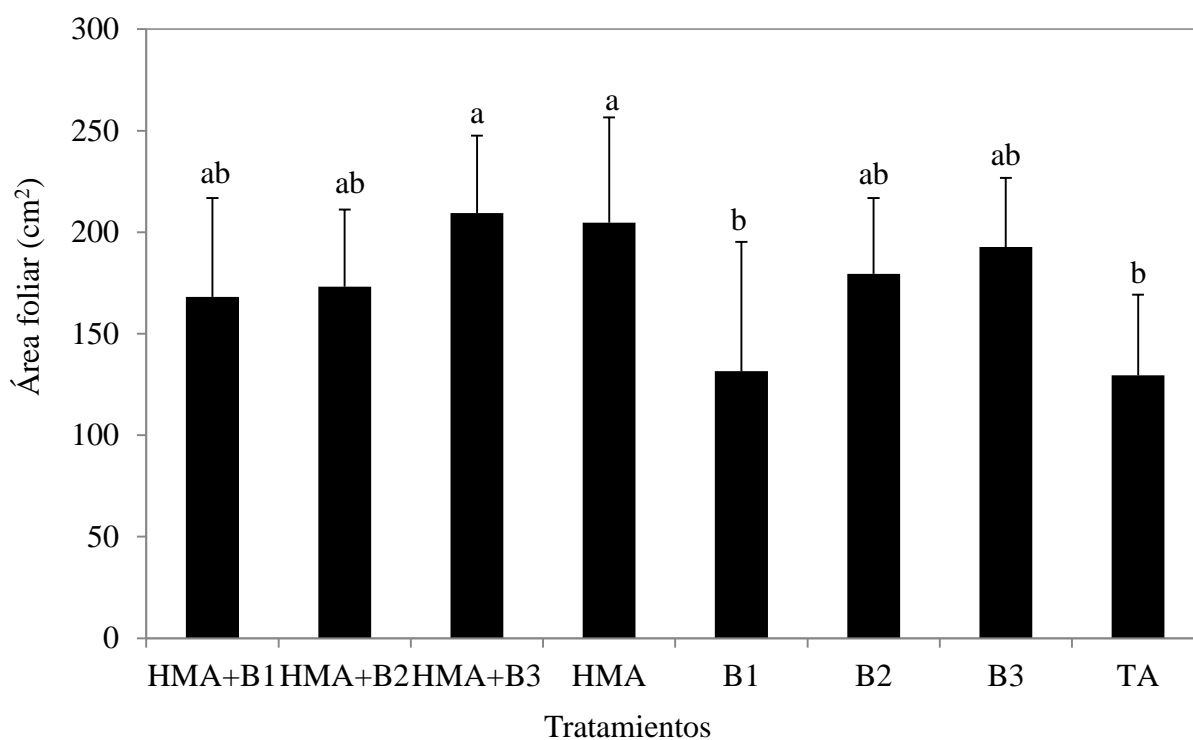


Figura 6.3. Área foliar (cm<sup>2</sup>) en plantas de chile poblano por el efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias n = 8, ± EE. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05$ , a>b).

La combinación de HMA con las RPCV permitió mayor producción de biomasa radical, foliar y tallo en plantas de chile poblano cultivadas en invernadero (Figura 6.5). La combinación del HMA con la cepa de rizobacteria *P. tolaasii* (HMA+B3) tuvo el mejor efecto en la producción de biomasa seca radical (0.29 g), foliar (0.56 g) y tallo (0.6 g). Este tratamiento permitió

obtener 1.45 g de biomasa seca total, seguido por el tratamiento HMA+B2 con 1.25 g; los tratamientos que se inocularon con HMA y/o rizobacterias presentaron un peso seco entre 21 y 140 % más respecto al testigo, el cual obtuvo los valores más bajos con 0.11, 0.26 y 0.24 g de biomasa seca radical, de hojas y tallo, respectivamente (Figura 6.5).

El incremento observado en los valores de las variables de crecimiento en chile poblano por el efecto de la inoculación de HMA en combinación con *S. plymuthica* y *P. tolaasii*, probablemente se deba a la excelente habilidad de estas rizobacterias para colonizar las raíces (De Vleeschauwer y Hofte, 2007; Harman, 2006) y posiblemente por su influencia en el crecimiento de micelios y germinación de esporas fúngicas (Tanwar y Aggarwal, 2014), esto permitió una adecuada colonización por HMA. En otros estudios se ha observado que mayor colonización aumenta la superficie de absorción de la raíz de la planta, principalmente de agua, fósforo y demás elementos nutritivos (Giri y Mukerji, 2004). Por otra parte la simbiosis micorrízica es conocida por ser un gran sumidero de carbono fijado durante la fotosíntesis por las plantas hospederas, el cual puede variar entre 4 y 20 % del total de los fotoasimilados (Smith y Read, 2008). En *C. annuum* se han inoculado *Methylobacterium oryzae* combinadas con HMA (*Acaulospora longula*, *Glomus clarum* y *G. intraradiaces*) observando efectos benéficos en altura y biomasa seca (Kim *et al.*, 2010).

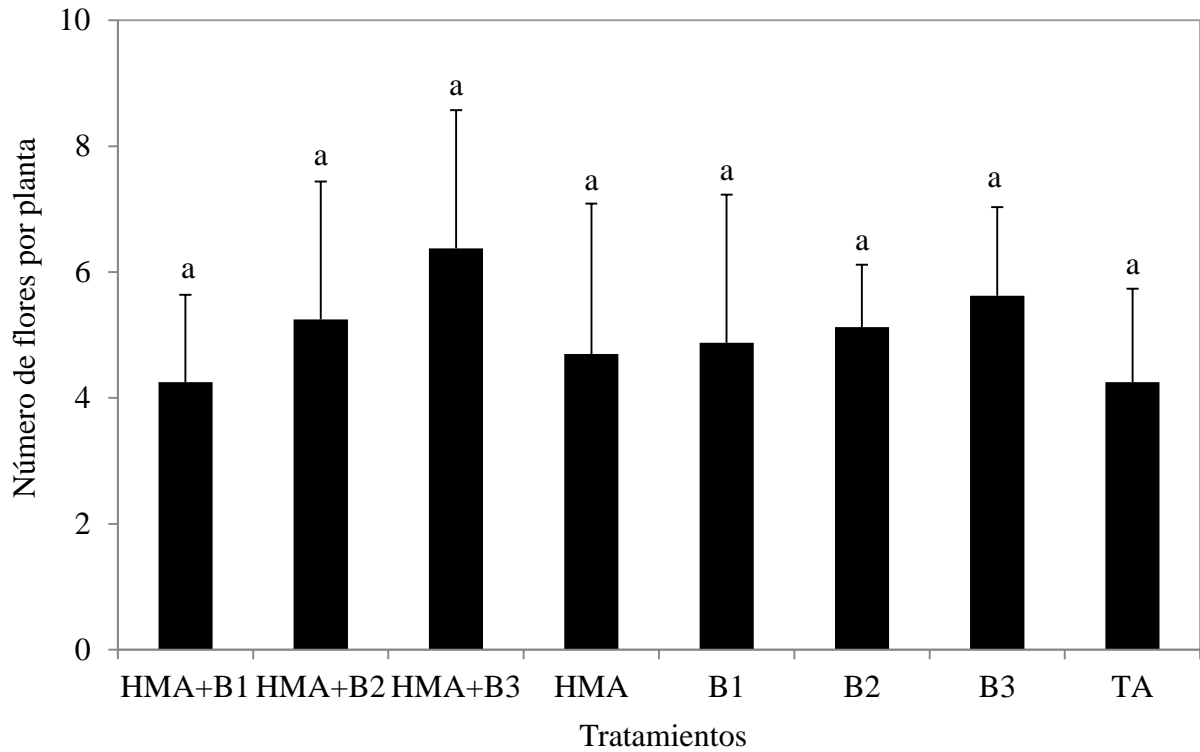


Figura 6.4. Número de flores por planta en chile poblano por el efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias  $n = 8, \pm EE$ . Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05, a>b$ ).

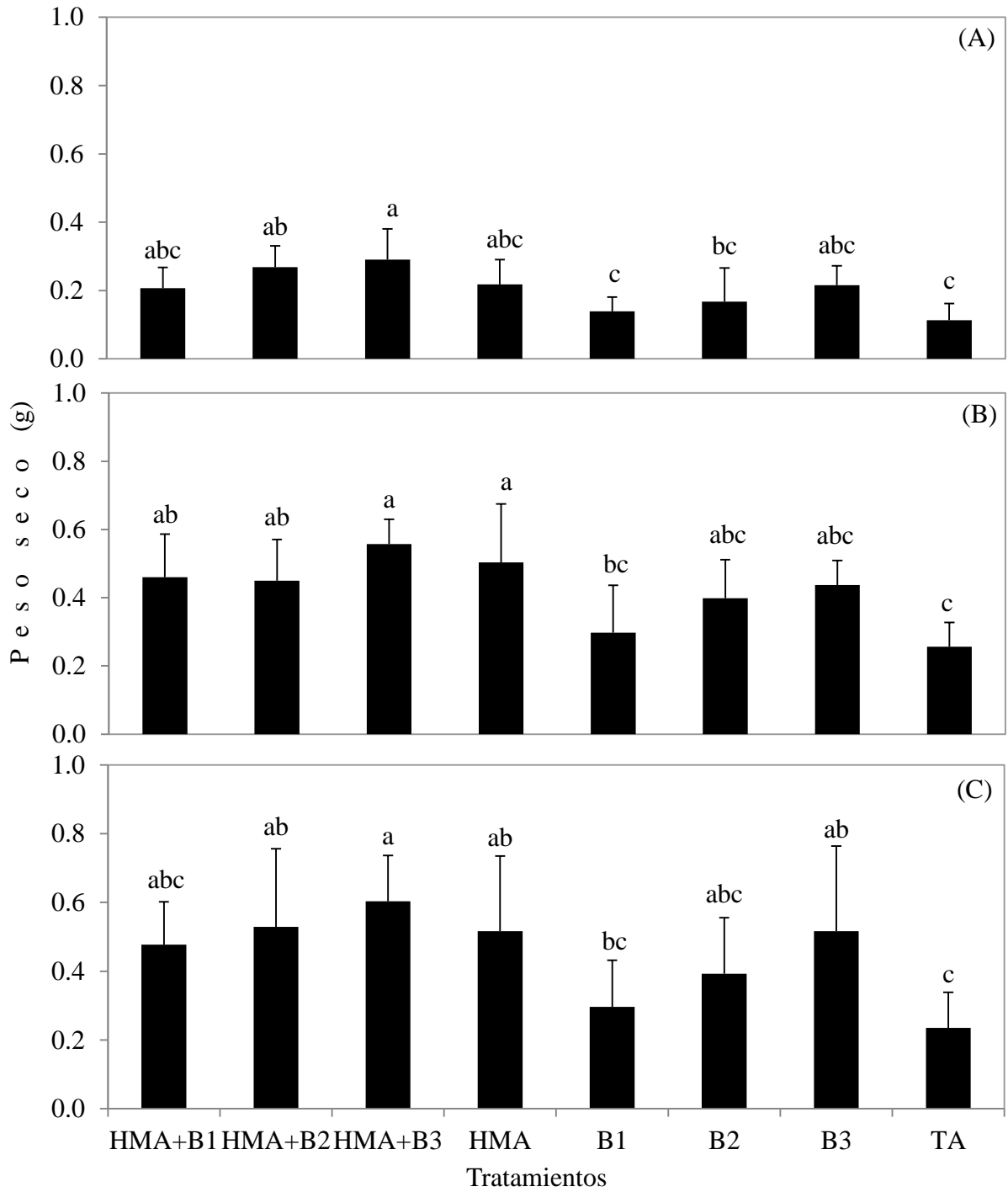


Figura 6.5. Peso seco de raíz (A), hojas (B) y tallo (C) en plantas de chile poblano por el efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias  $n = 8$ ,  $\pm$  EE. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ).

### 6.3.3. Intercambio de gases

La concentración interna de CO<sub>2</sub> en el mesófilo de las hojas de chile poblano fluctuó a lo largo del desarrollo de las plantas. Los resultados de la primera evaluación a los 36 ddt mostraron grandes diferencias entre cada uno de los tratamientos, siendo el más bajo (238 ppm) el tratamiento con la cepa de rizobacteria *S. plymuthica* CPPC4 (B2) y el más alto (341 ppm) fue el tratamiento HMA+B2. Este último tratamiento fue disminuyendo en las siguientes dos evaluaciones, tanto que a los 56 ddt obtuvo la Ci más baja (255 ppm), posteriormente demostró un ligero incremento en las dos ultimas fechas hasta ser el mejor (294 ppm) y finalmente a los 94 ddt fue 5 % más alto (281 ppm) comparado con el testigo (Figura 6.6).

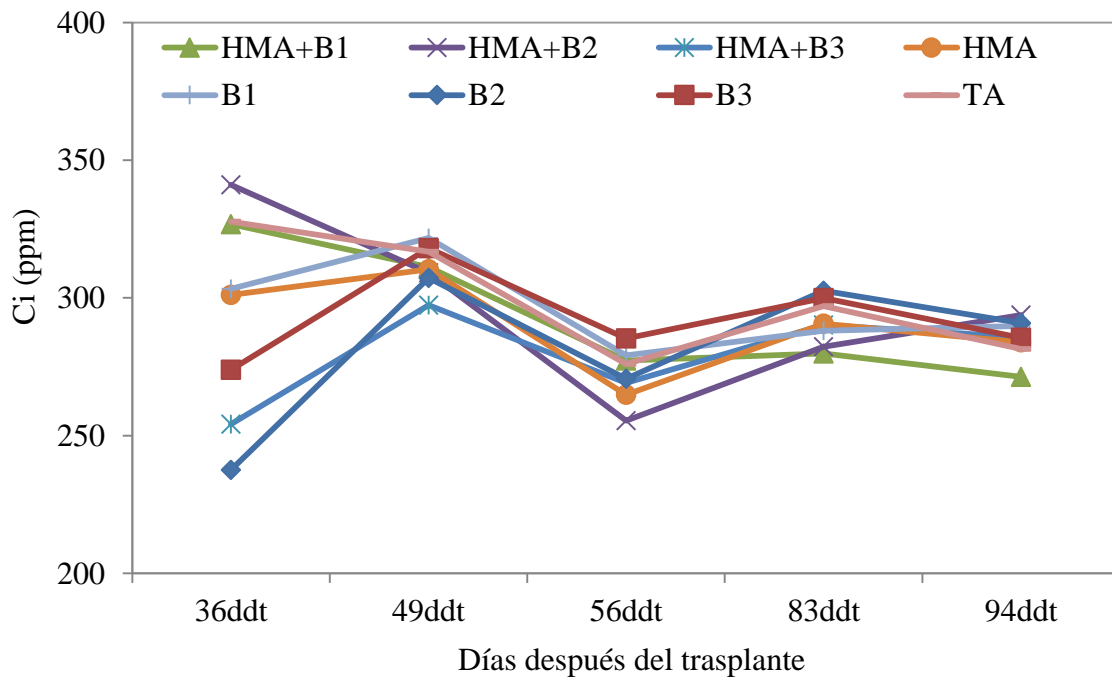


Figura 6.6. Concentración interna de CO<sub>2</sub> Ci en el mesófilo de la hoja en plantas de chile poblano por el efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias n = 8.

Lo contrario a la concentración interna de CO<sub>2</sub>, la tasa de transpiración E, tuvo un comportamiento ascendente y los promedios de los datos obtenidos en cada evaluación no mostraron mucha dispersión entre cada tratamiento (Figura 6.7). Al final del experimento el tratamiento inoculado con HMA y la cepa *S. Plymouthica* CPPC4 (tratamiento HMA+B2) fue mejor en la tasa de transpiración (2.6 mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). El tratamiento testigo (TA) generalmente se mantuvo en la parte media entre el valor más bajo y el más alto. La combinación de HMA y RPCV fueron sobresalientes al mostrar los valores más altos de transpiracion.

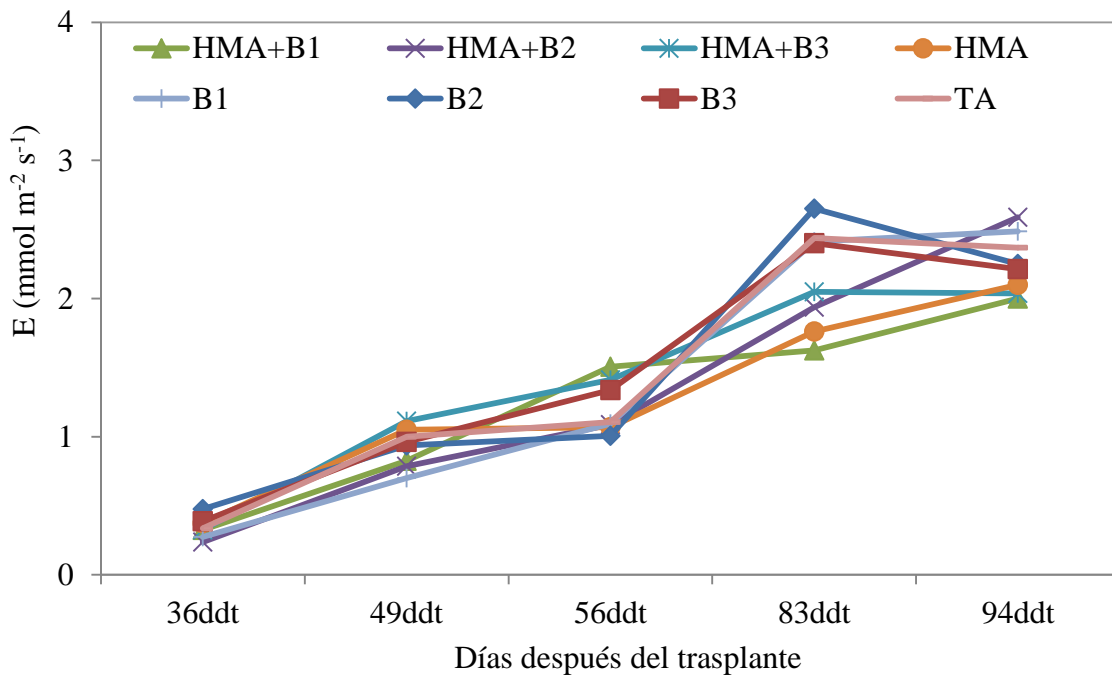


Figura 6.7. Tasa de transpiración E en plantas de chile poblano por el efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias n = 8.

La conductancia estomática (gS) mostró un comportamiento similar a la tasa de transpiración. Los valores de esta variable en todos los tratamientos fueron similares durante los primeros 56 días después del trasplante. Las diferencias más altas entre tratamientos ocurrieron a los 83

ddt, donde los tratamientos inoculados solo con rizobacterias tuvieron los valores más altos de conductancia estomática (Figura 6.8).

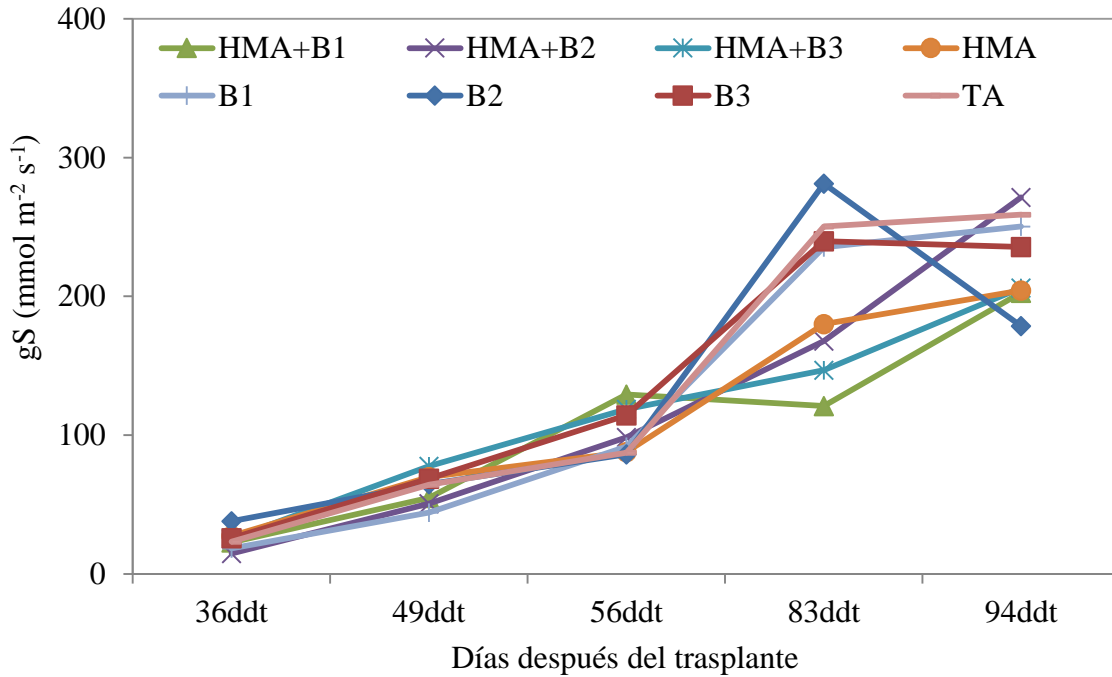


Figura 6.8. Conductancia estomática gS de chile poblano en respuesta a la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias n = 8.

Los efectos de los tratamientos en la tasa de fotosíntesis ( $P_n$ ) se puede observar en la Figura 6.9. En general, la menor  $P_n$  ocurrió a los 36 ddt con valores menores a  $3 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y la mayor tasa sucedió a los 83 y 94 ddt con valores superiores a  $7 \mu\text{moles}$ . No se observó una tendencia clara de cual fue el mejor tratamiento, ya que las diferencias entre tratamientos no fueron marcadas, a excepción de los primeros 49 ddt en el que se observó que el tratamiento inoculado con el HMA y la rizobacteria *P. tolaasii* (tratamiento HMA+B3) fue el que presentó la mayor tasa de fotosíntesis.

Goicoechea *et al.* (2014), encontró que la inoculación de HMA en plantas de alfalfa permitieron incrementar 16 % más la tasa de fotosíntesis ( $181.29 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y 5 % más la conductancia estomática ( $26.95 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) respecto a las plantas no inoculadas que presentaron una tasa de fotosíntesis de  $156.27 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y de conductancia estomática de  $25.63 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , respectivamente. Los HMA mejoran la nutrición de las plantas, lo que permite incrementar las concentraciones de clorofila, resultando en una mayor actividad fotosintética (Wu y Zou, 2010), esto se ha observado en *Capsicum annuum* inoculado con *G. intraradices*. La inoculación conjunta de *Methylobacterium oryzae* con HMA (*Acaulospora longula*, *Glomus clarum* y *Glomus intraradices*) incrementó la concentración de clorofila, resultando un mejor desarrollo de las plantas en comparación con las plantas no inoculadas (Kim *et al.*, 2010).

Todos los procesos involucrados en el intercambio de gases ( $C_i$ ,  $E$ ,  $g_s$ ,  $P_n$ ) determinan el crecimiento vegetal, y son afectados por factores como luz, la humedad, la concentración de  $\text{CO}_2$ , ubicación y edad de las hojas, así como la hora del día en que se realiza la evaluación (Assmann y Gershenson, 1991). Las condiciones de estrés ocasionadas por factores ambientales también influyen en los procesos del intercambio de gases a nivel de hoja. Así, una planta sometida a estrés por sequía o salinidad presenta disminución de la fotosíntesis y de transpiración, cierre estomático y reducción del área foliar (Webb y Mansfield, 1992). La sequía puede reducir en un 50 % a la conductancia estomática, dando como resultado la inhibición de la transpiración y una reducción de la tasa fotosintética alrededor de 55 % (Damian *et al.*, 2009).



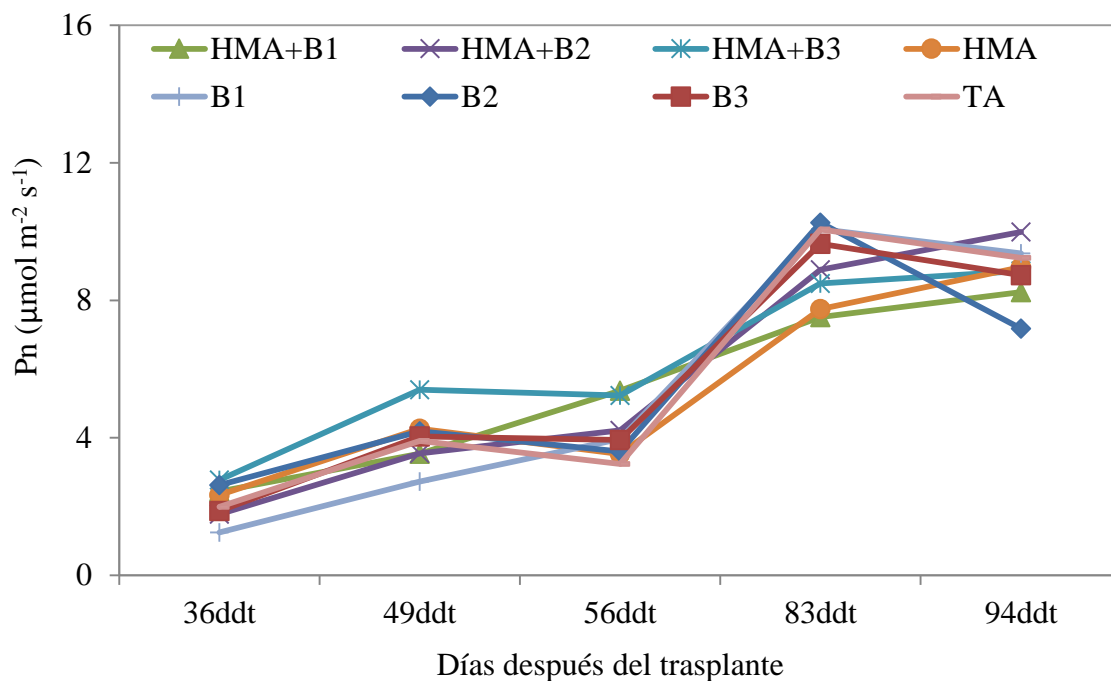


Figura 6.9. Tasa de fotosíntesis Pn en plantas de chile poblano por efecto de la inoculación de HMA y RPCV en invernadero. Medias n = 8.

### 6.3.4. Contenido de fósforo en plantas

La inoculación de las plantas de chile poblano con HMA y RPCV, sean solas o en combinación, afectaron positivamente (Tukey  $p < 0.05$ ) las concentraciones de fósforo en el tejido vegetal (tallos y hojas) comparado con las plantas sin inoculación (Figura 6.10). La concentración de fósforo en tejido vegetal se incrementó en 18.5 % cuando las plantas se inocularon con el HMA más la cepa de rizobacteria *Pseudomonas tolaasii* P61 (tratamiento HMA+B3) comparado con las plantas sin inoculación (TA) (Figura 6.10). El contenido de P en las plantas de los tratamientos HMA+B2, HMA, B1 y B2 fue entre 9 y 12 % más que en las plantas del tratamiento TA (testigo).

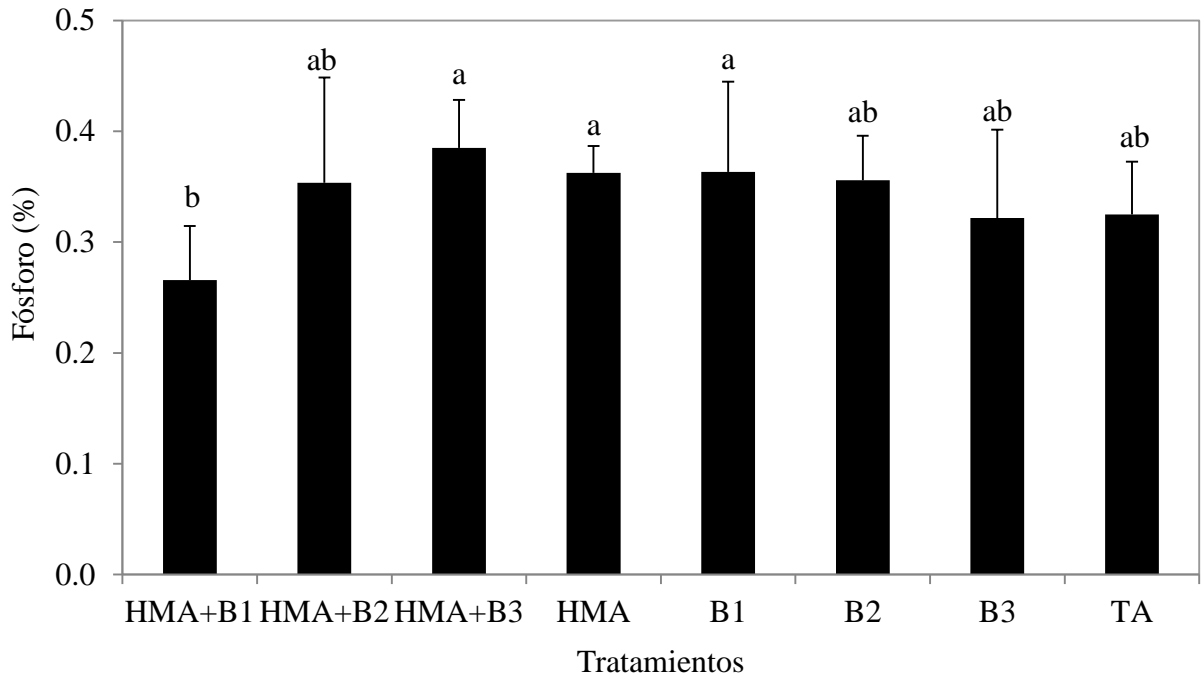


Figura 6.10. Contenido de fósforo (%) en plantas (tallo más hojas) de chile poblano por efecto de la inoculación con HMA y RPCV en invernadero. Medias  $n = 8 \pm EE$ . Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ).

Los HMA pueden aumentar la absorción de fósforo (P) por las raíces de las plantas de modo que las plantas micorrizadas acumulan mayor cantidad de este nutriente mineral en las hojas que en las no micorrizadas (Jakobsen *et al.*, 1994), al respecto Kim *et al.* (2010) al aplicar *Methylobacterium oryzae* con un consorcio micorrízico (*Acaulospora longula*, *Glomus clarum* y *Glomus intraradices*) observaron mayor concentración de P en plantas al pasar de 126.8 (control) a 153.9 mg P planta<sup>-1</sup> cuando estos se inocularon juntos.

Según Bagyaraj *et al.* (2015) la concentración de P en las raíces o micelio fúngico es 1000 veces mayor que la concentración de P en la solución del suelo, el P inorgánico entra a la hifa en forma de gránulos de polifosfatos (Pi-Pi-Pi-Pi), que después se descompone en unidades Pi

por la enzima polifosfatasa, viaja a través de los arbusculos para llegar a las plantas debido a las enzimas ATPasa y fosfatasa alcalina, este flujo de entradas de P hacia las hifas es alrededor de  $18 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$  o alrededor de seis veces más comparado con las raíces no micorrizadas. Los resultados encontrados en este trabajo fueron mejores a los reportados por Tanwar y Aggarwal (2014) para chile bell pepper inoculado con *Funneliformis mosseae* y *Pseudomonas fluorescens*.

#### **6.4. CONCLUSIONES**

En este estudio se encontró que la inoculación de plantas de chile poblano con tres cepas de rizobacterias (*Agrobacterium vitis*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas tolaasii*) y un consorcio de HMA (*Funneliformis* aff. *geosporum* + *Claroideoglobus* spp.) solos o en combinación permiten mejorar el crecimiento y aumentar el contenido de P en las plantas. La inoculación combinada de *Pseudomonas tolaasii* con el consorcio de HMA indujeron mayor altura, número de hojas, área foliar y producción de biomasa seca en planta, seguido por la combinación de HMA y *Serratia plymuthica*, que fueron numéricamente mejores respecto a las plantas no inoculadas. El efecto de los HMA en el crecimiento de las plantas puede mejorarse cuando se combinan con RPCV. El cultivo de chile es muy exigente en elementos nutritivos y que suelen ser escasos en el suelo, por lo que la utilización de estos microorganismos son alternativas para el suministro de nutrimentos y cuidado del ambiente al disminuir el uso de fertilizantes químicos.

## 6.5. LITERATURA CITADA

- Armada E., Azcón R., López-Castillo O. M., Calvo-Polanco M., Ruiz-Lozano J. M. 2015. Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 90: 64-74.
- Artursson V., Finlay R. D., Jansson J. K. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8(1): 1-10.
- Assmann S. M., Gershenson A. 1991. The kinetics of stomatal responses to VPD in *Vicia faba*: electrophysiological and water relations models. *Plant Cell* 14: 455-465.
- Bagyaraj D. J., Sharma M. P., Maiti D. 2015. Phosphorus nutrition of crops through arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Science* 108(7): 1288-1293.
- Barea J. M., Pozo M. J., Azcón R., Azcón-Aguilar C. 2005. Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56 (417): 1761-1778.
- Bending G. D., Aspray T. J., Whipps J. M. 2006. Significance of Microbial Interactions in the Mycorrhizosphere. *Advances in Applied Microbiology* 60: 97-132.
- Bierman B., Linderman R. G. 1981. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: A proposed method towards standardization. *New Phytologist* 87: 423-432.
- Chauhan H., Bagyaraj D. J., Selvakumar G., Sundaram S. P. 2015. Novel plant growth promoting rhizobacteria-Prospects and potential. *Applied Soil Ecology* 95: 38-53.
- Damián N. A., Ramírez R. I., Peña V. C. B., Díaz V. G., González H. V. A. 2009. Características del intercambio de gases en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(2): 119-126.
- De Vleeschauwer D., Hofte M. 2007. Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogens of plants. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 2(46): 1-12.
- Elbon A., Whalen J. K. 2014. Phosphorus supply to vegetable crops from arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems*. 1-18.

- Frey-Klett P., Garbaye J., Tarkka M. 2007. *Tansley review* The mycorrhiza helper bacteria revisited. Journal compilation, New Phytologist 176: 22-36.
- Gamalero E., Berta G., Massa N., Glick B. R., Lingua G. 2008. Synergistic interactions between the ACC deaminase-producing bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and the AM fungus *Gigaspora rosea* positively affect cucumber plant growth. FEMS Microbiology Ecology 64: 459-67.
- Gerdemann J. W., Nicolson T. H. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society 46: 235-244.
- Giri B., Mukerji K. G. 2004. Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. Mycorrhiza 14: 307-312.
- Goicoechea N., Baslam M., Erice G., Irigoyen J. J. 2014. Increased photosynthetic acclimation in alfalfa associated with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and cultivated in greenhouse under elevated CO<sub>2</sub>. Journal of Plant Physiology 171: 1774-1781.
- Harman G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96(2): 190-204.
- Hewitt E. J. 1966. The composition of the nutrient solution. In: Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition. Hewitt E. J. (ed). Commonwealth Bureaux of Horticulture and Plantation Crops, East Malling, Maidstone, Kent. pp 187-246.
- Jakobsen I., Joner E. J., Larsen J. 1994. Hyphal phosphorus transport, a keystone to mycorrhizal enhancement of plant growth. In: Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. Gianinazzi S., Schüepp H. (eds). Birkhäuser Basel. Advances in Life Sciences. pp 133-146.
- Kim K., Woojong Y., Pankaj T., Munusamy M., Hari P. D. B., Md. Rashedul I., Gillseung L., Tongmin S. 2010. Synergistic effects of inoculating arbuscular mycorrhizal fungi and *Methylobacterium oryzae* strains on growth and nutrient uptake of red pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Soil 327: 429-440.

- Kim Y. C., Leveau J., McSpadden G. B. B., Pierson E. A., Pierson III L. S., Ryu C-M. 2011. The Multifactorial Basis for Plant Health Promotion by Plant-Associated Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 77(5): 1548-1555.
- Kohlmeier S., Smits M. T. H., Ford M. R., Keel C., Harms H., Wick Y. L. 2005. Taking the Fungal Highway: Mobilization of Pollutant-Degrading Bacteria by Fungi. *Environmental Science Technology* 39(12): 4640-4646.
- Lambers H., Mougél C., Jaillard B., Hinsinger P. 2009. Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant Soil* 321:83-115.
- Nadeem S. M., Ahmad M., Ahmad Z. Z., Javaid A., Ashraf M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances* 32: 429-448.
- Phillips J. M., Hayman D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- SAS Institute Inc. (Statistical Analysis System). 2002. Software: the SAS System for Windows version 9.0. SAS Institute Inc., Cary, NC 25513, USA.
- Smith S., Read D. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edition, Academic Press, San Diego.
- Smith S. E., Read D. J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. 3 edition. New York, USA. 800 p.
- Smith S. E., Smith F. A. 2012. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* 104(1):1-13.
- Tanwar A., Aggarwal A. 2014. Multifaceted potential of bioinoculants on red bell pepper (F1 hybrid, Indam Mamatha) production. *Journal of Plant Interactions* 9(1): 82-91.
- Wu Q. S., Zou Y. N. 2010. Beneficial roles of arbuscular mycorrhizas in citrus seedlings at temperature stress. *Scientia Horticulturae* 125: 289-293.
- Webb A. A. R., Mansfield T. A. 1992. How Do Stomata Work? *J. Biolog. Educ.* 26: 19-26.

## VII. CONCLUSIONES GENERALES

1. Se encontraron cepas de RPCV y HMA asociados a los agroecosistemas de Chile poblano que pueden ejercer efectos benéficos en el crecimiento y desarrollo de este cultivo, lo que prueba que estos agroecosistemas son reservorios de microorganismos con potencial agrícola. Se acepta hipótesis general.
2. Se aislaron 215 cepas de rizobacterias con diferentes características de promoción de crecimiento (solubilización de fosfatos, producción de auxinas, fijación de nitrógeno), sin embargo, solo diez de ellas (5 %) fueron sobresalientes.
3. Del total de cepas de RPCV aisladas, 3 % de ellas tienen capacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium* sp. en un rango de 36 – 39 %, mientras que 13 % de las cepas inhiben *Phytophthora capsici* en 40 – 63 %.
4. De las 10 cepas de RPCV probadas en invernadero, CPPC4 y CPPC5 incrementaron la biomasa de plántulas en 11 y 26 %, respectivamente.
5. Los consorcios obtenidos de los 9 sitios de Chile poblano estuvieron constituidos por dos géneros (*Funneliformis* y *Claroideoglossum*) y tres especies (*F. aff. geosporum*, *Claroideoglossum* sp. y *C. cf. etunicatum*), cuya presencia varió entre sitios.
6. Todos los consorcios de HMA mejoraron el crecimiento del Chile poblano en invernadero, con incrementos entre 4 y 23 veces más en altura y producción de biomasa seca, siendo

mejor el consorcio micorrízico obtenido del sitio dos (*Funneliformis* aff. *geosporum* + *Claroideoglossum* sp.).

7. Las cepas *Agrobacterium vitis* CPPC5 y *Pseudomonas tolaasii* P61 incrementaron en 7 y 26 % la colonización por HMA en raíz de chile poblano, mientras que la cepa *Serratia plymuthica* CPPC4 incrementó el número de esporas en 87 %.
  
8. La inoculación combinada de HMA (del sitio 2) y RPCV incrementó la altura, área foliar, producción de biomasa seca y contenido de fósforo en plantas de chile poblano cultivados en invernadero, los mejores resultados fueron observados en los tratamientos con *Pseudomonas tolaasii* + consorcio HMA y *Serratia plymuthica* + consorcio HMA.



## VIII. LITERATURA CITADA

- Agrios G. N. 2005. Plant pathology. Quinta edición. Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts, USA. 990 p.
- Alejo-Iturvide F., Márquez-Lucio M. A., Morales-Ramírez I., Vázquez-Garcidueñas M. S., Olalde-Portugal V. 2008. Mycorrhizal protection of chili plants challenged by *Phytophthora capsici*. European Journal Plant Pathology 120: 13-20.
- Alexander M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. Ed. AGT. México. DF México. 491 p.
- Al-Khaliel A. S. 2010. Effect of salinity stress on mycorrhizal association and growth response of peanut infected by *Glomus mosseae*. Plant Soil Environ 56: 318-324.
- Allen M. F. 2009. Water Relations in the Mycorrhizosphere. *In*: Progress in Botany. Lüttge U., Beyschlag W., Büdel B., Francis D. (eds). California USA: Springer Berlin Heidelberg. Progress in Botany 70: 257-276.
- Alvarez M., Huygens D., Fernandez C., Gacitua Y., Olivares E., Saavedra I., Alberdi M., Valenzuela E. 2009. Effect of ectomycorrhizal colonization and drought on reactive oxygen species metabolism of *Nothofagus dombeyi* roots. Tree Physiology 29(8): 1047-1057.
- Altomare C., Tringovska I. 2011. Beneficial Soil Microorganisms, an Ecological Alternative for Soil Fertility Management. *In*: Genetics, Biofuels and Local Farming Systems. Lichtfouse E. (ed). Springer Netherlands. Sustainable Agriculture Reviews 7: 161-214.
- Arai Y., Sparks D. L. 2007. Phosphate reaction dynamics in soils and soil components: a multiscale approach. Advances in Agronomy 94: 135-179.
- Armada E., Azcón R., López-Castillo O. M., Calvo-Polanco M., Ruiz-Lozano J. M. 2015. Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought conditions. Plant Physiology and Biochemistry 90: 64-74.
- Aroca R., Vernieri P., Ruiz-Lozano J. M. 2008. Mycorrhizal and nonmycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. Journal of Experimental Botany 59(8): 2029-2041.

- Artursson V., Finlay R. D., Jansson J. K. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8: 1-10.
- Bago B., Pfeffer P. E., Shachar-Hill Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* 124: 949-958.
- Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S., Vivanco J. M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 233-66.
- Banerjee S., Palit R., Sengupta C., Standing D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science* 4(6): 378-383.
- Barea J. M., Andrade G., Bianciotto V. V., Dowling D., Lohrke S., Bonfante P., O'Gara F., Azcón-Aguilar C. 1998. Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2304-2307.
- Barea J. M., Pozo M. J., Azcón R., Azcón-Aguilar C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56 (417): 1761-1778.
- Bashan Y., de-Bashan L. E. 2002. Protection of Tomato Seedlings against Infection by *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* by Using the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(6): 2637-2643.
- Bashan Y., Kamnev A. A., De-Bashan L. E. 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils* 49: 465-79.
- Bautista-Calles J., García-Espinosa R., Montes-Belmont R., Zavaleta-Mejía E., Pérez-Moreno J., Ferrera-Cerrato R., García C. R., y Huerta-Lara M. 2010. Disminución de la marchitez del chile por introducción de antagonistas en cultivos de rotación. *Interciencia* 35(9): 673-679.
- Beltran J., Ghosh A. K., Basu S. 2007. Immunotherapy of tumors with neuroimmune ligand capsaicin. *The Journal of Immunology* 178: 3260-3264.

- Bendavid-Val R., Rabinowitch H. D., Katan J., Kapulnik Y. 1997. Viability of VA-mycorrhizal fungi following soil solarization and fumigation. *Plant Soil* 195: 185-193.
- Bending G. D., Aspray T. J., Whipps J. M. 2006. Significance of Microbial Interactions in the Mycorrhizosphere. *Advances in Applied Microbiology* 60: 97-132.
- Bianciotto V., Andreotti S., Balestrini R., Bonfante P., Perotto S. 2001. Mucoid mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14: 255-60.
- Bogeat-Triboulot M. B., Bartoli F., Garbaye J., Marmeisse R., Tagu D. 2004. Fungal ectomycorrhizal community and drought affect root hydraulic properties and soil adherence to roots of *Pinus pinaster* seedlings. *Plant Soil* 267: 213-223.
- Bonfante P., Andca I. A. 2009. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annual Review of Microbiology* 63: 363-383.
- Bonfante P., Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications Review* 1(48): 1-11.
- Boonlue S., Surapat W., Pukahuta C., Suwanarit P., Suwanarit A., Morinaga T. 2012. Diversity and efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from organic chili (*Capsicum frutescens*) farms. *Mycoscience* 53: 10-16.
- Bowen G. D. 1987. The biology and physiology of infection and its development. *In: Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. Safir G. R. (ed). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA. pp 27-57.
- Budi S. W., van Tuinen D., Martinotti G., Gianinazzi S. 1999. Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5148-5150.
- Castillo C. R., Sotomayor L. S., Ortiz C. O., Leonelli G. C., Borie F. B., Rubio R. H. 2009. Effect of Arbuscular mycorrhizal fungi on an ecological crop of chili peppers (*Capsicum annuum* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research* 69(1): 79-87.
- Cavagnaro T. R., Jackson L. E., Six J., Ferris H., Goyal S., Asami D., Scow K. M. 2006. Arbuscular mycorrhizas, microbial communities, nutrient availability, and soil aggregates in organic tomato production. *Plant Soil* 282(1-2): 209-225.

- Cavagnaro T. R. 2008. The role of arbuscular mycorrhizas in improving plant zinc nutrition under low soil zinc concentrations: a review. *Plant Soil* 304: 315-325.
- Cekic F. O., Unyayar S., Ortas I. 2012. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on biochemical parameters in *Capsicum annuum* grown under long term salt stress. *Turk Journal Botany* 36: 63-72.
- Chen Y. P., Rekha P. D., Arun A. B., Shen F. T., Lai W. -A., Young C. C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41.
- Cho E. J., Lee J. D., Wee D. C., Kim L. H., Cheong Y. H. S., Cho J., Sohn K. B. 2009. Effects of AMF inoculation on growth of *Panax ginseng* C. A. Meyer seedlings and on soil structures in mycorrhizosphere. *Scientia Horticulturae* 122: 633-637.
- Cyphers A., Escalante G. P., García-Bárcena J., García M. B., López L. L., Matos M. E., Nalda E., Noriega de A. M. N., Pacheco J. E., Uriarte C. M. T. 2009. Los Chiles de México Catalogo Visual. *Arqueología Mexicana. Edición Especial* 32: 90 p.
- Clement M., Boncompagni E., de Almeida-Engler J., Herouart D. 2006. Isolation of a novel nodulin: a molecular marker of osmotic stress in *Glycine max/Bradyrhizobium japonicum* nodule. *Plant Cell and Environment* 29(9): 1841-1852.
- Coba de la Peña T., Pueyo J. J. 2012. Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. *Agronomy for Sustainable Development* 32: 65-91.
- Corrales R. L. C., Arévalo G. Z. Y., Moreno B. V. E. 2014. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas* 12(21): 67-79.
- Coyne M. 2000. *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Editorial paraninfo. España. 416 p.
- Couillerot O., Ramírez-Trujillo A., Walker V., von Felten A., Jansa J., Maurhofer M., Défago G., Prigent-Combaret C., Comte G., Caballero-Mellado J., Moënné-Loccozy Y. 2013. Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum–Pseudomonas–Glomus* consortia for promotion of maize growth. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(10): 4639-4649.

- Crosby K. M. 2008. Pepper. *In: Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae.* Prohens-Tomás J., Nuez F. (eds). Springer New York. USA. Handbook of Plant Breeding 2: 221-248.
- Dae-Young L., Do-Gyeong L., Jin-Gyeong C., Myun-Ho B., Ha-Na L., Youn-Hyung L., Se-Young K., Nam-In B. 2009. Lignans from the Fruits of the Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) and Their Antioxidant Effects. *Archives of Pharmacal Research* 32(10): 1345-1349.
- Dai O., Singh R. K., Nimasow G. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) inoculation on growth of Chili plant in organic manure amended soil. *African Journal of Microbiology Research* 5(28): 5004-5012.
- Davies Jr F. T., Potter J. R., Linderman R. G. 1992. Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content. *Journal of Plant Physiology* 139: 289-294.
- De-Bashan L. E., Holguin G., Glick B. R., Bashan Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *In: Microbiología agrícola.* Ferrara- Cerrato R., Alarcón A. (eds.). Editorial Trillas. DF México. pp 170-209.
- De la Fe-Pérez Y., Díaz de la O. A., Restrepo-Franco G. M., Diván-Baldani V. L., Hernández-Rodríguez A. 2015. Diversidad de bacterias diazotróficas asociativas potencialmente eficientes en cultivos de importancia económica. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas* 4(1): 17-26.
- Díaz A. C. F., Costa F. E. C., Andreote F. D., Lacava P. T., Teixeira M. A., Assumpcao L. C., Araujo W. L., Azevedo J. L., Melo I. S. 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J Microbiol Biotechnol.* 25:189-195.
- Dixon R., Kahn D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology* 2: 621-631.
- Douds Jr. D. D., Lee J., Rogers L., Lohman M. E., Pinzon N., Ganser S. 2012. Utilization of inoculum of AM fungi produced on-farm for the production of *Capsicum annuum*: A summary of seven years of field. *Biological Agriculture & Horticulture* 28(2): 129-145.

- Duca D., Lorv J., Patten C. L., Rose D., Glick B. R. 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 106: 85-125.
- Dumbrell A. J., Nelson M., Helgason T., Dytham C., Fitter A. H. 2010. Idiosyncrasy and overdominance in the structure of natural communities of arbuscular mycorrhizal fungi: role of stochastic processes. *Journal of Ecology* 98: 419-428.
- Elsen A., Gervacio D., Swennen R., De Waele D. 2008. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. *Mycorrhiza* 18(5): 251-256.
- Evelin H., Kapoor R., Giri B. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany* 104(7): 1263-1280.
- FAOSTAT. 2016. United Nations, Food and Agriculture Organization. Agricultural trade. <http://www.faostat.fao.org/>.
- Felle H. H., Waller F., Molitor A., Kogel K. H. 2009. The mycorrhiza fungus *Piriformospora indica* induces fast rootsurface pH signaling and primes systemic alkalinization of the leaf apoplast upon powdery mildew infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(9): 1179-1185.
- Ferrera C. R., A. Alarcón. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. *Ciencia Ergo Sum* 8(2): 175-183.
- Fitter A. H., Helgason T., Hodge A. 2011. Nutritional exchanges in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Implications for sustainable agriculture. *Fungal Biology Reviews* 25(1): 68-72.
- Frey-Klett P., Garbaye J., Tarkka M. 2007. *Tansley review* The mycorrhiza helper bacteria revisited. *Journal compilation, New Phytologist* 176: 22-36.
- Gamalero E., Berta G., Massa N., Glick B. R., Lingua G. 2008. Synergistic interactions between the ACC deaminase-producing bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and the AM fungus *Gigaspora rosea* positively affect cucumber plant growth. *FEMS Microbiology Ecology* 64: 459-67.
- García M. C., Taboada G. O. R., López S. H. López P. A., Mora A. G., Tlapal B. B. 2011. Calidad de plántulas de Chile “Poblano” en la Sierra Nevada de Puebla, México. *Revista Fitotecnia* 34(2): 115-121.

- Gerhardson B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology* 20: 338-343.
- Goswami D., Thakker J. N., Dhandhukia P. C. 2015. Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from L-tryptophan (Trp) using HPTLC. *Journal of Microbiological Methods* 110: 7-14.
- Guether M., Neuhauser B., Balestrini R., Dynowski M., Ludewig U., Bonfante P. 2009. A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* 150: 73-83.
- Gupta R. S., Dixit V. P., Dobhal M. P. 2002. Hypocholesterolaemic effect of the oleoresin of *Capsicum annum* L. in gerbils (*Meriones hurrianae* Jerdon). *Phytotherapy Research* 16: 273-275.
- Gray E. J., Smith D. L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 395-412.
- Harrison M. J. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 59: 19-42.
- Haselwandter K. 2008. Structure and function of siderophores produced by mycorrhizal fungi. *Mineralogical Magazine* 72: 61-64.
- Heiser Jr., Charles B., Pickersgill B. 1969. Names for the cultivated *Capsicum* species (Solanaceae). *Taxon* 18(3): 277-283.
- Herridge D. F., Peoples M. B., Boddey R. M. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311: 1-18.
- Hildebrandt U., Ouziad F., Marnier J. F., Bothe H. 2006. The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. *FEMS Microbiology Lett.* 254: 258-67.
- Hodge A., Fitter A. H. 2010. Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *PNAS* 107(31): 13754-13759.
- Honrubia M. 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66S1: 133-144.

- Huerta P. A., Fernández R. S., Ocampo F. I. 2007. Manual de chile poblano, Importancia económica y sociocultural. Colegio de Postgraduados Campus Puebla, Fundación Produce Puebla A. C., ALTRES COSTA-AMIC. Primera edición. México. 80 p.
- Ibarra-Jiménez L., Flores J., Quezada M. R., Zermeño A. 2004. Acolchado, riego y microtúneles en Tomate, Chile anaheim y Chile pimiento. Revista Chapingo Serie Horticultura 10(2): 179-187.
- Imhob S. 2009. Arbuscular, ecto-related, orchid mycorrhizas – three independent structural lineages towards mycoheterotrophy: implications for classification? Mycorrhiza 19: 357-363.
- Javaid A. 2009. Arbuscular mycorrhizal mediated nutrition in plants. Journal of Plant Nutrition 32: 1595-1618.
- Jusoh M., Hong L. S., Seng C. T., Aziz A., San C. T. 2015. Indole-3-acetic acid (IAA) induced changes in oil content, fatty acid profiles and expression of four fatty acid biosynthetic genes in *Chlorella vulgaris* at early stationary growth phase. Phytochemistry 111: 65-71.
- Kahiluoto H., Ketoja E., Vestberg M. 2009. Contribution of arbuscular mycorrhiza to soil quality in contrasting cropping systems. Agriculture Ecosystem and Environmental 134(1-2): 36-45.
- Kataoka R., Futai K. 2009. A new mycorrhizal helper bacterium, *Ralstonia* species, in the ectomycorrhizal symbiosis between *Pinus thunbergii* and *Suillus granulatus*. Biol Fertil Soils 45: 315-320.
- Kaya C., Ashraf M., Sonmez O., Aydemir S., Levent T. A., Ali C. M. 2009. The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. Scientia Horticulturae 121: 1-6.
- Kim K., Yim W., Trivedi P., Madhaiyan M., Boruah H. P. D., Rashedul M. I., Lee G., Sa T. 2010. Synergistic effects of inoculating arbuscular mycorrhizal fungi and *Methylobacterium oryzae* strains on growth and nutrient uptake of red pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Soil 327: 429-440.
- Kim Y. C., Leveau J., McSpadden G. B. B., Pierson E. A., Pierson III L. S., Ryu C-M. 2011. The Multifactorial Basis for Plant Health Promotion by Plant-Associated Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 77(5): 1548-1555.



- Kohlmeier S., Smits M. T. H., Ford M. R., Keel C., Harms H., Wick Y. L. 2005. Taking the Fungal Highway: Mobilization of Pollutant-Degrading Bacteria by Fungi. *Environmental Science Technology* 39(12): 4640-4646.
- Labidi S., Jeddi F. B., Tisserant B., Debiante D., Rezgui S., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj A. S. 2011. Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO<sub>3</sub> stress. *Mycorrhiza* 22(5): 337-345.
- Lee S-H., Richardson R. L., Dashwood R. H., Baek S. J. 2012. Capsaicin represses transcriptional activity of  $\beta$ -catenin in human colorectal cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 23(6): 646-655.
- Lioussanne L., Jolicœur M., St-Arnaud M. 2009. Role of the modification in root exudation induced by arbuscular mycorrhizal colonization on the intraradical growth of *Phytophthora nicotianae* in tomato. *Mycorrhiza* 19(6): 443-448.
- Lodwig E. M., Hosie A. H. F., Bourdes A., Findlay K., Allaway D., Karunakaran R., Downie J. A., Poole P. S. 2003. Amino acid recycling drives nitrogen fixation in the legume-rhizobium symbiosis. *Nature* 422: 722-726.
- Maoka T., Mochida K., Kozuka M., Ito Y., Fujiwara Y., Hashimoto K., Enjo F., Ogata M., Nobukuni Y., Tokuda H., Nishino H. 2001. Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *Capsicum annuum* L. *Cancer Letters* 172: 103-109.
- Martin C. A., Stutz J. C. 2004. Interactive effects of temperature and arbuscular mycorrhizal fungi on growth, P uptake and root respiration of *Capsicum annuum* L. *Mycorrhiza* 14: 241-244.
- Martinez V., Del Amor F. M., Marcelis L. F. M. 2005. Growth and physiological response of tomato plants to different periods of nitrogen starvation and recovery. *Journal Horticulture Science Biotechnology* 80: 147-153.
- Marschner P. 2007. Plant-Microbe Interactions in the Rhizosphere and Nutrient Cycling. *In: Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems*. Marschner P., Rengel Z. (eds.). Springer Berlin Heidelberg. *Soil Biology* 10: 159-182.
- Mayo K., Davis R. E., Motta J. 1986. Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. *Mycologia* 78: 426-431.

- McFarland J. W., Ruess R. W., Kielland K., Pregitzer K., Hendrick R., Allen M. 2010. Cross-ecosystem comparisons of in situ plant uptake of amino acid-N and NH<sub>4</sub>. *Ecosystems* 13: 177-193.
- Mena-Violante H., Ocampo-Jimenez O., Dendooven L., Martínez-Soto G., González-Castañeda J., Davies F. T., Olalde-Portugal V. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance fruit growth and quality of chile ancho (*Capsicum annuum* L. cv San Luis) plants exposed to drought. *Mycorrhiza* 16: 261-267.
- Mengel K. 2008. Nutrient potentials. *In: Encyclopedia of soil science.* Chesworth W. (ed) Springer Netherlands. pp 494-500.
- Meza B., de-Bashan L. E., Bashan Y. 2015. Involvement of indole-3-acetic acid produced by *Azospirillum brasilense* in accumulating intracellular ammonium in *Chlorella vulgaris*. *Research in Microbiology* 166: 72-83.
- Montes S. 2010. Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género *Capsicum* que crecen y se cultivan en México. Avances de investigación de la red de hortalizas del SINAREFI. INIFAP. Celaya, México. 86 p.
- Mosse B. 1962. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *J Gen Microbiol* 27: 509-520.
- Muller H., Westendorf C., Leitner E., Chernin L., Riedel K., Schmidt S., Eberl L., Berg G. 2009. Quorum-sensing effects in the antagonistic rhizosphere bacterium *Serratia plymuthica* HRO-C48. *FEMS Microbiology Ecology* 67: 468-478.
- Nadeem S. M., Ahmad M., Ahmad Z. Z., Javaid A., Ashraf M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances* 32: 429-448.
- Nathan D. T., Cohen J. D. 2015. Analytical History of Auxin. *Journal of Plant Growth Regulation.* 1-15 p.
- Nuez V. F., Gil O. R., Costa G. J. 2003. El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajies. Mundi Prensa. Barcelona, Madrid, España. 607 p.
- Odum E. P., Barrett G. W. 2005. *Fundamentals of Ecology.* Fifth Edition. Belmont, California: Thomson Brooks/Cole. USA. 598 p.

- Oehl F., Sieverding E., Mäder P., Dubois D., Ineichen K., Boller T., Wiemken A. 2004. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138: 574-583.
- Ortas I., Sari N., Akpinar C., Yetisir H. 2011. Screening mycorrhiza species for plant growth, P and Zn uptake in pepper seedling grown under greenhouse conditions. *Scientia Horticulturae* 128: 92-98.
- Ozgonen H., Erkilic A. 2007. Growth enhancement and Phytophthora blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. *Crop Protection* 26: 1682-1688.
- Paran I., Ben-Chaim A., Byoung-Cheorl K., Jahn M. 2007. *Capsicums*. In: Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Kole C (Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg Vegetables 5: 209-226.
- Pasaribu A., Mohamad R. B., Awang Y., Othman R., Puteh A. 2011. Growth and development of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus mosseae* (Nicol. And Gerd.), inalachlor and glyphosate treated soils. *African Journal of Biotechnology* 10: 11520-11526.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6: 763-775.
- Perner H., Schwarz D., Bruns C., Mäder P., George E. 2007. Effect of arbuscular mycorrhizal colonization and two levels of compost supply on nutrient uptake and flowering of pelargonium plants. *Mycorrhiza* 17: 469-474.
- Porta J., López-Acevedo M., Roquero C. 1999. Edafología para la Agricultura y el Medio Ambiente. 2da. Ed. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid-Barcelona-México. 849 P.
- Pozo C. O. 1983. Logros y Aportaciones de la Investigación Agrícola en el Cultivo del Chile. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. México, D. F. 20 p.
- Pozo C. O., Montes S., Redondo E. 1991. Chile (*Capsicum* spp.) In: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México. Ortega R., Palomino G., Castillo F., González V. A., Livera M. (eds). Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C. México. pp 217-238.
- Rajkumar M., Narasimha M., Vara P. F., Noriharu A. 2009. Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Biotechnology* 29(2): 120-130.

- Ramalho R. E., Monteiro M. R., Damiao C. C., Luiz F. F., Wagner D. C. V. 2010. Phenotypic diversity, correlation and importance of variables for fruit quality and yield traits in Brazilian peppers (*Capsicum baccatum*). *Genetic Resources and Crop Evolution* 58(6): 909-918.
- Reich P. B., Hungate B. A., Luo Y. 2006. Carbon–nitrogen interactions in terrestrial ecosystems in response to rising atmospheric carbon dioxide. *Annual Review of Ecology Evolution System* 37: 611-636.
- Restrepo-Franco G. M., Marulanda-Moreno S., de la Fe-Pérez Y., Díaz-de la Osa A., Lucia-Baldani V., Hernández-Rodríguez A. 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *CENIC Ciencias Biológicas* 46(1): 63-76.
- Rodríguez H., Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17: 319-39.
- Rodríguez H., Fraga R., Gonzalez T., Bashan Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* 287: 15-21.
- Rueda-Puente E. O., Murillo-Amador B., Castellanos-Cervantes T., García-Hernández J. L., Tarazòn-Herrera M. A., Moreno S. M., Gerlach L. E. B. 2010. Effects of plant growth promoting bacteria and mycorrhizal on *Capsicum annuum* L. var. aviculare ([Dierbach] D'Arcy and Eshbaugh) germination under stressing abiotic conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 724-730.
- Sandhya V., Ali S. Z., Venkateswarlu B., Reddy G., Grover M. 2010. Effect of osmotic stress on plant growth promoting *Pseudomonas* spp. *Archives of Microbiology* 192(10): 867-876.
- Saraf M., Kumar J. C., Patel D. 2010. The Role of ACC Deaminase Producing PGPR in Sustainable Agriculture. *In: Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Maheshwari D. K. (ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Microbiology Monographs* 18: 365-385.
- Sawers R. J. H., Gutjahr C., Paszkowski U. 2008. Cereal mycorrhiza: an ancient symbiosis in modern agriculture. *Trends Plant Science* 13: 93-97.

- Sensoy S., Demir S., Turkmen O., Erdinc C., Burak O. S. 2007. Responses of some different pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to inoculation with two different arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae* 113: 92-95.
- Serrano M., Zapata P. J., Castillo S., Guillen F., Martínez-Romero D., Valero D. 2010. Antioxidant and nutritive constituents during sweet pepper development and ripening are enhanced by nitrophenolate treatments. *Food Chemistry* 118: 497-503.
- Sharma A., Pathak A., Sahgal M., Meyer J. M., Wray V., Johri B. N. 2007. Molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria that enhance peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities in chile (*Capsicum annuum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Arch Microbiol* 188: 483-494.
- Sheng M., Tang M., Chen H., Yang B., Zhang F., Huang Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza* 18(6-7): 287-296.
- SIAP-SAGARPA. 2015. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta 1980–2014 (SIACON). México DF. Disponible en: <<http://www.siapsagarpa.gob.mx>>.
- Singh B. K., Nunan N., Ridgway K. P., McNicol J., Young W. J. P., Daniell J. T., Prosser I. J., Millard P. 2008. Relationship between assemblages of mycorrhizal fungi and bacteria on grass roots. *Environmental Microbiology* 10:534-541.
- Smith S. E., Read D. J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. 3 edition. New York, USA. 800 p.
- Sokolova M. G., Akimova G. P., Vaishlya O. B. 2011. Effect of Phytohormones Synthesized by Rhizosphere Bacteria on Plants. *Applied Biochemistry and Microbiology* 47(3): 274-278.
- Subramanian K. S., Santhanakrishnan P., Balasubramanian P. 2006. Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Scientia Horticulturae* 107: 245-253.
- Toljander J. F., Lindahl D. B., Paul R. L., Elstrand M., Finlay D. R. 2007. Influence of arbuscular mycorrhizal mycelia exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 295-304.

- Toro M., Azcón R., Barea J. M. 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4408-4412.
- Tsai T. H., Tsai P. J., Ho S. C. 2005. Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used spices. *Journal of Food Science* 70: 93-97.
- Tundis R., Loizzo M. R., Menichini F., Bonesi M., Conforti F., Statti G., Luca D. D., Cindio B., Menichini F. 2011. Comparative Study on the Chemical Composition, Antioxidant Properties and Hypoglycaemic Activities of Two *Capsicum annuum* L. Cultivars (*Acuminatum* small and *Cerasiferum*). *Plant Foods for Human Nutrition* 66(3): 261-269.
- Utkhede R. S., Mathur S. 2005. Biological and Chemical Control of Fruit Rot in Greenhouse Sweet Peppers (*Capsicum annuum* L.) Caused by *Fusarium subglutinans*. *Journal of Biological Sciences* 5(5): 610-615.
- van der Heijden M. G. A., Bardgett R. D., van Straalen N. M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11: 296-310.
- Vilmorin D. F. 1977. El cultivo del pimiento dulce tipo Bell. Ed. Diana. México. 314 p.
- Villegas J., Fortin J. A. 2002. Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as nitrogen source. *Canadian Journal of Botany* 80: 571-576.
- Wu F. Y., Ye Z. H., Wu S. C., Wong M. H. 2007. Metal accumulation and arbuscular mycorrhizal status in metallicolous and non-metallicolous populations of *Pteris vittata* L. and *Sedum alfredii* Hance. *Planta* 226: 1363-1378.
- Xavier L. J. C., Germida J. J. 2003. Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 471-478.
- Zhao Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology* 61: 49-64.
- Zhu C. X., Song B. F., Xu W. H. 2010. Arbuscular mycorrhizae improves low temperature stress in maize via alterations in host water status and photosynthesis. *Plant Soil* 331: 129-137.