



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

Micorriza arbuscular y bacterias promotoras del crecimiento en chile (*Capsicum annuum* L.): Desde plántula hasta calidad postcosecha

LUCIO LEOS ESCOBEDO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

MARZO, 2016

La presente tesis titulada: "**Micorriza arbuscular y bacterias promotoras del crecimiento en chile (*Capsicum annum* L.): Desde plántula hasta calidad postcosecha**", realizado por el alumno **Lucio Leos Escobedo**, 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
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA

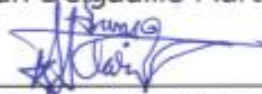
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



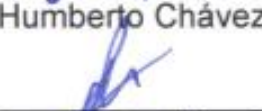
Dr. Julián Delgadillo Martínez

ASESOR



Dr. Sergio Humberto Chávez Franco

ASESOR



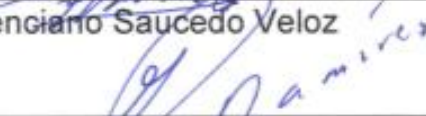
Dra. Ma. Teresa Santillán Galicia

ASESOR



Dr. Crescenciano Saucedo Veloz

ASESOR



Dr. Gustavo Ramirez Valverde

Montecillo, Texcoco, estado de México, Marzo de 2016

Micorriza arbuscular y bacterias promotoras del crecimiento en Chile (*Capsicum annuum* L.): Desde plántula hasta calidad postcosecha

**LUCIO LEOS ESCOBEDO, D. en C.
Colegio de Postgraduados, 2016.**

RESUMEN

La producción agrícola depende de factores como clima, suelo, agua y microorganismos rizosféricos. Algunos de estos son benéficos como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Rpcv). En un primer experimento se determinó la germinación *in vitro* de esporas de HMA asociados a Rpcv. Las cepas bacterianas evaluadas promovieron la germinación de las esporas de HMA en condiciones *in vitro* hasta 60%, mientras que sin Rpcv fue 11.66%. En un segundo experimento en invernadero se evaluó el crecimiento y los daños causados por zoosporas de *Phytophthora capsici* en plantas inoculadas con HMA y HMA más Rpcv. El porcentaje de colonización micorrízica fue mayor en el tratamiento de HMA+Rpcv con respecto al tratamiento solo con HMA. La altura, el diámetro de tallo, el peso seco de planta y el volumen radical fueron mayores con la inoculación de HMA+Rpcv en comparación con la inoculación de HMA y el testigo sin inoculación. En la resistencia de plantas al ataque de *P. capsici*, se encontró que a los 84 ddt el tratamiento de inoculación HMA+Rpcv, presentó 4.84% de plantas muertas, HMA 11.21% y el testigo 14.24%. En un tercer experimento se evaluó la promoción de crecimiento, producción de frutos y calidad postcosecha por HMA y/o Rpcv en tres genotipos de Chile destacados en el experimento previo. A su vez, se separaron los efectos de la inoculación con HMA de aquellos derivados de los nutrientes presentes en el mismo inoculante pero esterilizado. La inoculación con HMA provocó mayor producción de frutos en Pasilla y Guajillo, frutos que pierden menos humedad en Pasilla y que pierden más humedad en Ancho; además, frutos más blandos en Pasilla y Ancho. La inoculación con Rpcv promovió la producción de frutos en Pasilla y Guajillo y tonos más claros en la maduración de los tres genotipos. La co-inoculación produjo chiles más ácidos en el genotipo Ancho. Se diferenciaron los efectos de la inoculación con HMA de los derivados del aporte de nutrientes en el inoculante esterilizado en producción de frutos de los tres genotipos.

Palabras clave: Germinación de esporas, biofertilizantes, genotipos, *Phytophthora capsici*.

Arbuscular mycorrhizae and growth-promoting bacteria in pepper (*Capsicum annuum* L.): From seedling to postharvest quality

**LUCIO LEOS ESCOBEDO, D. en C.
Colegio de Postgraduados, 2016.**

ABSTRACT

Agricultural production depends on factors like weather, soil, water, and rhizosphere microorganisms. Some of these last are beneficial, like arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and rhizobacteria that promote plant growth (Rppg). First trial consisted in determining the *in vitro* germination of AMF spores associated with Rppg. Bacterial strains promote *in vitro* germination of spores up to 60%, while spore germination without Rppg was 11.66%. A second experiment in greenhouse were also evaluated growth and damage caused by zoospores of *Phytophthora capsici* in pepper plants inoculated with AMF and AMF+Rppg. The percentage of mycorrhizal colonization was greater with the AMF+Rppg treatment than with the AMF treatment alone. Plant height, stem diameter, dry weight, and radical volume were all greater with the inoculation with AMF+Rppg as compared to the AMF inoculation and the control treatment with no inoculation. With regard to plant resistance to attack by *P. capsici*, after 84 d the AMF+Rppg inoculation treatment had 4.84% dead plants, AMF had 11.21%, and the control treatment had 14.24%. In a third experiment, growth promotion, fruits production and its postharvest quality were evaluated on three pepper genotypes inoculated with HMA and/or Rppg. Although, effects associated with HMA activity against those associated with nutrient addition by autoclaved-inoculum were recognized. HMA inoculation promote fruits production and softer fruits on Pasilla and Ancho genotypes. Rppg inoculation promote fruits production and lighter external color on all genotypes. Double inoculation produce more acid fruits on Ancho genotype. Effects of HMA inoculation can differentiate from those associated with nutrient supply by the autoclaved inoculum.

Key words: Spore germination, biofertilizers, genotypes, *Phytophthora capsici*.

AGRADECIMIENTOS

Realizar una investigación en un estudio de nivel Doctoral no es posible sino existe la colaboración de personal humano, instituciones, dependencias de gobierno, asociaciones de productores y el interés propio. Es por ello que manifiesto un profundo agradecimiento a:

- a).- **CONACyT** (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). Por la beca otorgada durante los cuatro años de estudio doctoral.
- b).- **Colegio de Posgraduados *Campus Montecillo***. Por aceptarme en el Posgrado de interés.
- c).- **Programa de Fruticultura-REGEP**. Por aceptarme como estudiante de Doctorado.
- d).- **Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”**. Por todas las facilidades otorgadas.
- e).- **INIFAP** (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). Por el material facilitado de los genotipos de chile de estudio.

Al **Dr. Julián Delgadillo Martínez** (Profesor-Investigador del Programa Microbiología Agrícola).- Por su experiencia, conocimientos y el apoyo moral además del profesional en todo momento. El que me motivo para llevar a feliz término esta etapa y a explorar nuevos caminos y rumbos.

Al **Dr. Sergio Humberto Chávez Franco** (Profesor-Investigador del Programa de Fruticultura).- Mí aprecio y respeto sincero por todas las sugerencias y la asesoría brindada durante toda la etapa del Posgrado. Su amistad es invaluable para mí.

A la **Dra. María Teresa Santillán Galicia** (Profesor-Investigador del Programa de Acarología).- Por aceptar ser parte en este trabajo de investigación, por sus observaciones al trabajo y a mi persona. Por el apoyo incondicional que me brindó, por la paciencia que me tuvo durante la estadía. Especialmente por su amistad gracias.

Al **Dr. Crescenciano Saucedo Veloz** (Profesor-Investigador del Programa de Fruticultura).- Sus palabras fueron de aliento para mí en todo momento alentándome a no claudicar y a obtener los mejores resultados en los experimentos establecidos. Por aceptar formar parte de mi Consejo Particular y por brindarme todo su apoyo.

Al **Dr. Gustavo Ramírez Valverde** (Profesor-Investigador del Programa de Estadística).- Por su valiosa guía y apoyo sin restricción. Por ser parte de mi Consejo Particular y por brindarme todo su apoyo vaya una felicitación sincera.

Al **Dr. Eduardo García Villanueva** (Profesor-Investigador del Programa de Fruticultura).- Por su apoyo sin condición. Por ser parte de mi Consejo Particular en calidad de **PROFESOR-SINODAL**, una felicitación sincera y un profundo agradecimiento.

A todos los **profesores del Programa de Fruticultura**: Ma. Alejandra Gutiérrez Espinoza, Raquel Cano Medrano, Leticia Pavía Hernández, Ma. De Lourdes Arévalo Galarza, Araceli Gaytán, Teresa Colinas, **Guillermo Calderón Zavala**, Alfredo López, Enrique Alberto

Becerril Román, David Jaen, por brindarme su apoyo en todo momento y su confianza. Además del personal secretarial **Lupita, Elsa, Cristina y Sandra**.

A los **profesores del Programa de Edafología, área de Microbiología y otras: Dr. Ronald Ferrera Cerrato, Alejandro Alarcón**, Juan José Almaraz, Ma. Encarnación, Jesús Pérez Moreno, Roberto Quintero, Jorge, Manuel Sandoval Villa, Libia Trejo, Ma. De las Nieves, **Rosalba Cote Esquivel**, por su apoyo en todo momento y su confianza mi agradecimiento sincero. Además del personal secretarial Rosario, Laura, Lupita y Remedios.

A los **profesores de otros Programas**: Dr. Julio Sánchez Escudero, Jorge Cadena, Daniel Nieto, Amalio Santa Cruz, Víctor Heber Castillo, Manuel Ortega por su apoyo en todo momento y su confianza mi agradecimiento sincero.

A todos los **amig@s y compañer@s**, de diferentes Programas de Posgrado que tuve la suerte de conocer y convivir con ell@s ratos de alegrías y tristezas. A **Conny Rentería Chávez** un gran agradecimiento profundo y sincero, **Azareel, Vivian**, Heidy, Poncho Villegas, Josué, Gilberto, Brigsania, Deisy, David, Erick, Apolinar, **Mtra. Alicia Franco**, Juan Elías, **Maciel, Sra. Linda**, Víctor, Fanny, Cuauhtémoc, Hermelindo, Rigoberto, Araceli, Faustino, Rubí, Cristina Heredia, Yadira Cornejo, Ángeles, Dra. Arely, Mariana, Mariana Ferrera, Lupita, Rolando, Artemio, Emigdio, Anita Gómez, Alba, René, Irma, Paty, Martín, Luis, Blanca Berenice, **Aída**, Gabriel, **Sandra** (Botánica), Gerardo, **Elena** (Botánica), Nallely, Alejandro Berrospe, Nayeli (Rosita), Iván, Ma. Elena, **Ma. Elena Loera**, Reyes, **Angelita, Sonora, Poblano, Dr. Isidro**, Servando, Rocío, Elizabeth, Ivonne, Adela, Lulú, Jesús, Benjamín, Moi y todos **aquell@s** que no mencione por la amistad que poco a poco se fue forjando la que es invaluable.

A los **amig@s y compañer@s** que ahora se encuentran lejos, en la distancia pero no en el corazón, porque sus actos me hacen reflexionar sobre la vida de que en un momento estamos en otro ya no.

A la **Dra. Daniela Saucedo** por su apoyo en la preparación de reactivos en el Laboratorio de Postcosecha-Fruticultura en especial por su amistad sincera.

A los laboratoristas, personal de varias áreas y Biblioteca: **Roberto de la Rosa, Juan Manuel Dehza de la Rosa, Gabriel Vázquez, Mario Roque, Ángeles, Sra. Mary, Mario, Oscar Moreno, Paco, Comadre Lupita Anita, Lic. Ma. De la Luz, Héctor, Antonio, Elenita, Mariana, Javier, Isabel, Raymundo, Paco, Hugo, José Luis, Juan Castillo, Gerardo Pineda** por su apoyo y amistad sincera. A los que no mencione mil disculpas.

Al **Sr. Armando Rentería** y **Sra. Encarnación Chávez**, originarios de la localidad Ciénega de Abajo, municipio de Coyuca de Benítez en el estado de Guerrero por su gran amistad y cariño.

A la **Dra. Guadalupe Pérez González** por su gran cariño, amor y amistad. Gracias

A **Don Toño**, Sra. **Araceli** y **Nancy** del **Centro de Fotocopiado**, mi agradecimiento profundo.

DEDICATORIA

A **Dios** todo poderoso que sin su anuencia no hubiera sido posible cristalizar este logro

Me gustaría expresar mi más humilde agradecimiento y dedicatoria a mis padres **Sr. Rito Leos Núñez (†)** y **Sra. Sofía Escobedo Delgado**, quienes me enseñaron disciplina y a ser sencillo, humilde y agradecido con mis superiores. A mis hermanos **Alejandro (†)**, **Santiago (†)**, **Juan, Ma. Del Consuelo, Héctor, Gerardo, Martha Alicia, Luz María** y **Erika** por su apoyo y comprensión y que son parte de este logro.

Por su amor, consejos, apoyo y comprensión a mi novia
CLAUDIA SARAÍ CRUZ ESTRADA
quién se convirtiera en mi inspiración para alcanzar este logro académico.

Por su apoyo y comprensión a una gran amiga
Conny Rentería Chávez
con cariño y respeto

ESPERANZA...

Es desear que algo suceda, es la fe en creer que suceda y valentía de hacer que suceda

(Anónimo)

CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
Capítulo I	1
«REVISIÓN DE LITERATURA»	1
Género <i>Capsicum</i> : Generalidades.....	1
Rizósfera.....	1
Microorganismos promotores del crecimiento vegetal	2
Hongos micorrízicos arbusculares (HMA).....	2
Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Rpcv)	4
Biofertilizantes bacterianos	5
Interacción de las bacterias con plantas y otros microorganismos.....	6
Las bacterias asociadas a la producción de compuestos bioquímicos	7
Las bacterias en el control biológico de enfermedades	7
Rizobacterias fijadoras de N ₂ atmosférico	8
Microorganismos simbióticos fijadores de N ₂ atmosférico.....	10
Fijadores de N ₂ atmosférico de vida libre	12
LITERATURA CITADA	13
25. Huang, K., I. Ferrin-O´Connell, W. Zhang, G.A. Leonard, E.K. O´Shea, F.A. Quioco. 2007. Structure of the Pho85-Pho80 CDK-cyclin complex of the phosphate-responsive signal transduction pathway. Mol. Cell., 28 (4): 614-623.....	15
Capítulo II.....	19
«Germinación <i>in vitro</i> de esporas de hongos micorrízicos arbusculares asociados a bacterias promotoras del crecimiento vegetal ».....	19
RESUMEN.....	19
INTRODUCCIÓN.....	20
OBJETIVO	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Germinación <i>in vitro</i> de esporas de HMA	23
Obtención del inóculo de HMA.....	23
Desinfestación de esporas de HMA.....	26
Siembra de esporas de HMA.....	27

Germinación de esporas de HMA	27
Obtención de cepas de Rpcv	27
Tratamientos.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
Germinación <i>in vitro</i> de esporas de HMA	29
LITERATURA CITADA	31
Capítulo III	34
«Evaluación de 23 genotipos de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.), con hongos micorrízicos arbusculares asociados a bacterias promotoras del crecimiento vegetal y control de <i>Phytophthora capsici</i> en invernadero».....	34
RESUMEN.....	34
INTRODUCCIÓN.....	35
OBJETIVOS.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
Germinación de semillas	37
Preparación de semilleros.....	38
Siembra	39
Inoculación con HMA y Rpcv	39
Tratamientos de estudio.....	39
Microorganismos HMA y Rpcv	39
Solución nutritiva	41
Trasplante	41
Inoculación con <i>Phytophthora capsici</i>	42
Variables evaluadas en semillero	42
Variables evaluadas después del trasplante.....	42
Colonización micorrízica	43
Análisis estadístico	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
Variables evaluadas en semillero	48
Número de semillas germinadas	48
Altura de plántula	48
Número de hojas.....	51
Variables evaluadas después del trasplante.....	52
Altura de planta.....	52

Diámetro de tallo	52
Peso seco de la parte aérea	53
Volumen radical	53
Plantas muertas por ataque de hongos fitopatógenos	56
Colonización micorrízica	57
Índice de vigor (Iv)	58
CONCLUSIONES	61
LITERATURA CITADA	62
Capítulo IV	66
«Crecimiento, producción de frutos y calidad postcosecha de tres genotipos de chile inoculados con hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal»	66
RESUMEN	66
INTRODUCCIÓN	67
OBJETIVOS	69
HIPÓTESIS	69
MATERIALES Y MÉTODOS	70
Preparación de semilleros	71
Desinfestación de las semillas	71
Siembra	71
Inoculación con HMA y Rpcv	71
Tratamientos de estudio	71
Trasplante	72
Cosecha	74
Producción	75
Variables evaluadas durante el desarrollo del cultivo	75
Altura de planta	75
Diámetro de tallo	75
Número de hojas por planta	76
Número de flores por planta	76
Variables relacionadas con los frutos	76
Pérdida de peso	76
Color externo	77
Firmeza de los frutos	78

pH del fruto	78
Ácido cítrico	78
Contenido de vitamina C	79
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
Producción	80
Variables evaluadas en el desarrollo del cultivo	81
Altura de planta	81
Diámetro de tallo	82
Número de hojas por planta	82
Número de flores por planta	84
Variables relacionadas con los frutos	84
Pérdidas de peso en fruto	84
Color externo	85
Variables del fruto con pruebas destructivas	89
Firmeza de los frutos	89
pH del fruto	90
Ácido cítrico	92
Contenido de vitamina C (ácido ascórbico)	93
CONCLUSIONES	95
LITERATURA CITADA	96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2. 1. Características de las Rpcv utilizadas en este estudio.....	28
Cuadro 2. 2. Germinación <i>in vitro</i> de esporas de HMA inoculadas con Rpcv a los 32 días después de sembradas (dds).....	29
Cuadro 3. 1. Porcentaje de germinación de 23 genotipos de chile.....	38
Cuadro 3. 2. Número de esporas por 100 g de suelo húmedo correspondiente a las muestras de los inóculos de HMA en estudio.....	41
Cuadro 3. 3. Altura de planta en semillero para cada uno de los tratamientos y genotipos de chile a los 57 dds.....	49
Cuadro 3. 4. Altura de planta en semillero para cada uno de los tratamientos y genotipos de chile a los 74 dds en condiciones de invernadero.....	50
Cuadro 3. 5. Número de hojas en las plántulas de cada uno de los tratamientos y genotipos de chile a los 76 dds.....	51
Cuadro 3. 6. Altura de planta y diámetro de tallo (84 ddt) en 23 genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.	54
Cuadro 3. 7. Porcentaje de plantas muertas por ataque de fitopatógenos en 23 genotipos de diferentes tipos de chile y tratamientos de inoculación con HMA y Rpcv.	57
Cuadro 3. 8. Colonización micorrízica en 23 genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv en condiciones de invernadero.....	59
Cuadro 3. 9. Índices de vigor (Iv) en 23 genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.....	60
Cuadro 4. 1. Análisis físico y químico del suelo utilizado en este experimento.....	73
Cuadro 4. 2. Producción de frutos en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.	81
Cuadro 4. 3. Altura de la planta a los 43 ddt en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.....	82
Cuadro 4. 4. Diámetro de tallo a los 43 ddt en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.....	82
Cuadro 4. 5. Número de hojas por planta a los 43 ddt en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.....	83
Cuadro 4. 6. Número de flores por planta a los 43 ddt en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.....	84
Cuadro 4. 7. Pérdidas de peso en los frutos durante 8 días de almacenamiento después de su cosecha en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.	85
Cuadro 4. 8. Parámetros de color Ciel-Lab correspondientes al exocarpio externo de los frutos de chile obtenidos de cuatro evaluaciones (1, 4, 6 y 8 ddc) en condiciones de almacenamiento para cada uno de los tratamientos de estudio y tipos de chile. 2016.	87

Cuadro 4. 9. Parámetros de color Ciel-Lab correspondientes al exocarpio externo de los frutos de chile obtenidos de cuatro evaluaciones (1, 4, 6 y 8 ddc) en condiciones de almacenamiento para cada uno de los tratamientos de estudio y tipos de chile. 2016.	88
Cuadro 4. 10. Medias para firmeza del fruto de tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.	90
Cuadro 4. 11. pH del fruto en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.	91
Cuadro 4. 12. Contenido de ácido cítrico en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.	93
Cuadro 4. 13. Contenido de ácido ascórbico en el fruto en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1. Propagación de HMA en arena de río y ballico anual como planta trampa.	24
Figura 2. 2. Panorama de la propagación de HMA en macetas y charolas de plástico con arena de río y ballico anual como planta trampa.	25
Figura 2. 3. Esporas y micelio micorrízico observados en estereoscopio (40X).	25
Figura 2. 4. Imágenes del proceso de extracción de esporas por el método de decantación y tamizado en húmedo.	26
Figura 2. 5. Acercamiento de los grupos de esporas (en rojo) y el micelio fúngico (75X).	26
Figura 2. 6. Germinación de esporas de HMA asociadas a Rpcv a los 32 días después de sembradas <i>in vitro</i>	30
Figura 3. 1. Separación de raíces finas para realizar el proceso de tinción del micelio fúngico intraradical.	43
Figura 3. 2. Imágenes de las cápsulas de plástico utilizadas y el proceso de clareo y tinción de raíces para determinar colonización micorrízica.	45
Figura 3. 3. Imágenes del proceso de montaje de raíces teñidas para observación microscópica.	46
Figura 3. 4. Micrografías de la colonización micorrízicas y de las estructuras formadas por los HMA en los tejidos radicales de plantas de Chile. H= hifas, E= esporas, V= vesículas, A= arbusculos.	46
Figura 3. 5. Peso seco de la parte aérea y volumen radical (84 ddt) en 23 genotipos de Chile inoculados con HMA y Rpcv.	55
Figura 4. 1. Vista del experimento en invernadero.	74
Figura 4. 2. Vista de los chiles producidos en los tres genotipos (De izquierda a derecha, Pasilla, Ancho y Guajillo).	75
Figura 4. 3. Patrón de maduración de los frutos producidos por los tres genotipos (De izquierda a derecha, Pasilla, Ancho y Guajillo). 1= Testigo, 2= HMA, 3= Inoculante Esterilizado, 4= Rpcv, 5= HMA+Rpcv, 6= Inoculante Esterilizado+Rpcv.	77
Figura 4. 4. Imágenes de la producción de frutos por los tres genotipos y en tres tratamientos.	80

Capítulo I

«REVISIÓN DE LITERATURA»

Género *Capsicum*: Generalidades

El género *Capsicum sp.*, es definido como una especie nativa de América y de una gran importancia por su diversidad de usos (Cardona *et al.*, 2008). Originario del continente americano y el que comprende alrededor de 25 especies, de las que, cinco de ellas son cultivadas (Hunziker, 1979). Vestigios de *C. annuum*, datan de 7,000 años a.C., encontrados en cavernas en Tamaulipas y Puebla (región de Tehuacán) en México, mientras que de *C. baccatum*, en la región de Huaca Prieta en Perú, de 2,500 años a.C. (Brucher, 1989). Los *Capsicum*, fueron introducidos a Europa en el año de 1493, tiempo después el cultivo se extendió desde el Mediterráneo hasta Inglaterra en 1548, después a Europa Central. Llegó a la India desde Brasil en 1585. En China llega a finales del siglo XVIII (Boswell, 1949). Las especies de *Capsicum*, fueron asimiladas con éxito por culturas africanas, asiáticas y europeas. Las primeras muestras de Chile llevadas a España como especies amazónicas fueron *C. chinense* y *C. frutescens*. Por su parte *C. annuum*, fue introducido años más tarde de México o de América Central (Heiser, 1976).

Rizósfera

El crecimiento de los cultivos está influenciado por diversos factores bióticos y abióticos. La rizósfera es una capa de suelo muy delgada que rodea las raíces de las plantas y es extremadamente importante en la actividad y metabolismo radical. Fue descrita, por Lorenzo Hiltner en 1904, como la zona del suelo adyacente a las raíces donde se estimulan las comunidades microbianas debido a la actividad radical. En la actualidad, el concepto rizósfera incluye cualquier zona del suelo circundante a la raíz en la cual las propiedades físicas, químicas y biológicas se ven afectadas por el crecimiento y actividad radical (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2004).

La composición de los exudados radicales reduce la diversidad de las comunidades microbianas de manera selectiva. Gran número de microorganismos como bacterias, hongos,

protozoarios y algas coexisten en la rizósfera, siendo las primeras las más abundantes y las de mayor influencia en la fisiología de las plantas, en especial por su competitividad y por su capacidad de colonizar los tejidos radicales. Aquellos microorganismos que colonizan los tejidos radicales pueden dividirse en patógenos o en benéficos (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2004).

Microorganismos promotores del crecimiento vegetal

A la fecha, la población humana sigue en aumento y, como consecuencia, una incesante y creciente demanda de alimentos. Hasta hace algunos años, se consideraba que la única forma de aumentar los rendimientos de los cultivos era intensificando la aplicación de fertilizantes químicos y pesticidas. Este tipo de tecnología no puede ser sustentable debido a que genera altos costos económicos y tiene repercusiones medioambientales cada vez más reprobadas y hasta sancionadas como, calentamiento global de la Tierra y contaminación ambiental (Bui, 2003), además de que no favorece la inocuidad alimentaria. En comparación con la tecnología anterior, la utilización de microorganismos del suelo para aumentar los rendimientos de los cultivos, es una alternativa amigable con el ambiente, barata y sustentable. Afortunadamente, ha ido en aumento la información referente a la fijación biológica de N₂ atmosférico simbiótica y de vida libre, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés), la simbiosis micorrízica, la producción de inoculantes eficientes y sus aplicaciones tecnológicas para aumentar los rendimientos de los cultivos.

Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

Entre la gran cantidad de microorganismos rizoféricos que influyen en el crecimiento de las plantas se encuentran los HMA, los que contribuyen a la adaptación de las plantas a determinadas condiciones de suelo (Dakessian *et al.*, 1986; Franco-Ramírez *et al.*, 2007). Más de 200 especies de HMA, se encuentran agrupadas en la división *Glomeromycota* y son identificadas por las características morfológicas de sus esporas asexuales, considerando la estructura de la pared, el tamaño, el color y la ornamentación.

Clasificación de los HMA

Según Morton y Benny, (1990), los HMA son del Orden *Glomales* con dos Subórdenes *Glomineae*, *Gigasporineae*, tres familias *Glomaceae*, *Acaulosporaceae*, *Gigasporaceae* y seis

géneros *Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*. Walker y Trappe (1993), señalan que los HMA pertenecen a la División *Glomeromycota*, Clase *Glomeromycetes*, Orden *Glomerales*, *Paraglomerales*, *Archaeosporales*, *Diversisporales*. De acuerdo a Schüßler *et al.*, (2001), División *Glomeromycota*, Clase *Glomeromycetes*, Orden *Glomerales*, *Paraglomerales*, *Archaeosporales*, *Diversisporales*, Familias *Glomeraceae*, *Paraglomeraceae*, *Archaeosporaceae*, *Acaulosporaceae*, *Gigasporaceae*, *Diversisporaceae*, con siete géneros *Glomus*, *Paraglomus*, *Archaeospora*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*. Según Walker *et al.*, (2004), considera la clasificación de Schüßler *et al.*, (2001), agregando dos géneros más *Pacispora*, *Diversispora*. Sieverding y Oehl (2006), señalan que los HMA, presentan un Phylum *Glomeromycota*, Clase *Glomeromycetes*, Orden *Glomerales*, *Paraglomerales*, *Archaeosporales*, *Diversisporales*, Familia *Glomeraceae*, *Gigasporaceae*, *Acaulosporaceae*, *Entrophosporaceae*, *Pacisporaceae*, *Diversisporaceae*, *Paraglomeraceae*, *Archaeosporaceae*, *Geosiphoraceae*, Géneros *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Acaulospora*, *Kuclospora*, *Entrophospora*, *Pacispora*, *Diversispora*, *Paraglomus*, *Geosiphon*, *Archaeospora*, *Intraspora*.

La clasificación de los HMA según Morton y Redecker (2001), fue basada en características moleculares, morfológicas y ecológicas, además de estudios filogenéticos y evolutivos que separan a los primeros de los hongos endocitobióticos, *Geosiphon*, Piriforme del Phylum Zygomycota.

En México, se tiene conocimiento de la existencia de 44 especies de HMA, que equivale a un 22% del total de especies conocidas en el mundo. Estas especies pertenecen a ecosistemas naturales, sistemas agrícolas y sistemas perturbados (Chamizo *et al.*, 1998; Varela y Trejo, 2001; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2004).

Fisiología de la simbiosis micorrízica arbuscular

La colonización del hongo micorrízico se extiende por la epidermis y el parénquima cortical, no penetra en la endodermis tampoco en los tejidos vasculares y meristemáticos (Harley y Smith, 1983). Existiendo una gran diferencia con respecto a las infecciones

realizadas en la raíz por los hongos patógenos, los que sí penetran los haces conductores y meristemáticos.

El proceso de formación de la simbiosis de los HMA con la planta se inicia con la germinación de las esporas de resistencia en el suelo, cuando las condiciones del ambiente temperatura y humedad relativa han sido favorables (Bolan y Abbott, 1983). Después la emisión del tubo o tubos germinativos donde el micelio desarrolla un crecimiento hasta encontrar una raíz hospedadora, donde forma entonces una estructura similar a un apresorio y realiza la penetración en las células epidérmicas. Después de la penetración se da la colonización del tejido del parénquima de la raíz.

Numerosos estudios realizados demuestran que la inoculación con HMA de especies de interés agrícola mejora la nutrición y el crecimiento de la planta, además le permite superar condiciones de estrés biótico y abiótico (Calvet y Camprubi 1996; Franco-Ramírez *et al.*, 2007; Perrin, 1991).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) forman una asociación natural con la gran mayoría de las plantas (Herman *et al.*, 2012; Schreiner y Bethlenfalvay, 1997; Jackson y Mason, 1984; Myga-Nowak *et al.*, 2010; Fernández, 2003). Desde hace décadas se viene estudiando la capacidad de estos organismos con respecto a la sobrevivencia de las plantas terrestres por el efecto benéfico que ocurre en la simbiosis (Harley y Smith, 1983; Siqueira y Franco, 1988; Fernández, 2003; Rivera, *et al.*, 2003). En la actualidad el uso de inoculantes microbianos sustituye a la aplicación de fertilizantes químicos y algunos plaguicidas obteniendo con ello prácticas de producción agrícola sostenibles (ÓGara, 1996; Fernández, 2003). La especificidad entre ambos simbioses, planta-microorganismo está condicionada en mayor o menor grado por las características físico-químicas y biológicas de la rizósfera sobre el cual se desarrollan (Rai, 2001; Fernández, 2003).

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Rpcv)

Se ha demostrado que la gran mayoría de las plantas terrestres están asociadas con una o varias poblaciones de especies de bacterias (Sachs, 1965; Strobel y Daisy, 2003; Huang *et*

al., 2007). Esto ha despertado el interés desde hace años de conocer los aspectos relacionados con la composición, estructura y funcionamiento de las comunidades bacterianas en los vegetales (Van Loon, 2007). Se denominan rizobacterias a aquellas que viven en la rizósfera y ejercen un efecto positivo en el crecimiento de las plantas, efecto que puede ser directo o indirecto. Así, para definir a las bacterias con efecto benéfico se utiliza el término rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (Rpcv o PGPR, por sus siglas en inglés). Debido a que la importancia de la rizósfera es tomada más en cuenta cada día, la lista de Rpcv ha aumentado de igual manera. Numerosas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia* han sido citadas como Rpcv (algunos ejemplos desde los años 80 a la fecha pueden consultarse en: Kloepler y Schroth, 1978; Okon y Labandera, 1994; Glick, 1995; Joseph *et al.*, 2007; Erturk *et al.*, 2010).

Biofertilizantes bacterianos

Recientemente, inoculantes microbianos basados en Rpcv que promueven el crecimiento vegetal han salido a la venta. Estos actúan vía reducción de los daños causados por patógenos (bioprotectores), mejoramiento de la nutrición vegetal (biofertilizantes) y producción de fitohormonas (bioestimulantes). Los mayores avances se han logrado con los bioprotectores y con géneros bacterianos como: *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Agrobacterium*; los cuales reducen la incidencia de enfermedades en las plantas mediante inducción de la resistencia sistémica y producción de sideróforos o antibióticos.

En referencia a lo anterior, las Rpcv pueden desencadenar los mecanismos vegetales de defensa en contra de enfermedades y preparar a las plantas cuando los ataques sean por patógenos. Los sideróforos que producen algunos Rpcv retiran los micronutrientes disponibles en la rizósfera (Fe principalmente) dejando a los microorganismos patógenos con deficiencias en éstos. Las Rpcv que producen antibióticos liberan compuestos que inhiben el crecimiento de los patógenos. Los biofertilizantes pueden incrementar la nutrición de las plantas, especialmente la acumulación de N por biofertilizantes a base de la Rpcv *Azospirillum* con aportes de hasta 50 kg de N ha⁻¹. La roca fosfórica es una importante fuente de fosfatos pero

su disponibilidad para las plantas es reducida en la mayoría de las condiciones de cultivo. Las bacterias que solubilizan fosfatos pueden aumentar considerablemente la disponibilidad de P para las plantas. Las fitohormonas que las bacterias pueden producir incluyen al ácido indolacético, citocininas, giberelinas e inhibidores de la producción de etileno. Algunas Rpcv tienen, también, una función en la degradación de contaminantes. En condiciones de alta salinidad, bacterias del género *Azospirillum* pueden sobrevivir debido a la acumulación de solutos compatibles y en condiciones de deficiencia hídrica y salinidad, se pueden encontrar Rpcv del género *Pseudomonas* (Benhamou *et al.*, 2000).

El uso de Rpcv representa una opción interesante a la fertilización química y al uso de pesticidas y suplementos ya que pueden incrementar el crecimiento de las plantas en raíz y/o parte aérea. Algunas Rpcv, especialmente las incorporadas a las semillas durante la siembra, son capaces de establecerse y multiplicarse en los tejidos radicales y acompañar a la planta durante su ciclo vital. En sistemas de manejo integrado de cultivos en los que se minimiza la aplicación de agroquímicos las Rpcv son un componente crucial para la obtención de buenos rendimientos, especialmente en términos de biocontrol de enfermedades en plantas que pasan por una etapa de semillero y fortalecimiento antes de trasplantarse en campo (Kloepper *et al.*, 2004). Algunas Rpcv provocan en las plantas la aparición de la denominada resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés), mecanismo de defensa que es efectivo en contra de un amplio rango de patógenos (Pieterse *et al.*, 2003). La ISR es similar a la resistencia inducida por el patógeno, en la cual las partes sanas de una planta previamente infectada presentan una resistencia mayor a los posibles ataques del patógeno. En silvicultura también se han aplicado Rpcv asociadas a hongos micorrízicos. Especialmente aquellas bacterias que producen fitohormonas (Tizzard *et al.*, 2006).

Interacción de las bacterias con plantas y otros microorganismos

Una gran cantidad de bacterias endófitas cohabitan dentro de tejidos vegetales durante una parte de su ciclo de vida sin causar daño o lesiones al hospedero, estableciendo una asociación simbiótica y produciendo grandes beneficios para la planta. (Pérez y Chamorro, 2013). En su gran mayoría, las plantas terrestres están colonizadas por una diversidad de

bacterias conocidas como endófitas. Estos organismos pueden ser detectados dentro de tejidos de plantas sanas (Schulz y Boyle, 2006).

La gran mayoría de las plantas están asociadas con una o varias poblaciones de especies de bacterias (Strobel y Daisy, 2003; Huang *et al.*, 2007). Esto ha despertado el interés desde hace años por conocer los aspectos relacionados con la composición, estructura y funcionamiento de las comunidades bacterianas en los vegetales (Van Loon, 2007). Producen una cantidad de metabolitos primarios que actúan como antibiótico (Castillo *et al.*, 2002), además de metabolitos secundarios (Chanway, 1998) y otros compuestos que funcionan como agentes anti-inflamatorios (Taechowisan *et al.*, 2007), así como sustancias que promueven el crecimiento vegetal y el control biológico.

Los microorganismos asociados a especies vegetales son reportados como productores de varios compuestos bioactivos con posible uso farmacológico (Strobel y Daisy, 2003).

Las bacterias asociadas a la producción de compuestos bioquímicos

Existe en los microorganismos un interés biotecnológico de investigación por la producción de compuestos volátiles, compuestos aromáticos los que poseen propiedades para su uso tanto en la agricultura como en la industria (Zhi-Lin *et al.*, 2012). Dentro de estos productos se han reportado compuestos volátiles (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010).

Las bacterias en el control biológico de enfermedades

La eficacia de tales microorganismos endófitos como agentes de control biológico dependerá en gran parte de varios factores como la especificidad del huésped, la dinámica poblacional y el patrón de colonización, la capacidad de moverse dentro de los tejidos del huésped y la capacidad de inducir resistencia sistémica (Morton y Benny, 1990; Compant *et al.*, 2005).

La colonización de las plantas por las bacterias endófitas que son asociadas de manera natural tienden a actuar como agentes de control biológico induciendo modificaciones en la pared celular participando en la deposición de la calosa, la pectina, la celulosa y en la producción de compuestos fenólicos que inducen a la formación de una barrera estructural en

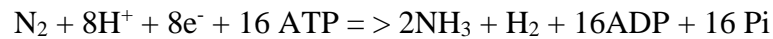
el sitio de ataque de los organismos fitopatógenos (Benhamou *et al*, 2000). Además de la inducción de la formación de proteínas relacionadas con la defensa como la peroxidasa, la quitinasa y la Beta-1,3 gluconasa (Gray y Smith, 2005).

Rizobacterias fijadoras de N₂ atmosférico

El crecimiento de las plantas depende, primeramente, de la disponibilidad de agua y, después, de diversos nutrientes esenciales. Dentro de los elementos esenciales para las plantas, ninguno es tan importante como el N. Es un elemento requerido en grandes cantidades para la formación de proteínas, ácidos nucleicos e innumerables compuestos importantes en la fisiología vegetal, como la clorofila. Una fuente enorme de N es la atmósfera, constituida en su 79% por este elemento en su forma gaseosa de N₂ (triple ligadura entre dos átomos de N, lo que la convierte en una molécula muy estable y casi inerte), la cual, no es aprovechable por la mayoría de los seres vivos que habitan nuestro planeta. La corteza terrestre es otra de las fuentes de N. En la capa más superficial de ésta, podemos encontrar el amonio (NH₄⁺) y los nitratos (NO₃⁻), formas iónicas fácilmente aprovechables por los organismos, incluyendo las plantas, pero, en cantidades que suelen ser limitantes para el crecimiento de los cultivos en la mayoría de los suelos agrícolas (Boddey *et al.*, 2001).

Es por lo anterior, que son fundamentales aquellos microorganismos capaces de convertir el N₂ abundante y no aprovechable de la atmósfera en formas asimilables por las plantas y así contribuir a que sea posible la vida en nuestro planeta. Este proceso de conversión de N₂ en NH₄ se le conoce como fijación biológica de N atmosférico y está restringida a un pequeño grupo de procariontes (principalmente bacterias y algunas cianobacterias y actinomicetos) que poseen el complejo enzimático de la nitrogenasa. Los integrantes de este grupo de microorganismos pueden realizar la fijación de N₂ de manera simbiótica (con plantas, principalmente) o sin establecer una simbiosis estricta con otros organismos, a esta última se le denomina de vida libre. El ser humano es capaz de fabricar fertilizantes nitrogenados a partir del N₂ atmosférico por el proceso industrial denominado de Haber-Bosch, el cual requiere de alta presión y altas temperaturas para llevarse a cabo y, por ende, un elevado gasto energético sustentado en los, cada vez más escasos y costosos, combustibles fósiles (Arora y Singh, 2003).

La fijación biológica de N₂ es llevado a cabo gracias al complejo enzimático de la nitrogenasa, conformado por una Fe-proteína y una Fe-Mo proteína. Es un proceso energéticamente caro que puede representarse por la ecuación siguiente:



En la cual, dos moles de amoníaco son producidas a partir de una mol de N₂ molecular requiriendo 16 moles de ATP y la intervención de electrones y protones (H⁺). Cabe destacar que este complejo enzimático es muy sensible de inactivación por O₂, el cual reacciona con el Fe de las enzimas. Es por lo anterior que la protección del complejo enzimático de la nitrogenasa de la inactivación por O₂ es un proceso crucial en los microorganismos fijadores de N, excluyendo a los anaeróbicos, pero tomando gran importancia en microorganismos fotosintéticos, como las cianobacterias, que durante la fotosíntesis generan O₂ o microorganismos que se desarrollan en ambientes aeróbicos, como los fijadores de vida libre *Azotobacter* y *Beijerinckia*. Estos microorganismos tienen una alta tasa respiratoria y de esta manera mantienen un muy bajo nivel de O₂ en el interior de sus células, además, secretan grandes cantidades de exo-polisacáridos que retienen agua en las inmediaciones de la célula, lo cual limita el paso de O₂ al interior celular (Boddey *et al.*, 2001).

En los microorganismos fijadores de N simbióticos a leguminosas, el diálogo molecular entre la bacteria y la planta desencadenan una serie de procesos que culminan con la fijación de N atmosférico en un órgano característico de esta simbiosis, el nódulo. Dentro del nódulo, además de barreras físicas para evitar la difusión del O₂ al interior, se sintetiza leg-hemoglobina, una proteína con alta afinidad por O₂ y que es capaz de reducir al mínimo el O₂ libre. Esta proteína es la causante de las coloraciones rojizas dentro de los nódulos activos. De otra manera, las cianobacterias también protegen a su sistema enzimático de la nitrogenasa. Estos microorganismos, realizan la fijación de N₂ atmosférico en células especializadas y morfológicamente distintas a las demás, las cuales se denominan heterocistos. Una de las características importantes de los heterocistos es que poseen sólo el fotosistema I, encargado de producir ATP a partir de reacciones que involucran a la energía luminosa. Las otras células

de las cianobacterias poseen los fotosistemas I y II, siendo precisamente el fotosistema II el encargado de producir O₂ durante el rompimiento de la molécula de agua en el proceso fotosintético (Arora y Singh, 2003).

Microorganismos simbióticos fijadores de N₂ atmosférico

Simbiosis entre leguminosas y rizobias

Al hablar de fijación simbiótica de N₂, se hace referencia a asociaciones íntimas y especializadas para favorecer la eficiencia de este proceso importante para la entrada de N a los sistemas naturales y agrícolas, pero también hay que considerar que es un proceso energéticamente caro, en el que los microorganismos alojados en el nódulo pueden consumir 20% de los fotosintatos disponibles en éste. Los microorganismos que realizan fijación simbiótica de N₂ atmosférico que más se han estudiado son los que forman nódulos en las raíces (excepcionalmente, en tallos de *Sesbania*) de las leguminosas. Estas bacterias se denominan genéricamente, rizobias y pueden pertenecer a los géneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y algunos otros géneros como *Burkholderia*, *Methylobacterium* u *Ochrobactrum*, que, al parecer, han adquirido la capacidad de nodular las raíces y en algunos casos fijar N₂ atmosférico dentro de los nódulos de leguminosas, por transferencia genética horizontal (Joseph *et al.*, 2007).

En todos los casos, las bacterias penetran los tejidos vegetales y se forma un primordio nodular y, posteriormente, un órgano especializado en fijación de N₂ atmosférico y característico de la simbiosis, el nódulo. La cantidad de N atmosférico fijado representa la magnitud del ahorro en fertilizantes químicos. En la simbiosis leguminosa-rizobia pueden fijarse anualmente 250 kg de N ha⁻¹ (Wagner, 2012). En el cultivo de soya, que fija N simbióticamente en asociación con bacterias del género *Bradyrhizobium*, se calcula que la entrada de N a los suelos puede ser de hasta el 77% del flujo total mundial (90 kg de N ha⁻¹ año⁻¹, Herridge *et al.*, 2008).

Simbiosis actinorrízica

Dentro del grupo de los actinomicetos o bacterias filamentosas, se encuentra el género *Frankia*. Las especies de este género son de lento crecimiento en condiciones *in vitro* y requieren de medios de cultivo con muchos suplementos, lo que indica que son simbioses muy especializados. *Frankia* forma nódulos fijadores de N₂ atmosférico (comúnmente denominados actinorrizas) en las raíces de árboles y arbustos de diferentes familias, destacando la simbiosis con los géneros *Alnus* y *Casuarina*. Las ventajas que obtienen estas plantas de la simbiosis con *Frankia* les permiten ser pioneras en la colonización de suelos con fuertes limitantes nutrimentales (Sellstedt y Richau, 2013).

Simbiosis entre cianobacterias y plantas

Las cianobacterias son microorganismos que realizan fotosíntesis y, además, pueden fijar N₂ atmosférico como organismos de vida libre, lo que les permite ser pioneros en la colonización de ambientes muy pobres como desiertos o iniciar con los procesos de intemperización de las rocas en simbiosis con líquenes. Además, es de gran importancia la asociación simbiótica que establecen con el helecho acuático *Azolla* y con las cícadas. En el caso de *Azolla*, se trata de un helecho acuático que puede crecer durante todo el año en la superficie de lagos, canales de riego, ríos y cualquier cuerpo de agua no-salada. La cianobacteria (*Anabaena azollae*) encuentra su nicho dentro de las frondas del helecho donde realiza la fijación de N₂ atmosférico, la cual puede ser del orden de 450 a 600 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ (Narayan, 2011). El N fijado es aprovechado directamente por el helecho para su crecimiento y, después, es común que la fitomasa del helecho sea utilizada como abono verde en los arrozales (Arora y Singh, 2003). Khumairoh *et al.* (2012), mencionaron que los rendimientos de arroz son 114% mayores al incluir *Azolla*, peces y patos en el sistema de cultivo que sólo añadiendo compost o fertilizantes químicos. Este tipo de tecnologías que incluyen mayor diversidad de organismos demandan un mejor conocimiento de todos los componentes del sistema, pero también representan tecnologías sustentables y favorables para el ambiente.

Fijadores de N₂ atmosférico de vida libre

La fijación simbiótica de N₂ atmosférico es una asociación planta-microorganismo muy especializada para ganar en eficiencia del proceso, pero además, existen un gran número de bacterias fijadoras de N₂ atmosférico de vida libre asociadas a las raíces de las plantas. Por ejemplo, *Azospirillum* es un género de bacterias fijadoras de N que comúnmente se encuentran en la rizósfera de gramíneas y *Azotobacter* es un género similar pero con un mayor rango de plantas a las que se puede asociar. Otro ejemplo muy interesante, es el caso de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, un endófito de caña de azúcar con actividad fijadora de N₂, solubilizadora de fosfatos y de Zn y productora de promotores del crecimiento vegetal (Nieto-Peñalver *et al.*, 2012), que se desarrolla en la rizósfera y coloniza los tejidos, no solo radicales, sino también los tejidos aéreos de caña de azúcar. En los tres casos, las bacterias crecen a expensas de los azúcares y otros compuestos exudados por las raíces de las plantas, mientras que las bacterias contribuyen, de manera modesta, en la nutrición nitrogenada de la planta. El aporte de N por estas bacterias, vía fijación biológica, no se presenta en las magnitudes deseadas debido a que es un proceso energéticamente caro, demanda muchos azúcares y el aporte de éstos en los exudados no es continuo e ilimitado.

Hay evidencia de que las bacterias fijadoras de N₂ de vida libre favorecen el estado nutricional de las plantas, aunque, sin llegar a los niveles que la fijación simbiótica de N₂ aporta. La contribución de la fijación biológica de N₂ atmosférico en el contenido total de N en caña de azúcar puede ser de hasta 60%, lo que indica que en suelos con bajos contenidos de N, la fijación biológica puede ser suficiente para cubrir la demanda de este elemento, si todos los otros nutrientes se encuentran en cantidades adecuadas. De especial importancia son micronutrientes como el Fe y el Mo, por ser componentes esenciales del complejo de la nitrogenasa, enzima encargada del proceso de fijación de N (Boddey *et al.*, 2001). No dejando a un lado que, al igual que la simbiótica, la fijación biológica de N₂ llevada a cabo por microorganismos de vida libre como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, puede verse inhibida debido a la aplicación de fertilizantes nitrogenados (Medeiros *et al.*, 2006). En otros estudios, se ha comprobado la importancia de inocular bacterias fijadoras de N₂ de vida libre como *Azospirillum brasilense* para favorecer el crecimiento y la aclimatación de porta-injertos de árboles frutales producidos *in vitro* (Russo *et al.*, 2008).

LITERATURA CITADA

1. **Arora**, A. y P.K Singh. 2003. Comparison of biomass productivity and nitrogen fixing potential of *Azolla* SPP. *Biomass and Bioenergy* 24 (3): 175-178.
2. **Benhamou**, N., S. Gagné, D.L. Quéré, L. Dehbi, 2000. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Biochem. Cell Biol* 90: 45-56.
3. **Boddey**, R. M., J.C. Polidoro, A.S. Rezende, B.J.R. Alves y S. Urquiaga. 2001. Use of the ^{15}N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N_2 fixation to grasses and cereals. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 889-895.
4. **Bolan**, N.S., L.K. Abbott. 1983. Seasonal variation in infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to plant response to applied phosphorus. *Aust. J. of Soil Res.* 21: 208-210.
5. **Boswell**, V.R. 1949. Garden pepper. Both a vegetable and condiment. *National Geographic Mag.* 96: 166-167.
6. **Brucher**, H. 1989. *Useful Plants of Neotropical Origin and their Wild Relatives*. Springer Verlag. Nueva York. Pp: 165-172.
7. **Bui**, E.N. 2003. Soil salinity: A neglected factor in plant ecology and biogeography. *Journal of Arid Environments* 92: 14-25.
8. **Calvet**, C. y A. Camprubí. 1996. Isolation and screening of mycorrhizal fungi from citrus nurseries and orchards and inoculation studies. *Hortscience* 31: 366-369
9. **Cardona** G., C.P. Peña-Venegas, A. Arcos. 2008. Occurrence of arbuscular micorrhizae fungi in red pepper (*Capsicum sp.*) in the Amazonian region of Colombia. *Agronomía Colombiana*. 26 (3): 459-470.
10. **Castillo**, U.F., G.A. Strobel, E.J. Ford, W.M. Hess, H. Porter, J.B. Jensen. 2002. Munumbicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* (NRRL30562) endophytic on *Kennediana grisea*. *Microbiology* 148: 2675–2685.
11. **Chamizo**, A., R. Ferrera-Cerrato, L. Varela. 1998. Identificación de especies de un consorcio del genero *Glomus*. *Rev. Mex. Mic.* 14: 37-40.
12. **Chanway**, C.P. 1998. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia* 50, 149–170.

13. **Compant, S.**, B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, y E. Barka. 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Sep; 71(9): 4951–4959. doi: 10.1128/AEM.71.9.4951-4959.
14. **Dakessian, S.**, M. S. Brown y G. J. Bethlenfalvay. 1986. Relationship of mycorrhizal growth enhancement and plant growth with soil water and texture. *Plant and Soil* 9(3): 439-443.
15. **Erturk, Y.**, S. Ercisli, A. Haznedar, R. Cakmakci. 2010. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biological Research* 43:91-98.
16. **Fernández, M.F.** 2003. Factibilidad biológica de la micorrización “*in vitro*” de papa (*Solanum tuberosum*). Informe Científico Final. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Departamento de Agroquímica y Nutrición de Plantas. La Habana, Cuba. Pp 1-94
17. **Ferrera-Cerrato, R.**, A. Alarcón. 2004. Biotecnología de los hongos micorrízicos arbusculares. In: Memoria Simposio de Biofertilización. A Díaz F, P M Mayek, A Mendoza, M N Maldonado (Eds.). Campo Experimental Río Bravo, INIFAP y Centro de Biotecnología Genómica, IPN. Río Bravo, Tamps, México. p. 1-9.
18. **Franco-Ramírez, A.**, R. Ferrera-Cerrato, L. Varela-Fregoso, J. Pérez-Moreno, A. Alarcón. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi in chronically petroleum contaminated soils in México and the effects of petroleum hydrocarbon on spore germination. *J. Basic Microbiol.* 47: 378-383.
19. **Glick BR,** 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41:109–114.
20. **Gray, E. J.**, y D. L. Smith. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37:395-412.
21. **Harley, J.L.**, S.E. Smith. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, Toronto.
22. **Heiser, B.Ch.** 1976. Peppers, *Capsicum* (Solanaceae), in N. W. Simmonds (ed.). *The evolution of crop plants*. London: Longman. 265-268.
23. **Herman, D. J.**, Firestone, M. K., Nuccio, E. y Hodge, A. 2012. Interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a soil microbial community mediating litter decomposition. *FEMS Microbiology Ecology*, 80: 236–247.

24. **Herridge**, D.F., M.B. Peoples, R.M. Boddey. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil* 311: 1-18.
25. **Huang**, K., I. Ferrin-O'Connell, W. Zhang, G.A. Leonard, E.K. O'Shea, F.A. Quioco. 2007. Structure of the Pho85-Pho80 CDK-cyclin complex of the phosphate-responsive signal transduction pathway. *Mol. Cell.*, 28 (4): 614-623.
26. **Hunziker**, A.T. 1979. South American Solanaceae: a synoptic survey. In Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD. (Eds.). *The biology and taxonomy of the solanaceae*. Linnean Society Symposium. 7: 49-85.
27. **Jackson** RM. y Mason PA. 1984. *Mycorrhiza*. Edward Arnold, Ltd, London. 60 pp. ISBN 0-7131-2876-3.
28. **Joseph**, B., R.R. Patra y R. Lawrence. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L). *International Journal of Plant Production* 1: 141-152.
29. **Khumairoh** U., J.C. Groot y E.A. Lantinga. 2012. Complex agro-ecosystems for food security in a changing climate. *Ecol. Evol.* 2(7): 1696-704.
30. **Kloepper**, J.W., M.N. Schroth. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *In Proc. Of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Clarey G (ed). Station de pathologie vegetale et phyto-bacteriologie. Angers, France. 879-882.
31. **Kloepper**, J.W., S.M. Reddy, R. Rodriguez-Kabana, D.S. Kenney, N. Kokalis- Burelle y N.M. Ochoa. 2004. Application for rhizobacteria in transplant production and yield enhancement. *Acta Horticulturae* 631: 217-229.
32. **Macías-Rubalcava**, M., B. Hernández-Bautista, F. Oropeza, G. Duarte, M. González, A. Glenn. 2010. Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodyucatanensis*; a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *Journal of Chemical Ecology*, 36(10): 1122–1131.
33. **Medeiros**, A.F.A., J.C. Polidoro, V.M. Reis. 2006. Nitrogen source effect on *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonization of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant and Soil* 279: 141-152.
34. **Morton**, J.B., D. Redecker. 2001. Two new families of Glomales, Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycología*. 93 (1): 181-185
35. **Morton**, J.B., G.L. Benny. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae, *Mycotaxon*, Vol. 37, pp. 471–491.

- 36. Myga-Nowak, M., M. Marczak, P. Krupa.** 2010. Mycorrhiza helper bacteria. *SYLWAN*. 154 (12): 837-845.
- 37. Narayan, S. D.** 2011. Culture of *Azolla* and its efficacy in diet of *Labeo rohita*. *Aquaculture* 310: 376-379.
- 38. Nieto-Peñalver, C.G., E.V. Bertini y L.I. Figueroa.** 2012. Identification of N-acyl homoserine lactones produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 cultured in complex and synthetic media. *Arch Microbiol.* 194(7): 615-22.
- 39. O'Gara, F.** 1996. The biotechnology and ecology of rhizosphere microorganisms. In: Novel biotechnological approaches to plant production: from sterile root to mycorrhizosphere. Joint COST meeting 8.21, Pisa, Italy; p. 11.
- 40. Okon, Y., C.A. LabanderaGonzalez.** 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*. In: M.H. Ryder, P.M. Stephens y G.D. Bowen (eds.) *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Adelaida, Australia. 274-278.
- 41. Pérez, C. A., A. L. Chamorro.** 2013. Bacterias endófitas: Un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Revista Colombiana Ciencia Animal*. Vol. 5. No. 2: 439-462.
- 42. Perrin, R.** 1991. Mycorrhizes et protection phytosanitaire. In *Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées*. Ed. Strullu D G, pp 93-13(1. Lavoisier, Paris, France.
- 43. Pieterse, C., J.A. Pelt, B.W. Verhagen, T. Jurriaan, S.C. Wees, M. Léon-Kloosterziel, L.C. Loon.** 2003. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis* 35: 39-54.
- 44. Rai, M.K.** 2001. Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37: 158-167.
- 45. Rivera R., F. Fernández, A. Hernández, J. R. Martín and Kalyanne Fernández.** 2003. The effective management of arbuscular mycorrhizal symbiosis, a way to sustainable agriculture. Case study: The Caribbean. The Havana: INCA, 166 p. ISBN: 959 - 7023 - 24 - 5.
- 46. Russo, A, Vettori, L, Felici, C, Fiaschi, G, Morini, S y Toffanin, A.** 2008. Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr.S 2/5 plants. *J Biotechnol.* 134: 312–319.
- 47. Sachs, RM.** 1965. Stem elongation. *Annu Rev Plant Physiol.*, 16: 73–96

48. **Schreiner** R.P. y G.J. Bethlenfalvay. 1997. Plant and soil response to single and mixed species of arbuscular mycorrhizal fungi under fungicide stress. *Applied Soil Ecology* 7 (1997) 93-102.
49. **Schübler**, A.; Schwarzott, D. & Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 102(12): 1413-1421.
50. **Schulz** B. y Boyle C. 2006. What are endophytes? In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, editors. *Microbial Root Endophytes*. Berlin, Germany: Springer-Verlag; pp. 1–13.
51. **Sellstedt** A. y Richau KH. 2013. Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic *Frankia*. *FEMS Microbiol Lett.* 342(2):179-186.
52. **Sieverding** E, Oehl F. 2006. Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 80: 69–81.
53. **Siqueira**, J.O. y Franco, A.A. 1988. *Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas*. Lavras: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 235p.
54. **Strobel**, G., B. Daisy. 2003, *Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67: 491–502.
55. **Tizzard**, A.C., M. Vergnon y P.W. Clinton. 2006. The unseen depths of soils- how plant growth promoting microbes may advance commercial forestry practices. *New Zealand Journal of Forestry* 51: 9-12.
56. **Varela**, L., D. Trejo. 2001. Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, Núm.1. p. 39-51.
57. **Van Loon**, L. C. 2007. Plant Responses to Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology* DOI: 1007/s10658-007-9165-1
58. **Wagner**, S. C. 2012. Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge* 3(10): 15-18.
59. **Walker**, B., C.S. Holling, S.R. Carpenter, A. Kinzig. 2004. Resilience, adaptability and transformability in social–ecological systems. *Ecology and Society* 9 (2): 5. [on line] URL: <http://www.ecologyandsociety.org/vol9/iss2/art5/>
60. **Walker**, C.; J.M. Trappe. 1993. Names and epithets in the Glomales and Endoglomales. *Mycological Research* 97: 339-344.

61. **Zhi-Lin, Y., C. Yi-Cun, X. Baige, Z. Chu-Long.** 2012. Current perspectives on the volatile-producing fungal endophytes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(4):363–373.

Capítulo II

«Germinación *in vitro* de esporas de hongos micorrízicos arbusculares asociados a bacterias promotoras del crecimiento vegetal »

RESUMEN

La simbiosis micorrízica es de gran importancia para la producción sustentable de cultivos. Es por eso que las tecnologías más modernas y amigables con el ambiente requieren la disponibilidad de inoculantes con HMA. Además, se ha demostrado la presencia de diversos tipos de microorganismos, en especial bacterias, asociadas a las esporas de hongos micorrízicos y participes en germinación de esporas o desarrollo de su hifa germinativa; pasos iniciales, pero trascendentales en el establecimiento de la simbiosis con las plantas. Este estudio consistió en determinar si la germinación *in vitro* de esporas de HMA se ve afectada por la inoculación con Rpcv. A los 32 días de evaluación, la presencia de Rpcv favoreció la germinación *in vitro* de esporas de HMA. Las rizobacterias *Pseudomonas tolasii* (P-61) y *Bacillus pumilus* (R-44), promovieron la germinación de esporas de los HMA (*Rhizophagus intraradices*, Jalapa I y Cedro) hasta 60% mientras que la germinación de esporas sin Rpcv fue de 11.66%.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la pérdida de cultivos de interés agrícola por problemas fitosanitarios demanda una solución, agregando además los problemas de suelos con excesos de sales ocasionado por altas cantidades de fertilizantes químicos aplicadas sin control (Aliye, *et al.*, 2008). Con base a estos problemas que hoy en día enfrentamos se ha buscado encontrar una alternativa de solución utilizando microorganismos nativos de la rizósfera como los HMA asociados a las Rpcv.

Desde hace algunas décadas los microorganismos mayormente estudiados han sido los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), los que forman asociaciones micorrízicas de forma natural con la mayoría de las especies vegetales. Considerados por ello simbioses universales (Lorelí, *et al.*, 2002). En las comunidades microbianas asociadas a estos organismos se han encontrado bacterias benéficas, hongos filamentosos o levaduras, los cuales contribuyen a la colonización de las plantas (Mirabal-Alonso *et al.*, 2008). La micorrización refiere al establecimiento de una simbiosis entre el hongo y la planta (Read *et al.*, 1992; Mirabal-Alonso *et al.*, 2008).

Esta asociación natural con la mayoría de las plantas (Herman *et al.*, 2012; Schreiner y Bethlenfalvay, 1997; Jackson y Manson, 1984; Myga-Nowak *et al.*, 2010; Fernández, 2003) desde hace ya millones de años ha dado margen, en la actualidad, a estudiarla capacidad de estos simbioses en la sobrevivencia de las plantas (Harley y Smith, 1983; Siqueira y Franco, 1988; Fernández *et al.*, 2005; Rivera, *et al.*, 2003). Los inoculantes microbianos compuestos por esporas viables de HMA han sustituido, al menos de manera parcial, la aplicación de fertilizantes químicos y algunos plaguicidas obteniéndose con ello prácticas de producción agrícola sostenibles (O’Gara, 1996; Fernández, 2003). Algo que se debe considerar es que la especificidad que ocurre entre ambos simbioses (microorganismos-planta) está condicionada por las características físico-químicas y biológicas del lugar donde se desarrollan (Rai, 2001; Fernández, 2003).

La germinación de esporas de HMA se produce de manera eficiente en suelos estériles (Morton y Redecker, 2001; Lorelí, *et al.*, 2002). Sin embargo observaciones microscópicas con técnicas de fluorescencia han determinado hasta 250,000 bacterias endófitas en el interior de cada spora (Brundrett, *et al.*, 1994; Lorelí *et al.*, 2002). La germinación es considerada uno de los procesos más importantes durante el ciclo de vida del hongo micorrízico (Fernández, *et al.*, 2005), lo que deriva en el éxito de la simbiosis con la planta. La gran mayoría de las especies de HMA tienen la capacidad de lograr una germinación en ausencia de hospederos (Gianninazzi y Schhepp, 1994; Fernández, *et al.*, 2005). Una desinfección superficial exterior adecuada en los propágulos fúngicos (esporas), es de gran importancia para evitar contaminación de los medios de cultivo y lograr una excelente germinación *in vitro* (Breuninger y Requena, 2004; Fernández, *et al.*, 2005). El éxito de soluciones desinfectantes va a depender en gran parte de los objetivos de la desinfección. Se ha encontrado que soluciones como la de Cloramina T al 2% o algunas otras base antibióticos, como la Estreptomicina o la Gentamicina, son utilizadas para la desinfección de esporas (Breuninger y Requena, 2004).

Además de la colonización por los HMA en las plantas, existen otros microorganismos que también se encuentran colonizando la planta, denominadas bacterias endófitas que presentan una gran diversidad en el interior de tejidos vegetales (Schulz y Boyle, 2006; Pérez y Chamorro, 2013), cumpliendo funciones como promotoras del crecimiento vegetal, ayudando en el control biológico de fitopatógenos, mejorando la eficiencia en procesos de fitoremediación de compuestos tóxicos encontrados en la rizósfera y como fuente de más de 20,000 compuestos biológicamente activos que influyen en el rendimiento y la supervivencia de las plantas (Pérez y Chamorro, 2013). Producen además ciertos metabolitos primarios los que funcionan como antibióticos (Castillo, *et al.*, 2002) y variados metabolitos secundarios de interés industrial (Chanway, 1998). Colonizan tejido de apoplasto, espacios intercelulares y vasos de xilema principalmente; teniendo la capacidad de colonizar flores, frutos y semillas (Stone, *et al.*, 2000; Pérez y Chamorro, 2013). Se cree que las bacterias endófitas por su acción estimulan el crecimiento de la planta movilizando nutrientes desde el suelo a la planta, produciendo una gran cantidad de reguladores, además de proteger e inhibir la acción de algunos fitopatógenos (Macías-Ruvalcaba, *et al.*, 2010). También, estos microorganismos

mejoran características del suelo como la estructura y realizan la captura de iones de metales pesados en suelos contaminados (Ahemad, 2012; Pérez y Chamorro, 2013). Este tipo de organismos forman infecciones sin daño alguno dentro de algunos tejidos vegetales durante o parte de su ciclo de vida (Limsuwan *et al.*, 2009). Este tipo de bacterias se encuentran asociadas a diferentes tejidos de plantas leñosas de gimnospermas y angiospermas (Chanway, 1998). La colonización de bacterias endófitas inducen modificaciones en la pared celular como la deposición de calosa, pectina, celulosa y compuestos fenólicos formando una barrera estructural en el sitio de ataque de los fitopatógeno (Benhamou, 2000).

La coexistencia de HMA y Rpcv en los tejidos de sus hospederos (especies vegetales) ha resultado en un proceso co-evolutivo que permite una capacidad transformador del ecosistema (Borges, *et al.*, 2009). Sintetizan sustancias biológicamente activas muy similares a los metabolitos secundarios producidos por las planta hospedera (Wang y Dai, 2011), además de compuestos volátiles que actúan como una defensa contra el ataque de organismos dañinos (Macías-Ruvalcaba, *et al.*, 2010). En adición, muchas Rpcv han demostrado favorecer la germinación de HMA y/o la colonización de las plantas por los hongos (Frey-Klett *et al.*, 2007). La interacción de los HMA con otros microorganismos del suelo es un fenómeno que hoy día es muy estudiado y donde el conjunto de tales microorganismos rizoféricos juegan un papel importante en el desarrollo, la estabilidad y la eficiencia de las esporas de HMA (Lorelí *et al.*, 2002).

OBJETIVO

Determinar si las cepas de Rpcv (P-61, R-44, A-46, BSP1.1) favorecen la germinación de esporas de HMA (*Rh. intraradices*, Zac 19, Cedro, Jalapa I, Tabasco-Naranja, Mérida-Papaya) en condiciones *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germinación *in vitro* de esporas de HMA

Obtención del inóculo de HMA

La obtención de inóculos de los HMA de estudio, fue de lotes establecidos por el área de Microbiología de Suelos, Colegio de Posgraduados en el *Campus* Montecillo. Las muestras se obtuvieron cuando las plantas de maíz (*Zea mays*) establecidas alcanzaron tres meses de desarrollo bajo condiciones de invernadero utilizando como sustrato arena de río esterilizada. Para obtener la muestra se utilizó espátula metálica, regla graduada, bolsas de plástico de un kg, marcador de tinta indeleble, algodón y alcohol etílico desnaturalizado. Se extrajo una cantidad de muestra del contenedor correspondiente el que contenía el inóculo de interés. Para las muestras subsecuentes, la espátula metálica se limpió con algodón esterilizado conteniendo alcohol al 70%. El procedimiento fue el mismo en cada una de las muestras de inóculo obtenidas.

Se propagaron los seis inóculos identificados como *Rhizophagus intrarradices*, Tabasco-Naranja, Mérida-Papaya, Jalapa I, Zac-19 y Cedro. Como planta trampa se estableció zacate ballico anual (*Lolium multiflorum*) sembrado en arena de río (Figura 2.1), esterilizada en autoclave a 18 lb plg^{-2} durante tres horas por dos ocasiones con intervalo de un día. La propagación se prolongó durante 16 meses (Figura 2.2); realizando riegos semanales con agua corriente y riegos nutrimentales cada cuatro meses con una solución nutrimental base Long Ahston (Hewitt y Smith, 1974).

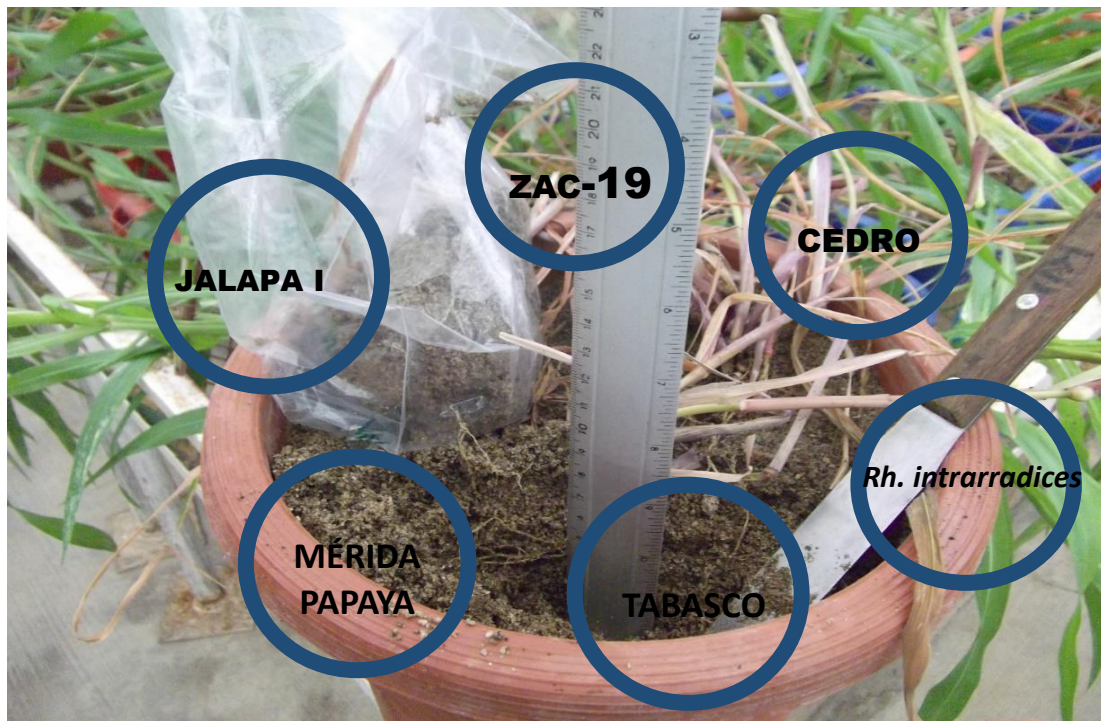


Figura 2. 1. Propagación de HMA en arena de río y ballico anual como planta trampa.

Se extrajeron las esporas de 100 gramos de muestra colectada en de cada uno de los inóculos por el método decantación en húmedo según la metodología de Gerdemann y Nicolson, 1963. Las esporas retenidas en los tamices de 43 y 73 μm de abertura fueron colectadas en frascos de vidrio y conservadas en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta su desinfestación. Posteriormente el contenido del frasco de vidrio el que contenía todo material fúngico obtenido del tamiz correspondiente se transfirió a una caja Petri (100 x 15 mm) de vidrio y utilizando un estereoscopio (Stereo Star AO), y habiendo separado las esporas del micelio (Figura 2.3). Se sostuvieron las esporas con pipeta Pasteur y se colocaron sobre papel filtro circular de 0.07 mm de espesor dentro de una caja Petri (Figura 2.4 y 2.5).



Figura 2. 2. Panorama de la propagación de HMA en macetas y charolas de plástico con arena de río y ballico anual como planta trampa.

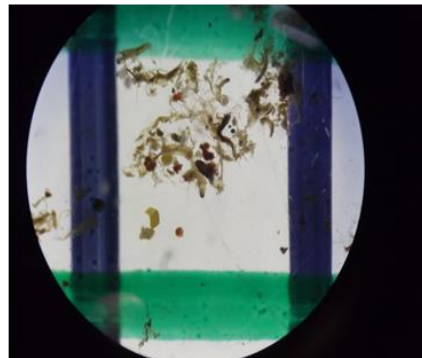
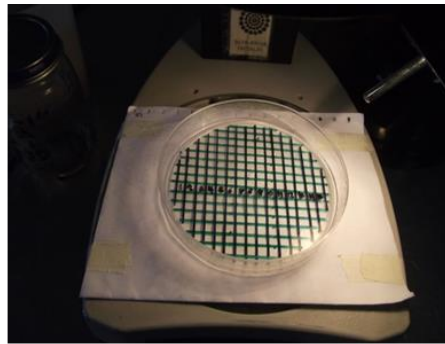
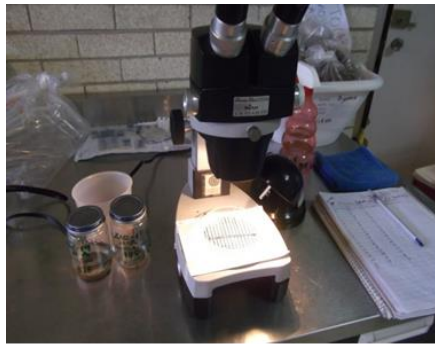


Figura 2. 3. Esporas y micelio micorrízico observados en estereoscopio (40X).

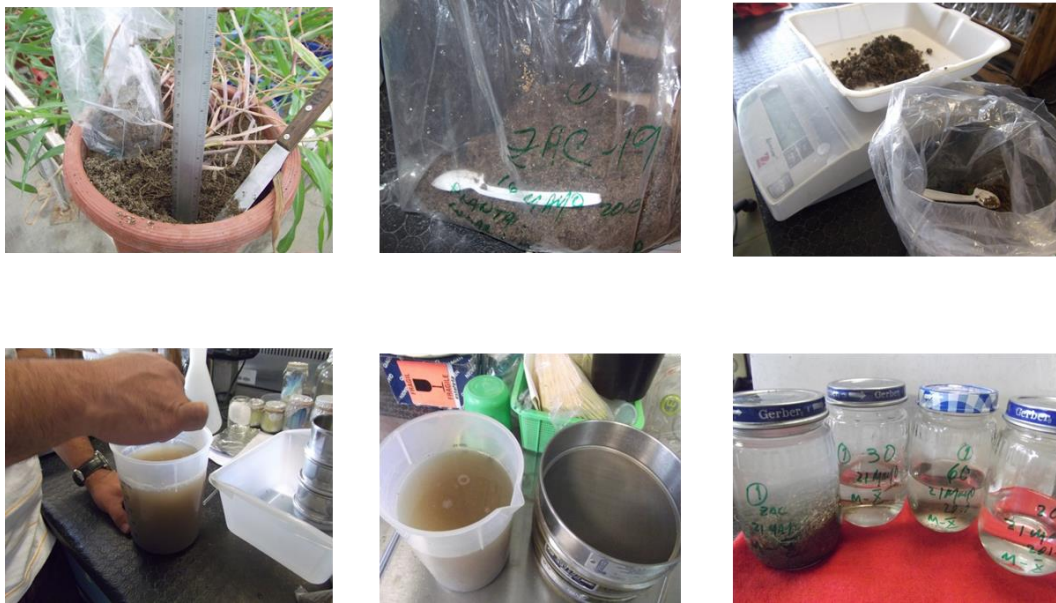


Figura 2. 4. Imágenes del proceso de extracción de esporas por el método de decantación y tamizado en húmedo.

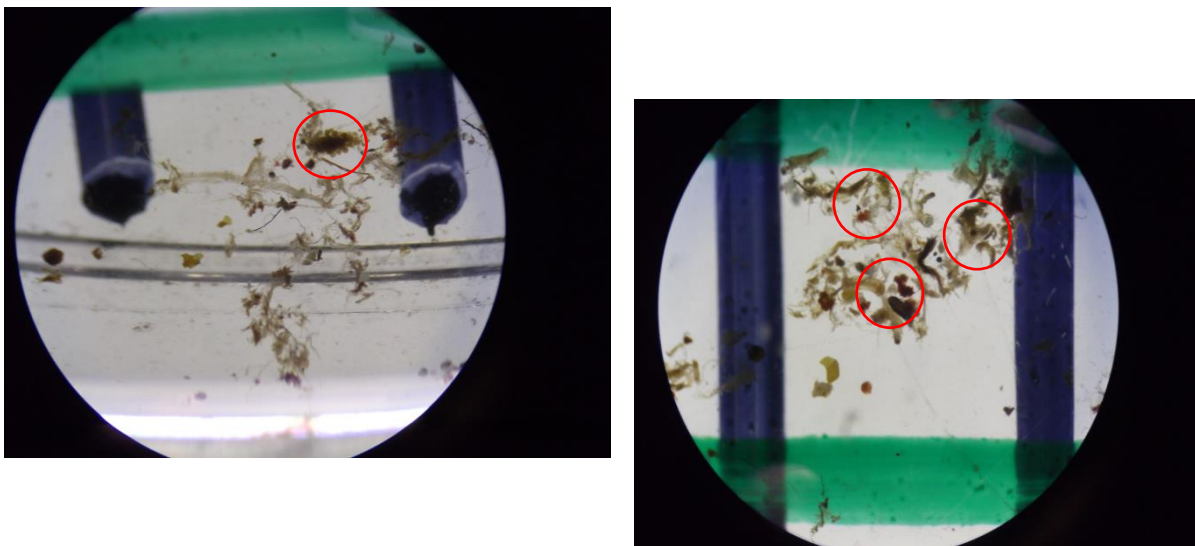


Figura 2. 5. Acercamiento de los grupos de esporas (en rojo) y el micelio fúngico (75X).

Desinfestación de esporas de HMA

Según lo reportado, una adecuada desinfección de esporas de HMA, con el método base Cloramina T al 2 %, más sulfato de estreptomicina 200 mg L⁻¹ y SDS 200 mg L⁻¹ durante un tiempo de 30 minutos, seguido de tres lavadas o enjuagues con agua destilada estéril

durante 30 minutos logrará una excelente desinfección de la pared externa de las esporas (Lorelí *et al.*, 2002).

De acuerdo a lo anterior, las esporas de HMA se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio® al 0.3% durante dos min, enseguida, dos enjuagues con agua destilada estéril. Después, en una solución de Cloramina T al 2%, durante seis min y dos enjuagues en agua destilada estéril. Finalmente, fueron sumergidas en una solución de antibióticos (5 μ L de penicilina y 5 μ L de gentamicina mL^{-1}) durante tres min y tres enjuagues en agua destilada estéril. Las esporas fueron refrigeradas hasta su siembra en caja Petri.

Siembra de esporas de HMA

Se realizó en laboratorio en condiciones *in vitro*, colocando las esporas desinfectadas en cajas de Petri con Agar-agua al 33%, dejando un cm de separación, depositando 10 esporas de cada inóculo de HMA por caja Petri.

Germinación de esporas de HMA

Se hicieron observaciones desde el día seis después de colocadas las esporas en agar-agua 33%. Se contabilizó el número de esporas germinadas y se calculó el porcentaje de germinación para cada tratamiento.

Obtención de cepas de Rpcv

Las cepas de Rpcv utilizadas pertenecen a la Colección del Área de Microbiología, Posgrado en Edafología, Colegio de Posgraduados. Las características de estas cepas se muestran en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2. 1. Características de las Rpcv utilizadas en este estudio.

Cepa bacteriana	Aislamiento	Características
<i>Pseudomonas tolasii</i> (P-61)	Suelo cultivado con papa (<i>Solanum tuberosum</i>) en el valle de Toluca, México.	Promueve crecimiento, solubiliza fosfatos, produce auxinas y controla <i>Rhizoctonia</i> .
<i>Pseudomonas tolasii</i> (A-46)	Suelo cultivado con papa (<i>Solanum tuberosum</i>) cv. Alpha en el valle de Toluca, México.	Fija N atmosférico, solubiliza fosfatos, promueve micorrización e incrementa germinación de esporas de HMA.
<i>Bacillus pumilus</i> (R-44)	Suelo cultivado con papa (<i>Solanum tuberosum</i>) cv Rosita en el valle de Toluca, México,	Promueve crecimiento, fija N atmosférico, solubiliza fosfatos, produce auxinas y controla <i>Rhizoctonia</i> .
<i>Phaenibacillus sp.</i> (BSP1.1)	Aislada de suelo agrícola en la región de Villa de Allende, estado de México.	Solubiliza fosfatos, fija N atmosférico, promueve micorrización e incrementa germinación de esporas.

Las cepas se cultivaron en caldo nutritivo con incubación a 26 °C durante 18 horas en agitación. La suspensión bacteriana se centrifugó durante 15 min a 7000 rpm. El pellet de bacterias se resuspendió en 20 mL de agua destilada estéril y se hicieron diluciones decimales hasta 10^{-5} , después se tomó con micropipeta 3 μ L de la dilución 10^{-5} y se depositó en cada una de las esporas de HMA. Las cajas de Petri con las esporas de HMA inoculada con Rpcv se incubaron a 28°C.

Tratamientos

Se estableció un diseño experimental 6 x 6. El primer factor corresponde a la inoculación con cada una de las cuatro Rpcv, además, un tratamiento inoculado con una mezcla de las cuatro Rpcv y otro tratamiento sin inoculación. El segundo factor corresponde a cada uno de los inoculantes de HMA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación *in vitro* de esporas de HMA

La germinación *in vitro* de las esporas de los seis inóculos de HMA aumentó con la inoculación de al menos una de las cuatro cepas de Rpcv a los 32 dds.

Se encontró diferencia entre las cepas de Rpcv para promover la germinación de las esporas de HMA, sobresalió la cepa P-61 (**Cuadro 2.2**), la cual mejoró de manera notoria la germinación de las esporas de *Rhizophagus intraradices*, Jalapa I y Cedro.

Cuadro 2. 2. Germinación *in vitro* de esporas de HMA inoculadas con Rpcv a los 32 días después de sembradas (dds).

	<i>Rhizophagus intraradices</i>	Tabasco Naranja	Mérida Papaya	Jalapa I	Zac-19	Cedro	Media
			(%)				
Testigo	10	10	10	20	0	20	11.67 b
<i>P. tolasii</i> (P-61)	60	10	30	60	40	60	43.33 a
<i>P. tolasii</i> (A-469)	10	20	20	50	10	30	23.33 ab
<i>Ph. sp.</i> (BSP1.1)	30	30	30	0	30	40	26.67 ab
<i>B. pumilus</i> (R-44)	20	50	40	20	30	50	35.00 ab
Todas las Rpcv	20	40	20	30	20	30	26.67 ab
Media	25.00	26.67	25.00	30.00	21.67	38.33	
	ab	ab	ab	ab	b	a	

En la germinación de las esporas de Cedro, también se destacó el efecto de la Rpcv R-44 con 50%. Mientras que el testigo sin inoculación bacteriana presentó 20% de germinación.

Se contabilizó el número de esporas no germinadas, el número de esporas germinadas y el número de esporas por germinar. Algunas imágenes representativas de las observaciones al microscopio se presentan en la Figura 2.6.

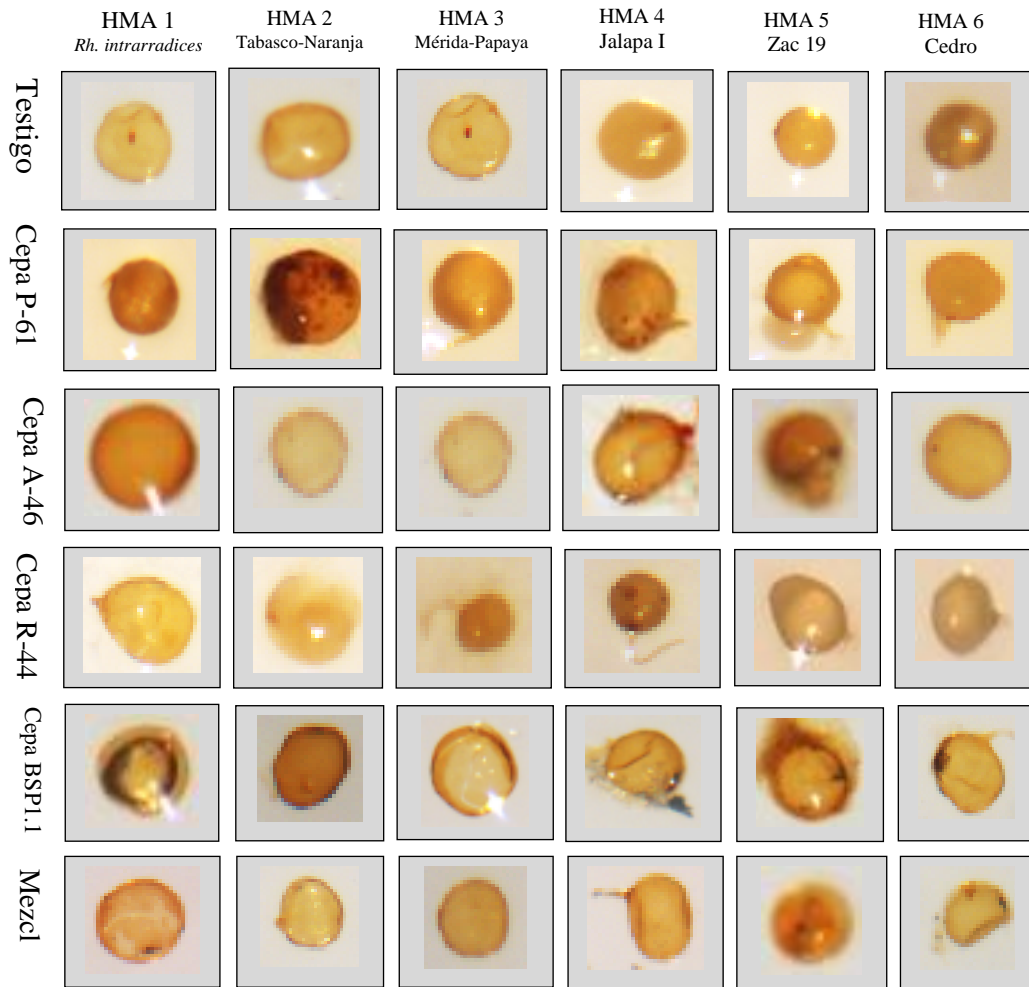


Figura 2. 6. Germinación de esporas de HMA asociadas a Rpcv a los 32 días después de sembradas *in vitro*.

LITERATURA CITADA

1. **Ahemad**, M. 2012. Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: a review. *IIOABJ* 3:39–46.
2. **Aliye**, N., C. Fininsa, Y. Hiskias. 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biological Control* 47:282-288.
3. **Benhamou**, N., S. Gagné, D.L. Quéré, L. Dehbi. 2000. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Biochem. Cell Biol* 90: 45-56.
4. **Borges**, W.D.S., K.B. Borges, K.B, P.S. Bonato, S. Said, M.T. 2009. Endophytic fungi: Natural products, enzymes and biotransformation reactions. *Current Organic Chemistry* 13(12):1137–1163.
5. **Breuninger**, M. y N. Requena. 2004. Recognition events in AM symbiosis: Analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. *Fungal Genetics and Biology*. 41 (8): 794-804.
6. **Brundrett**, M. C., Melville, L. y Peterson, R. L. 1994. *Practical Methods in Mycorrhizal Research*. Mycologue Publications, Waterloo. 161 pp.
7. **Castillo**, U.F., G.A. Strobel, E.J. Ford, W.M. Hess, H. Porter, J.B. Jensen. 2002. Munumbicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* (NRRL30562) endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology* 148: 2675–2685.
8. **Chanway**, C.P. 1998. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia* 50, 149-170.
9. **Fernández**, M. F. 2003. Factibilidad biológica de la micorrización “*in vitro*” de papa (*Solanum tuberosum*). Informe Científico Final. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Departamento de Agroquímica y Nutrición de Plantas. La Habana, Cuba. Pp 1-94.
10. **Fernández**, K., F. Fernández, R. Rivera, V. Olalde. 2005. Metodología para la germinación de esporas de *Glomus mosseae*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba. *Cultivos Tropicales*. 26 (2): 11-16.
11. **Frey-Klett**, P., J. Garbaye, M. Tarkka. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol*. 174 (4): 22-36.

12. **Gerdemann**, J.W., T.H. Nicolson. 1963. Spore of mycorrhizae endogen species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235-244.
13. **Gianinazzi** S, y Schhepp H. 1994. Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural ecosystems. Burkhouse Verlag, Basel, Switzerland. 226 pp.
14. **Harley**, J.L., S.E. Smith. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, Toronto.
15. **Herman**, D. J., Firestone, M. K., Nuccio, E. y Hodge, A. 2012. Interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a soil microbial community mediating litter decomposition. *FEMS Microbiology Ecology*, 80: 236–247.
16. **Hewitt**, E.J. y T.A. Smith. 1974. *Plant mineral nutrition*. English University Press. London, Engl. p. 298.
17. **Jackson** RM. y Mason PA. 1984. *Mycorrhiza*. Edward Arnold, Ltd, London. 60 pp. ISBN 0-7131-2876-3.
18. **Limsuwan**, S., E.N. Trip, T. Kouwenc, S. Piersmac, A. Hiranrat, W. Mahabusarakam. 2009. A new candidate as natural antibacterial drug from *Rhodomyrtustomentosa*. *Phytomedicine* 16: 645-51.
19. **Lorelí**, M., E. Ortega, R. Rodés, F. Fernández. 2002. Métodos efectivo para la desinfección total de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA): Aislamiento y caracterización de Bacterias endospóricas en *Glomus clarum*. *Cultivos Tropicales*. 23 (1): 21-24.
20. **Macías-Rubalcava**, M., B. Hernández-Bautista, F. Oropeza, G. Duarte, M. González, A. Glenn. 2010. Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodoryucatanensis*; a tropical endophytic fungus from *Burserasimaruba*. *Journal of Chemical Ecology*, 36 (10): 1122–1131.
21. **Mirabal-Alonso** L, Kleiner D. y Ortega E. 2008. Spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* host yeasts that solubilize phosphate and accumulate polyphosphates. *Mycorrhiza*. 18: 197-204.
22. **Morton**, J.B., D. Redecker. 2001. Two new families of Glomales, Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycología*. 93 (1): 181-185
23. **Myga-Nowak**, M., M. Marczak, P. Krupa. 2010. Mycorrhiza helper bacteria. *SYLWAN*. 154 (12): 837-845.

24. **O'Gara**, F. 1996. The biotechnology and ecology of rhizosphere microorganisms. In: Novel biotechnological approaches to plant production: from sterile root to mycorrhizosphere. Joint COST meeting 8.21, Pisa, Italy; p. 11.
25. **Pérez**, C. A. y A. L. Chamorro. 2013. Bacterias endófitas: Un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Revista Colombiana Ciencia Animal*. Vol. 5. No. 2: 439-462.
26. **Rai**, M.K. 2001. Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In vitro*. Cell. Dev. Biol. Plant. 37: 158-167.
27. **Read** DJ, Lewis DH, Fitter AH y Alexander IJ. 1992. Mycorrhizas in ecosystems. CAB International, Wallingford, England.
28. **Rivera** R., F. Fernández, A. Hernández, J. R. Martín and Kalyanne Fernández. 2003. The effective management of arbuscular mycorrhizal symbiosis, a way to sustainable agriculture. Case study: The Caribbean. The Havana: INCA, 166 p. ISBN: 959 - 7023 - 24 - 5.
29. **Schreiner R.P. y G.J. Bethlenfalvay**. 1997. Plant and soil response to single and mixed species of arbuscular mycorrhizal fungi under fungicide stress. *Applied Soil Ecology* 7 (1997) 93-102.
30. **Schulz** B. y Boyle C. 2006. What are endophytes? In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, editors. *Microbial Root Endophytes*. Berlin, Germany: Springer-Verlag; pp. 1–13.
31. **Siqueira**, J.O. y Franco, A.A. 1988. *Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas*. Lavras: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 235p.
32. **Stone**, J.K., C.W. Bacon, J.R. White. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined [J]. In: Bacon CW, White Jr JF, editors. *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker; p.3-29.
33. **Wang**, Y. y C.C. Dai. 2011. Endophytes: A potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology*, 61(2): 207–215.

Capítulo III

«Evaluación de 23 genotipos de chile (*Capsicum annuum* L.), con hongos micorrízicos arbusculares asociados a bacterias promotoras del crecimiento vegetal y control de *Phytophthora capsici* en invernadero»

RESUMEN

El éxito de la producción agrícola depende del clima, suelo, agua y microorganismos como los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Rpcv). Estos microorganismos pueden ser la base de biofertilizantes para aumentar los rendimientos de los cultivos. Algunos estudios indican que los efectos de los HMA se acentúan con la inclusión de Rpcv en inoculantes con HMA. De acuerdo a lo anterior, este estudio consistió en determinar la respuesta de los HMA asociados a la Rpcv en 23 genotipos de chile del género *Capsicum* (Pasilla, Ancho, Guajillo, Puya, Serrano y Jalapeño) en invernadero. La altura de planta, el engrosamiento del tallo, el peso seco de planta y el volumen de raíz, fueron mayores con la inoculación de HMA+Rpcv en comparación con la inoculación de solo HMA y en el testigo sin inoculación. El porcentaje de colonización micorrízica también fue mayor en el tratamiento HMA+Rpcv con respecto al tratamiento HMA. En la resistencia de plantas al ataque de *P. capsici*, se encontró que a los 87 días después de trasplante el tratamiento de inoculación HMA+Rpcv, presentó 16% de plantas muertas, HMA 37% y el testigo 47%.

INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum sp.*, contiene plantas nativas de América, de gran importancia por la diversidad de usos (Cardona *et al.*, 2008). Comprende 25 especies y cinco de ellas son las más cultivadas (Hunziker, 1979). China ocupa el primer lugar en producción mundial de chiles frescos con 54%, seguido de México con 6.5% y después Indonesia, Turquía, España y Estados Unidos (FAOSTAT, 2013). En México, el chile es un cultivo importante, la producción anual es de 2.3 millones de toneladas, en una superficie de 136 mil hectáreas, representando el 2.78% de la superficie total nacional cultivada (SIAP, 2015). Para aumentar los rendimientos en este cultivo se sugiere mejorar aspectos como su adaptación a diversas regiones climáticas, desarrollo de genotipos con mayor producción, precoces y tolerantes a las enfermedades de raíz y mejor calidad de fruto (Perry *et al.*, 2007).

Tecnologías recientes encaminadas a mejorar la producción de chile en México involucran a los microorganismos de la rizósfera, ya que algunos mejoran el crecimiento de las plantas. Tal es el caso de los HMA que contribuyen en la adaptación de la planta a condiciones de ambiente (Dakessian *et al.*, 1986; Franco-Ramírez *et al.*, 2007). En México, existen alrededor de 44 especies de HMA, equivalente a 22% del total mundial. (Chamizo *et al.*, 1998; Varela y Trejo, 2001; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2004). Entre los beneficios de los HMA está la agregación del suelo vía la de glomalina a través de micelio fúngico (Harley y Smith, 1983; Castillo, *et al.*, 2010), reducción del estrés hídrico en plantas (Jackson y Mason, 1984), control de fitopatógenos de la raíz y su participación en el equilibrio ecológico (Rivera, *et al.*, 2003). Los controladores biológicos para algunas enfermedades de las plantas de cultivo, se han reportado desde 1927 (Desai *et al.*, 2002; Bautista-Calles, *et al.*, 2010). No existen resultados contundentes para el control biológico de *P. capsici*, en condiciones de campo (García-Espejel, 2015; Bautista-Calles, *et al.*, 2010). Los HMA favorecen el desarrollo de cultivos hortícolas como el chile, en especial, cuando están asociados con Rpcv (Castillo, *et al.*, 2002). El uso conjunto de HMA y Rpcv es una alternativa para favorecer el crecimiento del chile y controlar sus fitopatógenos radicales. Los objetivos del presente trabajo fueron determinar si las Rpcv favorecen el porcentaje de colonización micorrízica arbuscular y esta

colonización se ve reflejada en el crecimiento de las plantas de Chile y su resistencia al ataque por el fitopatógeno radical *P. capsici*.

OBJETIVOS

1.- Determinar si las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal favorecen el porcentaje de colonización micorrízica arbuscular en plantas pertenecientes a 23 genotipos de Chile.

2.- Evaluar el crecimiento de plantas pertenecientes a 23 genotipos de Chile y su resistencia al ataque por el fitopatógeno radical *P. capsici*, a causa de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron 23 genotipos de chile procedentes de diversas localidades agrícolas en el país. Se estableció un experimento en condiciones de invernadero en el Colegio de Posgraduados, *Campus* Montecillo, durante el período otoño-invierno del año 2013 y primavera del año 2014. Los diversos chiles se agruparon en tres del tipo Pasilla, cuatro del tipo Ancho, cuatro del tipo Guajillo, cuatro del tipo Puya, tres del tipo Serrano y cinco del tipo Jalapeño.

Germinación de semillas

Debido a que factores como el año de cosecha, las condiciones de almacenamiento, la temperatura y la humedad relativa influyen en la germinación de semillas; además de que es necesario conocer el porcentaje de germinación esperado en las semillas para calcular las necesidades de plántulas en el establecimiento de los experimentos; se determinó el porcentaje de germinación en cámara (Modelo 312738-3700, Seed Buro Equipment) calibrada a 25°C de temperatura y un contenido de humedad relativa del 100% durante 14 días. La prueba se realizó con 100 semillas de cada uno de los 23 genotipos de chile, agrupadas en dos bloques de 50 semillas cada uno. Estas fueron colocadas sobre papel absorbente, rotulado y formando cinco hileras de diez semillas. Se humedeció el papel con agua destilada hasta saturación, utilizando un atomizador. Después se dobló el extremo izquierdo del papel colocándolo hacia adentro, seguido de un enrollamiento formando un rollo. Los rollos se colocaron en una bolsa de plástico para crear una atmósfera modificada. Las bolsas se colocaron de forma vertical en el interior de la cámara de germinación. Se realizaron observaciones periódicas (cada tres días) para determinar el contenido de humedad en los rollos formados, para mantener la humedad necesaria para la germinación de semillas. Las semillas se germinaron durante 14 días en la cámara. En seguida, se sacaron los rollos y se contabilizó el número de semillas germinadas. Los porcentajes obtenidos se muestran en el **Cuadro 3.1**.

Cuadro 3. 1. Porcentaje de germinación de 23 genotipos de chile.

Tipo de chile	Genotipos	% de germinación
Pasilla	1.UAA/Ags.	67
	2. Perales 1/Zac.	65
	3. Perales 2/Zac.	57
Ancho	4. UAA 2008/Ags.	73
	5. AP Neek/SLP.	55
	6. 3v/Zac.	52
	7. SR-2009/Dgo.	71
Guajillo	8. Don Luis/SLP	40
	9. Perales/Zac.	57
	10. Mirasol 3v/Zac.	73
	11. Don Ramón/SLP	64
Puya	12. 91/SLP	48
	13. Saladillo 1/Zac.	65
	14. Saladillo 2/Zac.	57
	15. Caudillo/Dgo.	56
Serrano	16. Coloso/Tamps.	72
	17. HS44/Tamps.	75
	18. Centauro/Tamps.	78
Jalapeño	19. Don Benito1/Tamps.	78
	20. Don Benito2/Tamps.	82
	21. Don Pancho/Tamps.	77
	22. Apache/Chih.	71
	23. Isabel/Chih.	82

Preparación de semilleros

Se utilizaron semilleros de unicel de 200 cavidades, a los cuales se les agregó un sustrato de turba y Agrolita en una proporción 50:50 (V/V). La esterilización del sustrato se realizó en olla de presión a 18.5 lb pulg⁻²(psi), con una temperatura de 120°C y un tiempo de duración de seis h, distribuidas en dos fases de tres h cada una con un tiempo de reposo de 24 h entre ambas.

Siembra

La siembra se realizó de forma manual, depositando 20 semillas a una profundidad de 0.5 cm en diez cavidades por cada uno de los genotipos de chile. Con una capa ligera de sustrato humedecido se cubrieron las semillas. Después, el semillero se cubrió con polietileno negro para incrementar la temperatura y conservar la humedad, a fin de asegurar con ello la germinación y la cantidad de plántulas requeridas.

Inoculación con HMA y Rpcv

El inóculo de HMA fue aplicado al momento de la siembra depositando 10 g en cada cavidad. Para las Rpcv se inoculó un mL del medio conteniendo bacterias en crecimiento (10^8), utilizando micro pipeta graduada y depositándolo sobre la superficie de la cavidad.

Tratamientos de estudio

Los tratamientos de estudio fueron cuatro:

- 1.- Testigo.
- 2.- Consorcio de seis HMA.
- 3.- Consorcio de seis HMA más un consorcio de cuatro Rpcv.
- 4.- Consorcio de cuatro cepas de Rpcv(*La mayoría de las plántulas murieron en su etapa en semillero, por lo que no se consideraron en las variables posteriores al trasplante*).
- 5.- Fertilización química a base una solución nutrimental Long Ahston modificada(*Las plántulas de este tratamiento murieron después del trasplante atacadas por los hongos fitopatógenos inoculados, por lo que no se consideraron en las variables posteriores al trasplante*).

Los tratamientos se establecieron para los 23 genotipos de chile con diez repeticiones.

Microorganismos HMA y Rpcv Consorcio de HMA

Los hongos micorrízicos arbusculares fueron obtenidos de inóculos establecidos por el área de Microbiología de Suelos, Programa de Edafología, en el Colegio de Posgraduados Campus Montecillo. Se utilizó una mezcla de los inóculos identificados como: Zac-19, Cedro, *Rhizoglyphus intrarradices*, Tabasco-Naranja, Mérida-Papaya y Jalapa I, producidos de

manera similar que en el Capítulo II. La obtención de inóculo de los HMA se realizó cuando las plantas de maíz (*Zea mays*) alcanzaron tres meses de desarrollo en condiciones de invernadero. Para la cuantificación de esporas en la muestra se utilizó el método de tamizado en húmedo y decantación de Gerdemann y Nicolson (1963). Se pesaron 100 g de la muestra de inóculo de HMA y se depositó en un recipiente plástico (capacidad 2 L) donde se agregó agua corriente, después se agitó manualmente utilizando una varilla de vidrio, durante dos min. Después se dejó reposar la muestra durante 30 seg. Se realizó enseguida un filtrado del sobrenadante a través de los tamices malla 30 (0.540 mm de cuadrícula), malla 100 (0.149 mm de cuadrícula) y malla 325 (0.0432 mm de cuadrícula). Nuevamente se realizó una segunda agitación manual durante dos min, se dejó reposar por 10 seg, realizando enseguida un filtrado total a través de los tamices antes descritos. Durante el proceso de filtrado, el residuo conteniendo las esporas de cada malla se va acumulando hacia la parte inferior del tamiz y utilizando el chorro del agua corriente se eliminan los materiales minerales. Después se transfiere el material restante en un frasco de vidrio. Este residuo contiene las esporas de HMA extraídas. Las esporas fueron contabilizadas poniendo la muestra bajo microscopio estereoscópico (Leica Optical) con un aumento de 20X. Para facilitar el conteo, el residuo con esporas se distribuye en caja de Petri de vidrio con guía cuadrículada.

Una vez contabilizadas las esporas, se realizaron los cálculos correspondientes para que la mezcla presentará el mismo número de esporas de cada inóculo. El número de esporas por 100 g de suelo húmedo se aprecia en el **Cuadro 3.2**.

Cuadro 3. 2. Número de esporas por 100 g de suelo húmedo correspondiente a las muestras de los inóculos de HMA en estudio.

Inóculo	No de Malla (100)	No de Malla (325)	Total de esporas
HMA	0.149 mm 0.0059 pulg	0.043 mm 0.0017 pulg	
Zac-19	364	1206	1570
Cedro	44	185	229
<i>Rh. intraradices</i>	160	1431	1591
Tabasco-Naranja	43	159	202
Mérida-Papaya	74	172	246
Jalapa I	535	1531	2066

Consortio de Rpcv

Las cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Rpcv) fueron obtenidas de la Colección del área de Microbiología de Suelos, Programa de Edafología, en el Colegio de Posgraduados *Campus* Montecillo, identificadas como *Paenibacillus sp.* (BSP1.1), *Bacillus pumilus* (R-44), *Pseudomonas tolasii* (A-46) y *Pseudomonas tolasii* (P-61) y sus características fueron descritas en el Capítulo II.

Se reactivaron en agar nutritivo sólido y transferencia a medio líquido caldo nutritivo, medio líquido. Las cepas se incubaron durante 36 h a una temperatura de 27 °C y 150 rpm en incubadora con agitación orbital.

Solución nutritiva

La preparación de la solución nutritiva se basó en la Solución de Long Ashton modificada (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2004) y fue aplicada cada 3 días al tratamiento correspondiente en la etapa de semillero hasta que la plántula presentó un par de hojas verdaderas. Después se siguió aplicando semanalmente desde el trasplante hasta la cosecha.

Trasplante

A los 11 dds inició la germinación de las semillas. El trasplante se realizó a los 57 dds. El sustrato de trasplante fue suelo agrícola (tamizado en malla de 0.7 mm) y Agrolita (40:60,

V/V). Con este sustrato se llenaron macetas de plástico con 0.7 kg de sustrato cada una. Los riegos se hicieron cada cinco días.

Inoculación con *Phytophthora capsici*

A los 11 ddt, se inocularon tres g de suelo conteniendo 3×10^3 zoosporas de *P. capsici*.

VARIABLES EVALUADAS EN SEMILLERO

Las variables a evaluar en la etapa de semillero fueron:

- 1.-Número de semillas germinadas (Nsg).** Conteo a los 57 dds,
- 2.-Altura de plántula (Ap).** Conteo a los 20, 28, 57 y 76 dds,
- 3.-Número de hojas (Nh).** Conteo a los 76 dds.

VARIABLES EVALUADAS DESPUÉS DEL TRASPLANTE

Las variables a evaluar en maceta después de trasplante fueron:

4.-Altura de planta (Ap). Medida desde el nudo vital hasta la hoja más alta, con regla graduada. A los 31, 44, 59, 74 y 84 días después del trasplante (ddt).

5.-Diámetro de tallo (Dt). Medido con vernier digital a 1 cm del nudo vital. A los 31, 44, 59, 74 y 84 ddt.

6.- Peso seco de la parte aérea (Psp). A los 84 ddt. El material vegetal se pesó en fresco y después se secó en horno a 70 °C durante 72 h.

7.- Volumen radical (Vr). Expresado en cm^3 , medido por el método de desplazamiento de agua en probeta graduada. A los 84 ddt.

8.- Plantas muertas por ataque de hongos fitopatógenos. Realizando una revisión diaria de las plantas marchitas y llevando un registro de éstas,

9.- Colonización micorrízica. Determinada en la raíz a los 84 ddt. El método se describe a continuación.

Con estos datos se hizo un análisis de componentes principales y se calculó el **índice de vigor (Iv)** por tratamiento para cada uno de los genotipos de Chile.

Colonización micorrízica

Las raíces, después de cortarlas, pesarlas y determinar volumen radical, se almacenaron en refrigeradora una temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Las raíces finas fueron separadas (Figura 3.1) y colocadas en frascos de vidrio conteniendo agua corriente hasta el proceso de tinción.



Figura 3. 1. Separación de raíces finas para realizar el proceso de tinción del micelio fúngico intraradical.

Preparación de reactivos para el clareo y tinción de raíces

Solución de Hidróxido de potasio (KOH) al 10%

Se pesaron 100 g de hidróxido de potasio (grado reactivo) y se colocaron en un vaso de precipitado (capacidad 2L) y se aforó con agua destilada, se pasó a un agitador de vaivén durante cinco min hasta observar una solución homogénea, después se transfirió a un recipiente plástico para su utilización.

Solución de ácido clorhídrico (HCl) al 10%

Se midió en una probeta graduada, 100 mL de ácido clorhídrico (grado reactivo) y bajo la campana de extracción se vertieron 50 mL sobre un vaso de precipitado (capacidad 1,500 mL), agregando después 500 mL de agua destilada. Después se agregaron los 50 mL restantes de HCl, así como el resto del agua destilada, luego la solución se transfirió a un frasco de vidrio color ámbar realizando una agitación manual para homogenización.

Solución de Lacto-glicerol

Para la preparación del reactivo Lacto-glicerol, se midieron 500 mL de ácido láctico en una probeta graduada, después 500 mL de glicerina más 500 mL de agua destilada. Los tres componentes fueron colocados en un vaso de precipitado (capacidad 2,000 mL) y se puso un agitador magnético para la integración de los componentes obteniendo una solución homogénea.

Solución de Azul de tripano

Se midieron 1,000 mL de Lacto-glicerol y se agregaron 0.5 g del reactivo azul de tripano y transferidos a un frasco de vidrio donde se realizó una agitación manual hasta integración de los componentes obteniendo una solución homogénea.

Agua oxigenada

Ésta solución se utilizó grado comercial farmacéutico.

Clareo y tinción de raíces

Las raíces separadas encada una de las muestras de plantas fueron colocadas en cápsulas de plástico, envolviéndolas en tela fina, a manera de malla-filtro, para evitar la salida de la cápsula y pérdida de raíces más finas. Las cápsulas de plástico conteniendo las raíces fueron puestas en una solución de hidróxido de potasio al 10% durante 12 h, transcurrido dicho tiempo se realizaron de dos a tres lavados con agua corriente o agua de la llave. Después las cápsulas se pasaron a una solución de agua oxigenada (comercial) durante 10 min realizando de dos a tres lavados en agua corriente. Luego se pusieron en una solución de ácido clorhídrico al 10% durante cinco min y realizando de dos a tres lavados con agua corriente.

Las cápsulas de plástico conteniendo las raíces fueron colocadas dentro de vasos de precipitado con una solución de azul de tripano, después colocados en una olla de presión para llevarlos a 10 lb pulg⁻²(psi) durante 10 min. Transcurrido el tiempo en mención y cuando la presión de la olla bajó, los vasos de precipitado conteniendo las cápsulas con las raíces fueron retirados de la olla y puestos a enfriamiento a temperatura ambiente. La solución de azul de tripano de los vasos de precipitado se colectó en un frasco de vidrio para su reutilización en

otros procedimientos de tinción. Se realizaron enseguida de dos o tres lavados en agua corriente y las cápsulas de plástico con las raíces fueron puestas en refrigeración a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ de temperatura hasta su observación al microscopio (Figura 3.2).



Figura 3. 2. Imágenes de las cápsulas de plástico utilizadas y el proceso de clareo y tinción de raíces para determinar colonización micorrízica.

Montaje y observación microscópica

Las raíces contenidas en cada una de las cápsulas de plástico fueron puestas en una caja Petri, donde se agregó agua corriente. Las raíces se separaron y se cortaron en secciones de un cm de longitud y colocadas en portaobjetos de vidrio de forma paralela. Se aplicó una gota de solución de lacto-glicerol que fue distribuida sobre la superficie del portaobjetos de vidrio entre las secciones de raíz seleccionadas, sobreponiendo después un cubreobjetos para su observación al microscopio (Figura 3.3).

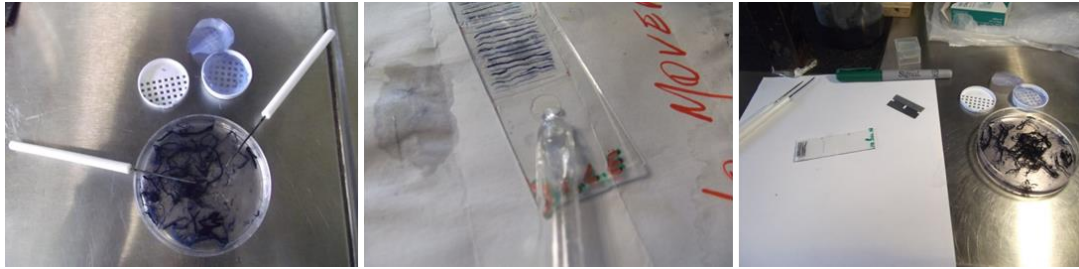


Figura 3. 3. Imágenes del proceso de montaje de raíces teñidas para observación microscópica.

Las raíces fueron observadas en un microscopio óptico (Marca AO Spencer) con el objetivo 40x. Se realizaron tres barridos en la observación al porta objeto colocado en el microscopio de izquierda a derecha (parte superior), de derecha a izquierda (parte media) y de izquierda a derecha (parte inferior). Este procedimiento se realizó cuando se tenían 25 segmentos de raíz. En los casos que solo se colocaron 15 segmentos de raíz, se realizaron cinco barridos. En las observaciones realizadas se contabilizaron hifas (H), vesículas (V), esporas (E) y arbuscúlos (A). Ver Figura 3.4.

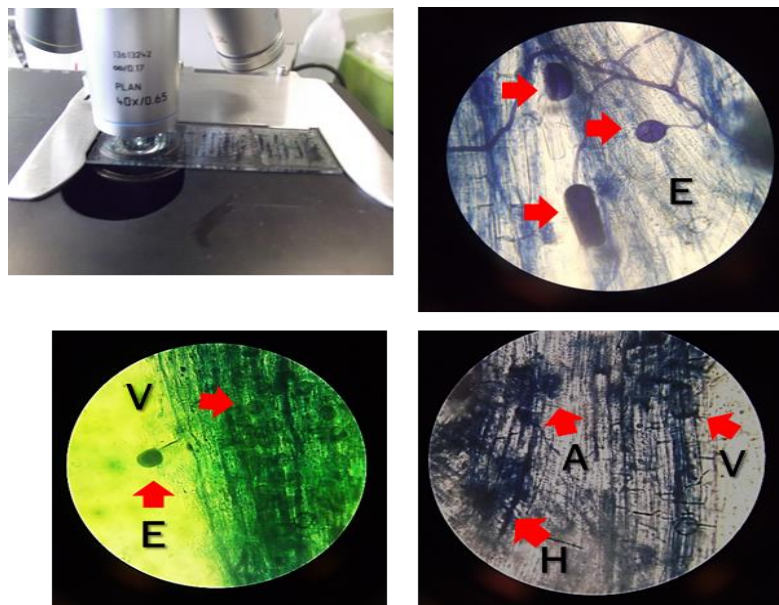


Figura 3. 4. Micrografías de la colonización micorrízica y de las estructuras formadas por los HMA en los tejidos radicales de plantas de Chile. H= hifas, E= esporas, V= vesículas, A= arbuscúlos.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos estos fueron organizados, después analizados con el paquete estadístico SAS, versión 9.0 y Infostat-Componentes Principales. Se compararon medias entre tratamientos dentro de cada genotipo de chile y medias para cada tipo de chile.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables evaluadas en semillero

Número de semillas germinadas

De los 23 genotipos de chile sobresalieron los cultivares 18, 20 y 23, mostrando éstos, los porcentajes más altos en germinación, con 78, 82 y 82%, respectivamente. En general, los genotipos mostraron porcentajes de germinación por abajo de 85%, debido en gran parte al tiempo que tiene la semilla de haberse colectado (siete años en promedio).

Altura de plántula

A los 20 dds, el tratamiento HMA+Rpcv, presentó la mayor cantidad de plántulas de chile mayores de un cm de altura con un total de 57 plantas, seguido del tratamiento HMA con 43 plantas. A los 28 dds, la mayor cantidad de plántulas de chile mayores a un cm de altura, lo presentó el tratamiento HMA+Rpcv con 91 plantas seguido del tratamiento con fertilización química con 61 plantas. Por último el tratamiento inoculado con HMA y el testigo. La evaluación de plántulas de chile en semillero realizada a los 57 dds, señala que el tratamiento HMA+Rpcv, obtuvo un valor de 2.36 cm, y fue superior al resto de los tratamientos (Cuadro 3.3). A los 76 dds, el tratamiento HMA + Rpcv, obtuvo un valor medio en altura de planta igual a 2.35 cm, seguido del tratamiento fertilización química, con un valor medio de 2.01 cm y al final HMA y el testigo. Cuadro 3.4.

Cuadro 3. 3. Altura de planta en semillero para cada uno de los tratamientos y genotipos de chile a los 57 dds.

		Testigo	HMA	HMA + Rpev	Fertilización química
Pasilla	1. UAA/Ags.	1.20	2.52	1.94	1.55
	2. Perales 1/Zac.	1.03	1.94	2.34	1.53
	3. Perales 2/Zac.	1.54	2.38	1.52	1.00
Ancho	4. UAA2008/Ags.	1.46	1.34	2.36	3.34
	5. AP Neek/SLP.	1.70	2.14	2.32	2.45
	6. 3 v/Zac.	1.25	1.20	3.26	3.13
	7. SR-2009/Dgo.	1.14	1.70	2.50	2.00
Guajillo	8. Don Luis/Zac.	1.30	2.32	3.26	1.36
	9. Perales/Zac.	2.10	1.92	2.20	2.72
	10. Mirasol 3v/Zac.	2.13	2.14	2.46	2.74
	11. Don Ramón/SLP.	1.83	1.14	2.58	1.57
Puya	12. 91/SLP.	2.06	2.34	2.40	2.00
	13. Saladillo 1/Zac.	1.76	1.90	3.14	1.56
	14. Saladillo 2/Zac.	1.43	2.28	3.26	2.32
	15. Caudillo/Dgo.	2.24	2.00	3.44	1.32
Serrano	16. Coloso/Tamps.	0.62	1.14	2.14	1.10
	17. HS-44/Tamps.	0.58	1.28	1.36	1.68
	18. Centauro/Tamps.	0.68	1.48	1.78	1.80
Jalapeño	19. Don Benito 1/Tamps.	1.68	2.16	2.48	2.60
	20. Don Benito 2/Tamps.	1.40	2.16	2.26	1.76
	21. Don Pancho/Tamps.	1.34	2.08	2.24	2.78
	22. Apache/Chih.	0.48	2.04	1.80	2.18
	23. Isabel/Chih.	1.20	1.46	1.14	1.80
	Medias	1.40	1.87	2.36	2.01

Cuadro 3. 4. Altura de planta en semillero para cada uno de los tratamientos y genotipos de chile a los 74 dds en condiciones de invernadero.

		Testigo	HMA	HMA + R _{pcv}	Fertilización química
Pasilla	1. UAA/Ags.	1.20	2.30	1.94	1.65
	2. Perales 1/Zac.	1.40	1.54	3.14	1.53
	3. Perales 2/Zac.	1.54	1.58	1.62	1.00
Ancho	4. UAA2008/Ags.	1.46	1.52	2.36	3.34
	5. AP Neek/SLP.	1.70	1.74	2.32	2.45
	6. 3 v/Zac.	1.25	1.20	2.86	3.13
	7. SR-2009/Dgo.	1.14	1.58	2.82	1.90
Guajillo	8. Don Luis/Zac.	1.30	2.32	3.06	1.36
	9. Perales/Zac.	1.75	2.00	2.22	2.84
	10. Mirasol 3v/Zac.	2.10	2.14	2.46	2.74
	11. Don Ramón/SLP.	2.27	1.20	2.58	1.77
Puya	12. 91/SLP.	1.18	2.28	2.12	1.90
	13. Saladillo 1/Zac.	1.80	1.58	3.06	1.60
	14. Saladillo 2/Zac.	2.03	2.24	3.28	2.32
	15. Caudillo/Dgo.	2.24	1.86	3.44	1.32
Serrano	16. Coloso/Tamps.	0.60	0.96	2.10	1.10
	17. HS-44/Tamps.	0.68	1.32	1.28	1.72
	18. Centauro/Tamps.	0.72	1.40	1.68	1.70
Jalapeño	19. Don Benito 1/Tamps.	1.54	1.76	2.42	2.60
	20. Don Benito 2/Tamps.	1.30	2.20	1.94	1.76
	21. Don Pancho/Tamps.	1.00	1.46	1.98	2.68
	22. Apache/Chih.	0.86	1.52	1.76	2.18
	23. Isabel/Chih.	0.92	1.90	1.54	1.82
	Medias	1.39	1.72	2.35	2.02

Número de hojas

De manera similar a lo sucedido con altura de la planta en esta fecha de muestreo, a los 76 dds el tratamiento más destacado fue HMA+Rpcv seguido de HMA y por último el Testigo sin inoculación (Cuadro 3.5). El tratamiento fertilización química con un mayor número de hojas como se esperaba.

Cuadro 3.5. Número de hojas en las plántulas de cada uno de los tratamientos y genotipos de chile a los 76 dds.

		Testigo	HMA	HMA + Rpcv	Fertilización química
Pasilla	1. UAA/Ags.	10	5	11	15
	2. Perales 1/Zac.	8	6	11	17
	3. Perales 2/Zac.	7	5	8	0
Ancho	4. UAA2008/Ags.	8	6	9	14
	5. AP Neek/SLP.	5	6	6	14
	6. 3 v/Zac.	4	10	10	14
	7. SR-2009/Dgo.	3	10	7	10
Guajillo	8. Don Luis/Zac.	12	8	8	12
	9. Perales/Zac.	10	7	7	14
	10. Mirasol 3v/Zac.	5	6	10	13
	11. Don Ramón/SLP.	6	6	10	15
Puya	12. 91/SLP.	1	5	6	4
	13. Saladillo 1/Zac.	6	6	10	9
	14. Saladillo 2/Zac.	6	8	8	13
	15. Caudillo/Dgo.	9	7	8	13
Serrano	16. Coloso/Tamps.	9	3	10	10
	17. HS-44/Tamps.	9	7	8	12
	18. Centauro/Tamps.	6	0	10	6
Jalapeño	19. Don Benito 1/Tamps.	4	7	5	5
	20. Don Benito 2/Tamps.	5	9	8	5
	21. Don Pancho/Tamps.	2	5	8	7
	22. Apache/Chih.	6	7	8	8
	23. Isabel/Chih.	4	9	7	7
	Media	6.3	6.4	8.4	10.3

VARIABLES EVALUADAS DESPUÉS DEL TRASPLANTE

Altura de planta

Las tendencias fueron similares a los 31, 44, 59, 74 y 84 ddt. En la evaluación a los 84 ddt, considerando el promedio de los 23 genotipos de Chile el tratamiento HMA+Rpcv presentó una altura de 7.19 cm, superando a los tratamientos HMA y testigo (5.97 y 5.40 cm, respectivamente). En referencia a las medias por tipo de Chile (Pasilla, Ancho, Guajillo, Puya, Serrano y Jalapeño) se observó que el tratamiento HMA+Rpcv superó a los tratamientos HMA y testigo en todos los casos. Solo en los tipos de Chile Puya, Serrano y Jalapeño el tratamiento HMA superó al testigo. En 19 de los 23 genotipos de Chile el tratamiento HMA+Rpcv superó al tratamiento HMA. Solamente en el genotipo 7 del tipo Ancho, el 12 del tipo Puya, el 17 del tipo Serrano y el 23 del tipo Jalapeño se encontró que el tratamiento HMA superó al tratamiento HMA+Rpcv (Cuadro 3.6). En 14 de los 23 genotipos de Chile se encontró que el testigo sin inoculación fue superado por ambos tratamientos inoculados (HMA y HMA+Rpcv). Las Rpcv (*Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*) por sí solas mejoran el crecimiento de las plantas (Gholami *et al.*, 2009; Bashan *et al.*, 2004). Un incremento de 21.31% en altura de planta se encontró cuando se inocularon plantas de pimiento morrón con *Bacillus sp.* MA 12, con respecto al testigo a los 60 ddt. La media en altura fue 13.43 cm y 11.07 cm para el testigo (Cardona *et al.*, 2008). Adicionalmente, son muchos los estudios que destacan la capacidad de las Rpcv para favorecer la micorrización (Founoune *et al.*, 2002; Mediavilla *et al.*, 2015; Miransari, 2011) y estimular el crecimiento de las plantas micorrizadas (Barman *et al.*, 2015; Frey-Klett *et al.*, 2007).

Diámetro de tallo

El tratamiento HMA+Rpcv superó al tratamiento HMA y al testigo, en la evaluación a los 84 ddt, de acuerdo a valores medios para todos los genotipos de Chile (Cuadro 3.6). Respecto a las medias de los tipos de Chile solamente en los tipos Ancho, Puya y Jalapeño el tratamiento HMA+Rpcv fue superior al tratamiento HMA y al testigo. En 8 de los 23 genotipos el tratamiento HMA+Rpcv superó al tratamiento HMA y testigo. El tratamiento HMA, superó al tratamiento HMA+Rpcv en los genotipos 4, 6, 7, 11, 18, 19, 21 y 23. En nueve genotipos de Chile el testigo fue superado por los tratamientos HMA y HMA+Rpcv. El tratamiento HMA+Rpcv con un valor medio de 14.88 mm, superó al tratamiento HMA y al

testigo (15.26 y 14.05 mm) resultando evidente el efecto de las Rpcv en acrecentar la micorrización y su efecto en las plantas (Frey-Klett y Garbaye, 2007).

Peso seco de la parte aérea

En la evaluación a los 84 ddt, el tratamiento HMA+Rpcv (83.98) resultó superó al tratamiento HMA (54.51) y al testigo (46.78), de acuerdo a la media general de todos los genotipos. De los 23 genotipos de chile en 19 de ellos el tratamiento HMA+Rpcv superó al tratamiento HMA y en 17 superó tanto al tratamiento HMA como al testigo. El tratamiento HMA por su parte logró superar al testigo en los genotipos 5, 6 y 7 del tipo Ancho, 11 del Guajillo, 12, 13 y 14 del Puya, 17 del Serrano, 19, 20, 22 y 23 del Jalapeño. El testigo superó al tratamiento HMA en los genotipos 1 y 2 del tipo Pasilla, 7 del Ancho, 15 del Puya, 16 del Serrano y 21 del Jalapeño. En todos los casos la media por tipo de chile del tratamiento HMA+Rpcv superó a la del tratamiento HMA y a la del testigo (Figura 3.5). Existen reportes de que las Rpcv (Bashan, 1998; Gholami *et al.*, 2009) y los HMA (Castillo *et al.*, 2010), favorecen el crecimiento de las plantas. Adicionalmente las Rpcv aumentan la micorrización, lo que se refleja en el crecimiento de la planta (Lorelí *et al.*, 2002; Founoune *et al.*, 2002; Frey-Klett *et al.*, 2007; Mediavilla *et al.*, 2015; Miransari, 2011; Tarkka y Frey-Klett, 2008) y se corrobora con los resultados de este estudio.

Volumen radical

En todos los casos considerando la media de los tipos de chile el tratamiento HMA+Rpcv superó al tratamiento HMA y al testigo. El tratamiento HMA+Rpcv mostró superioridad en 16 de los 23 genotipos de chile evaluados (Figura 3.5). El tratamiento HMA, superó al testigo en 10 de los 23 genotipos de chile (1 y 2 del tipo Pasilla, 5, 6 y 7 del Ancho, 8 del Guajillo y 20 del Jalapeño). De acuerdo a las medias por tipo de chile, el tratamiento HMA+Rpcv superó al tratamiento HMA y al testigo en todos los casos (Figura 3.5). Lo anterior, evidencia el efecto estimulante de la simbiosis micorrízica por las Rpcv (Rueda-Puente *et al.*, 2010; Frey-Klett *et al.*, 2007).

Cuadro 3. 6. Altura de planta y diámetro de tallo (84 ddt) en 23 genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.

		Altura de planta (cm)			Media	Diámetro de tallo (mm)			Media
		Testigo	HMA	HMA+Rpcv		Testigo	HMA	HMA+Rpcv	
Pasilla	1	6.20 b	5.87 b	9.05 a	7.04 b	13.65 b	12.97 b	15.67 a	14.10 c
	2	6.87 b	5.20 c	9.55 a	7.20 a	13.77 c	14.65 b	15.92 a	14.78 a
	3	6.20 b	5.35 c	7.17 a	6.24 c	14.70 a	14.85 a	14.22 a	14.59 b
	Media	6.42 b	5.47 c	8.59 a		14.04 c	14.15 b	15.27 a	
Ancho	4	6.45 b	5.65 c	7.40 a	6.50 a	12.72 c	15.70 a	13.90 b	14.10 c
	5	5.27 b	5.30 b	6.50 a	5.69 c	13.02 c	14.45 b	14.55 a	14.00 c
	6	5.20 c	6.70 b	6.97 a	6.29 b	14.32 b	15.20 a	14.45 b	14.65 b
	7	6.15 c	7.07 a	6.72 b	6.50 a	13.25 c	16.90 a	14.75 b	14.96 a
Media	5.76 b	6.18 b	6.89 a		13.32 c	15.56 a	14.41 b		
Guajillo	8	6.65 c	7.77 b	8.69 a	7.68 a	14.55 b	13.55 c	15.77 a	14.62 a
	9	7.15 b	5.50 c	8.27 a	6.97 b	12.77 b	12.57 b	14.52 a	13.29 d
	10	5.85 b	5.85 b	7.30 a	6.33 d	14.02 b	12.27 c	14.52 a	13.60 c
	11	5.35 c	6.90 b	8.45 a	6.90 c	13.20 c	14.45 a	14.42 b	14.02 b
Media	6.25 b	6.50 b	8.16 a		13.62 b	13.21 b	14.80 a		
Puya	12	3.00 c	6.10 a	4.62 b	4.57 d	13.90 a	13.37 a	14.17 a	13.81 c
	13	5.27 c	5.82 b	7.57 a	6.22 c	13.40 c	15.27 b	15.60 a	14.75 a
	14	6.10 c	7.15 b	7.80 a	7.01 a	15.00 a	13.32 c	14.55 b	14.29 b
	15	6.47 b	5.17 c	8.55 a	6.73 b	15.07 a	12.00 c	13.80 b	13.62 c
Media	5.21 c	6.06 b	7.13 a		14.34 b	13.49 c	14.53 a		
Serrano	16	4.72 b	5.17 b	6.67 a	5.52 b	13.10 b	12.00 c	16.55 a	13.88 b
	17	4.30 c	5.22 a	5.07 b	4.96 c	13.80 c	14.57 b	14.70 a	14.35 a
	18	4.55 c	5.22 b	6.85 a	5.64 a	13.07 b	14.57 a	12.45 b	13.36 b
Media	4.52 c	5.40 b	6.19 a		13.32 b	13.71 b	15.46 a		
Jalapeño	19	3.90 c	5.30 b	5.90 a	5.03 e	13.20 b	16.25 a	13.65 b	14.36 d
	20	4.65 c	7.20 a	7.20 a	6.35 a	15.55 c	16.42 b	17.35 a	16.44 a
	21	4.65 c	5.25 b	6.25 a	5.38 d	15.55 a	15.37 a	16.05 a	16.65 b
	22	4.60 c	5.35 b	6.90 a	5.61 c	12.05 b	14.45 b	15.37 a	12.95 e
	23	4.80 c	6.72 a	6.02 b	5.85 b	13.90 c	16.82 a	15.47 b	15.40 c
Media	4.52 c	5.96 b	6.45 a		14.05 c	15.26 b	15.51 a		
Media	5.40 b	5.97 b	7.19 a		13.80 b	14.30 b	14.88 a		
General									

- **HMA:** Hongos micorrízicos arbusculares; **Rpcv:** Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
- Promedios en la misma fila y en la misma variable con la misma letra son estadísticamente iguales; así mismo promedios en la misma columna y para el mismo tipo de chile son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

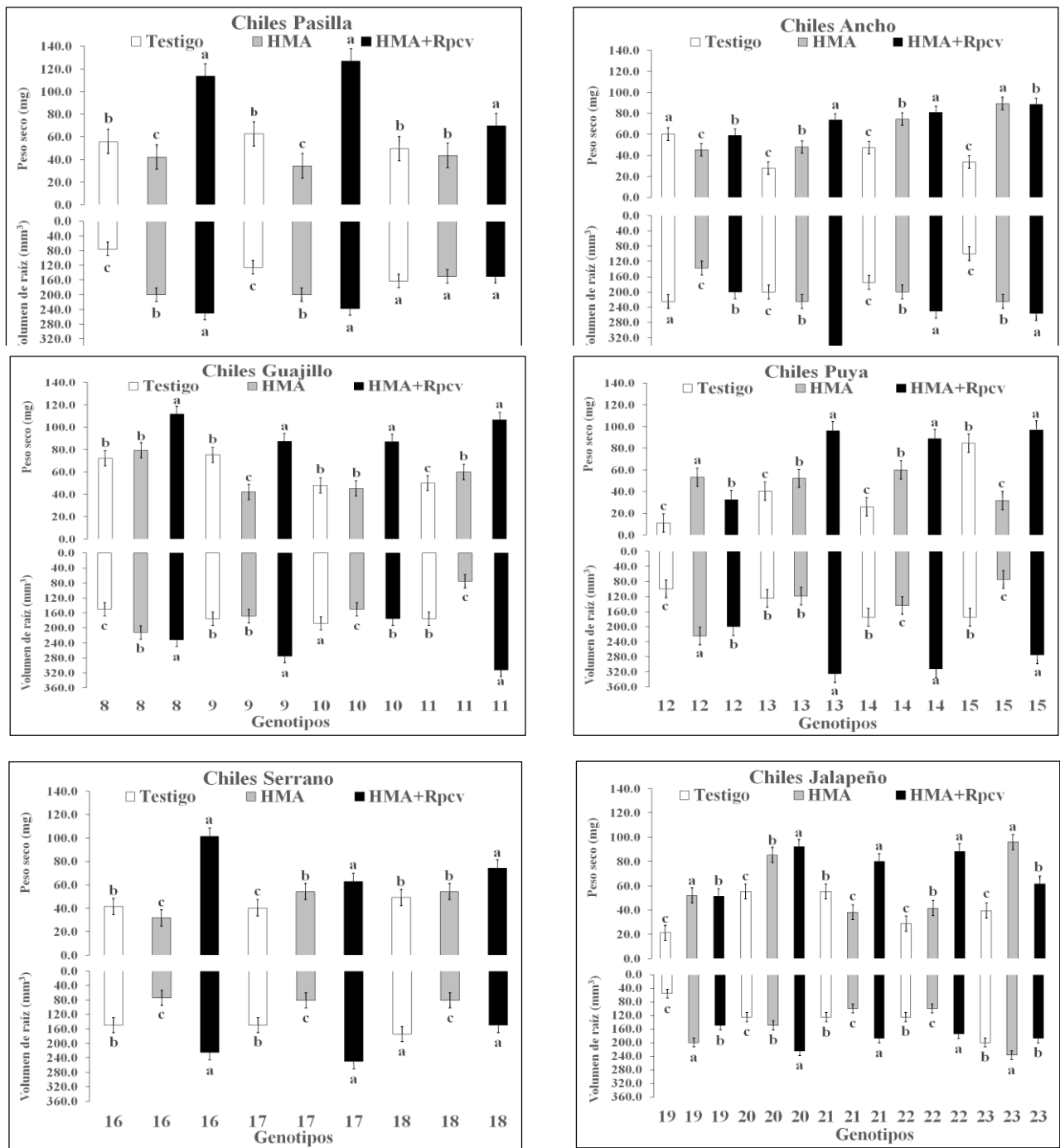


Figura 3. 5. Peso seco de la parte aérea y volumen radical (84 ddt) en 23 genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.

Plantas muertas por ataque de hongos fitopatógenos

La tendencia en número de plantas muertas fue similar en todas las fechas de muestreo (31, 59, 84 ddt). A los 84 ddt, el testigo mostró la mayor cantidad de plantas muertas por *P. capsici*, equivalente a 47%, seguido del tratamiento HMA con 37% y 16% para el tratamiento HMA+Rpcv. Los chiles Pasilla, Ancho y Serrano del tratamiento HMA+Rpcv, presentaron la menor cantidad de plantas muertas respecto al testigo. La inoculación conjunta de los microorganismos (HMA y Rpcv) lograron contrarrestar el daño de *P. capsici*. Los chiles Pasilla, mostraron mayor resistencia 19.39 %, seguido de los Guajillo 21.90 %, Ancho 26.47 %, Puya 32.04 %, Jalapeño 36 %, y los más susceptibles fueron los Serrano con 46.67 % (Cuadro 3.7). La protección de las plantas contra enfermedades por fitopatógenos (Rai, 2001; Perrin, 1991; Gholami *et al.*, 2009; Lugtenberg *et al.*, 2002) puede darse por los HMA y las Rpcv, enemigos naturales de *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y otras (Kloepper y Schrot, 1978; Rai, 2001).

Cuadro 3. 7. Porcentaje de plantas muertas por ataque de fitopatógenos en 23 genotipos de diferentes tipos de chile y tratamientos de inoculación con HMA y Rpcv.

		31 ddt	59 ddt	84 ddt
		(%)		
Pasilla	Testigo	1.00	1.00	2.00
	HMA	1.74	2.61	4.35
	HMA+Rpcv	0.00	0.00	0.87
Ancho	Testigo	3.00	3.00	5.00
	HMA	3.48	3.48	6.09
	HMA+Rpcv	1.74	1.74	2.61
Guajillo	Testigo	4.00	4.00	5.00
	HMA	0.87	0.87	3.48
	HMA+Rpcv	0.00	1.74	1.74
Puya	Testigo	5.00	7.00	11.00
	HMA	4.35	4.35	3.48
	HMA+Rpcv	0.87	0.87	2.61
Serrano	Testigo	3.00	4.00	7.00
	HMA	3.48	5.22	9.57
	HMA+Rpcv	0.87	0.87	2.61
Jalapeño	Testigo	10.00	12.00	17.00
	HMA	3.48	3.48	5.22
	HMA+Rpcv	2.61	3.48	3.48

HMA= Hongos micorrízicos arbusculares; HMA+Rpcv= Hongos micorrízicos arbusculares más rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal; *P. capsici*= *Phytophthora capsici*; ddt= Días después de trasplante.

Colonización micorrízica

El porcentaje de colonización micorrízica se incrementó en 79.07% por efecto de la inoculación con Rpcv a las plantas inoculadas con HMA. En 21 de los 23 genotipos de chile el tratamiento HMA+Rpcv, superó al tratamiento HMA. Solamente en dos casos el tratamiento HMA superó al tratamiento HMA+Rpcv en el genotipo 16 del tipo Serrano y 20 del tipo Jalapeño (Cuadro 3.8). En todos los casos considerando la media de los tipos de chile el tratamiento HMA+Rpcv superó al tratamiento HMA en el porcentaje de micorrización. En dos

casos (chiles tipo Serrano y Jalapeño) el tratamiento HMA+Rpcv superó al tratamiento HMA en 46.99 y 52.39%. Los efectos más notables fueron en los chiles tipo Ancho y Guajillo, en los cuales el tratamiento HMA+Rpcv superó al tratamiento HMA en 106.68 y 105.86% (Cuadro 3.8). Las plantas del tratamiento testigo no presentaron colonización micorrízica. Los resultados anteriores concuerdan con los autores que reportan aumentos en la micorrización de plantas por efecto de la coinoculación con Rpcv (Barman *et al.*, 2015; Frey-Klett *et al.*, 2007; Kataoka *et al.*, 2009; Mamatha *et al.*, 2002; Mediavilla *et al.*, 2015; Tarkka y Frey-Klett, 2008; Zhao *et al.*, 2014).

Índice de vigor (Iv)

El análisis de Componentes Principales (ACP) indicó que con el Componente 1, se explicó el 84% de la varianza total (Kaiser *et al.*, 1960). El ACP con los valores cuantitativos de los 23 genotipos de chile señala que los autovectores para altura de planta, diámetro de tallo, peso seco y volumen de raíz aportaron 42, 39, 41 y 41% al Componente 1 (Cuadro 3.9). Los valores característicos de este componente resultaron positivos en su totalidad para el tratamiento HMA+Rpcv no así para el tratamiento HMA y el testigo los que fueron negativos (Castañón-Nájera *et al.*, 2008). Con lo anterior, se comprueban los efectos aditivos de la coinoculación HMA+Rpcv comparado con la inoculación de los HMA solos (Barman *et al.*, 2015; Frey-Klett *et al.*, 2007; Mamatha *et al.*, 2002; Main y Franco, 2011).

Cuadro 3. 8. Colonización micorrízica en 23 genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv en condiciones de invernadero.

	Genotipo	HMA	HMA+Rpcv	Incremento %
Pasillas	1	61.90	63.64	2.80
	2	36.84	107.14	190.82
	3	32.31	73.56	127.70
	Media	43.68	81.45	86.44
Anchos	4	31.94	98.33	207.83
	5	40.00	71.08	77.71
	6	46.67	56.06	20.13
	7	24.64	70.59	186.51
	Media	35.81	74.02	106.68
Guajillos	8	21.84	47.13	215.79
	9	28.79	31.75	10.28
	10	27.27	57.58	111.11
	11	25.00	75.38	201.54
	Media	25.72	52.96	105.86
Puyas	12	29.51	43.28	46.68
	13	21.21	70.77	233.63
	14	52.63	51.35	-2.43
	15	25.42	77.05	203.06
	Media	32.19	60.61	88.28
Serranos	16	22.81	58.21	155.22
	17	42.62	68.18	59.97
	18	59.57	57.35	96.27
	Media	41.67	61.25	46.99
Jalapeños	19	24.29	42.03	73.06
	20	36.14	83.75	131.71
	21	18.46	53.23	188.31
	22	66.15	41.94	-36.59
	23	36.92	56.36	52.61
	Media	36.39	55.46	52.39
Media General		35.35	63.29	79.07

* Números negativos indican que el tratamiento HMA presentó valores mayores que el tratamiento HMA+Rpcv.

Cuadro 3. 9. Índices de vigor (Iv) en 23 genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.

	Genotipo	Testigo	HMA	HMA+Rpcv
Pasillas	1	-0.92	-0.62	0.58
	2	0.18	-0.76	1.37
	3	-0.49	-1.74	0.44
Anchos	4	-0.39	0.29	-0.20
	5	-0.29	-0.56	0.11
	6	-0.87	-1.98	0.93
	7	-0.17	-0.52	0.11
Guajillos	8	-0.56	-0.74	0.47
	9	-0.81	-0.42	1.11
	10	-0.20	-0.42	-0.64
	11	-1.19	-1.51	1.16
Puyas	12	-2.37	-0.22	-0.82
	13	-2.13	-0.58	0.44
	14	-1.11	-0.39	0.25
	15	-0.89	-1.53	-0.86
Serranos	16	-1.28	-2.54	0.23
	17	-1.63	-0.74	0.54
	18	-1.31	-2.62	-0.80
Jalapeños	19	-1.69	-1.52	-0.12
	20	-1.76	0.62	0.73
	21	-2.68	-0.83	-0.22
	22	-1.82	-0.99	-0.13
	23	-2.18	0.21	-1.02

- **HMA:** Hongos micorrízicos arbusculares; **Rpcv:** Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Los resultados aquí obtenidos demuestran el efecto aditivo de las Rpcv respecto a la inoculación solo con HMA en altura de planta, diámetro de tallo, peso seco de la planta,

volumen de raíz y porcentaje de colonización micorrízica. Estos microorganismos son conocidos como promotores del crecimiento vegetal (Luna *et al.*, 2013; Frey-Klett *et al.*, 2007), pero con este estudio se incrementa la información referente al desarrollo de una tecnología de co-inoculación (HMA y Rpcv) para mejorar la producción de genotipos de chiles mexicanos.

CONCLUSIONES

A). Los HMA asociados a las Rpcv lograron incrementos significativos en altura de planta, diámetro de tallo, peso seco de la planta y el volumen de raíz y disminuyeron los daños causados *P. capsici* en comparación con las plantas inoculadas con HMA y las del testigo sin inocular.

B). Los chiles tipo Pasilla y Guajillo presentaron la mayor resistencia al ataque de *P. capsici*, mientras que los tipo Serrano y Jalapeño fueron los más susceptibles.

LITERATURA CITADA

1. **Barman**, P., S.K. Singh, V.B. Patel, A.K. Singh, L. Nain. 2015. Synergistic interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza helper bacteria improving antioxidant activities in Troyer citrange and Cleopatra mandarin under low moisture stress. *Indian J. Hortic.* 72:1 33-37.
2. **Bashan** Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16: 729-770.
3. **Bashan**, Y., G. Holguin G, L.E. de-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: agricultural, physiological, molecular and environmental advances. *Can. J. Microbiol.* 50: 521-577.
4. **Bautista-Calles**, .J, R. García-Espinosa, E. Zavaleta-Mejía, J. Pérez-Moreno, R. Montes-Belmont, R. Ferrera-Cerrato, M. Huerta-Lara M. 2010. Disminución de la marchitez del chile (*Phytophthora capsici* Leo) con complejidad ascendente de antagonistas en el sustrato de germinación del chile (*Capsicum annuum* L.). *Interciencia.* 35 (8) 613-618.
5. **Cardona**, G., C.P. Peña-Venegas, A. Arcos. 2008. Occurrence of arbuscular micorrizae fungi in red pepper (*Capsicum sp.*) in the Amazonian region of Colombia. *Agron. Colomb.* 26:3 459-470.
6. **Castañón-Nájera**, G., L. Latournerie-Moreno, M. Mendoza-Elos, A. Vargas-López, H. Cárdenas-Morales. 2008. Colección y caracterización de Chile (*Capsicum spp*) en Tabasco, México. *Rev. Int. de Botánica Experimental.* 77: 189-202.
7. **Castillo**, U.F., G.A. Strobel, E.J. Ford, W.M. Hess, H. Porter, J.B. Jensen. 2002. Munumbicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* (NRRL30562) endophytic on *Kennedianigriscans*. *Microbiology* 148: 2675–2685.
8. **Castillo**, C., R. Rubio, F. Borie, E. Sieverding. 2010. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in horticultural production systems of Southern Chile. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 10: 407-413.
9. **Chamizo**, A., R. Ferrera-Cerrato, L. Varela. 1998. Identificación de especies de un consorcio del genero *Glomus*. *Rev. Mex. Mic.* 14: 37-40.
10. **Dakessian**, S., M. S. Brown y G. J. Bethlenfalvay. 1986. Relationship of mycorrhizal growth enhancement and plant growth with soil water and texture. *Plant and Soil* 9 (3): 439-443.

11. **Desai, S., M.S. Reddy, J.W. Kloepper.** 2002. Comprehensive Testing of Biocontrol Agents. En Gnanamanickam SS (Ed.) Biological Control of Crop Diseases. Dekker. Nueva York, NY, EEUU. p. 387-420.
12. **FAOSTAT**(Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics).2013. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S/>. Consultado el 4 de Septiembre de 2014.
13. **Ferrera-Cerrato, R., A. Alarcón.** 2004. Biotecnología de los hongos micorrízicos arbusculares. In: Memoria Simposio de Biofertilización. A Díaz F, P M Mayek, A Mendoza, M N Maldonado (Eds.). Campo Experimental Río Bravo, INIFAP y Centro de Biotecnología Genómica, IPN. Río Bravo, Tamps, México. p. 1-9.
14. **Franco-Ramírez, A., R. Ferrera-Cerrato, L. Varela-Fregoso, J. Pérez-Moreno, A. Alarcón.** 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi in chronically petroleum contaminated soils in México and the effects of petroleum hydrocarbon son spore germination. J. Basic Microbiol. 47: 378-383.
15. **Founoune, H., R. Duponnois, A.M. Ba, S. Sall, I. Branget, J. Lorquin , M. Neyra.** 2002. Mycorrhiza helper bacteria stimulate ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus alba*. New Phytol. 153 (1) 81-89.
16. **Franco-Ramírez, A., R. Ferrera-Cerrato, L. Varela-Fregoso, J. Pérez-Moreno, A. Alarcón.** 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi in chronically petroleum contaminated soils in México and the effects of petroleum hydrocarbon son spore germination. J. Basic Microbiol. 47: 378-383.
17. **Frey-Klett P., J. Garbaye.** 2007. The Mycorrhiza helper bacteria revisited. New Phytol. 176 (1): 22-36.
18. **Frey-Klett, P., J. Garbaye, M. Tarkka.** 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. New Phytol. 174 (4): 22-36.
19. **García-Espejel, F.** 2015. Calidad y vida anaquel del fruto de dos variedades mexicanas de fresa con altas concentraciones de CO₂. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Programa Fruticultura.
20. **Gerdemann, J.W. y T.H. Nicolson.** 1963. Spore of mycorrhizae endogen species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. Br. Mycol. Soc. 46: 235-244.
21. **Gholami, A., S. Shahasavani, S. Nizarat.** 2009. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. World Acad. Sci. Eng. Technol. 49: 10-24.
22. **Harley, J.L. y S.E. Smith.** 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, Toronto.

23. **Hunziker**, A.T. 1979. South American Solanaceae: a synoptic survey. In Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD. (Eds.). The biology and taxonomy of the solanaceae. Linn. Soc. Symp. 7: 49-85.
24. **Jackson** RM. y **Mason** PA. 1984. Mycorrhiza. Edward Arnold, Ltd, London. 60 pp. ISBN 0-7131-2876-3.
25. **Kaiser**, H.F. 1960. The application of electronic computers to factor analysis. Educ. Psychological Meas. 20: 141-151.
26. **Kataoka**, R., T. Taniguchi, K. Futai. 2009. Quantification of *Wautersia [Ralstonia] basilensis* in the mycorrhizosphere of *Pinus thunbergii* Parl., and its effect on mycorrhizal formation. Soil Biol. Biochem. 41 (10) 2147-2152.
27. **Kloepper**, J.W, M.N. Schroth. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In Proc. Of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Clarey G (Ed). Station de Pathologie Vegetale Etphyto-bacteriologie. Angers, France. 879-882.
28. **Lorelí**, M., E. Ortega, R. Rodés, F. Fernández. 2002. Métodos efectivo para la desinfección total de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA): Aislamiento y caracterización de Bacterias endospóricas en *Glomus clarum*. Cultivos Tropicales. 23 (1): 21-24.
29. **Lugtenberg**, B., T. Chin-A-Woeng, G. Bloemberg. 2002. Microbe-Plant interactions: principles and mechanisms. Antonie Van Leeuwenhock. 81: 373-383.
30. **Luna**, M. L., RA.P. Martínez, I.M. Hernández, SM. M. Arvizu, A. Jr. Pacheco. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Rev. Fitotec. Mex. 36 (1): 63-69.
31. **Main**, G. y J. Franco. 2011. Efecto de la bacteria *Bacillus subtilis* y el hongo micorrízico arbuscular *Glomus fasciculatum* en la fertilización fosfórica en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* ssp. cv Andigena). Rev. Latinoamericana de la Papa. 16 (2): 250-269.
32. **Mamatha**, G., D.J. Bagyaraj, S. Jaganath. 2002. Inoculation of field-established mulberry and papaya with arbuscular mycorrhizal fungi and a Mycorrhiza helper bacterium. Mycorrhiza. 12 (6): 313-316.
33. **Mediavilla**, O., J. Olaizola, L.S. del Blanco, J.A. Oria de Rueda, P. Martin-Pinto. 2015. Mycorrhization between *Cistus ladanifer* L., and *Boletus edulis* Bull is enhanced by the Mycorrhiza helper bacteria *Pseudomonas fluorescens*. 10: 407-413. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Publicado online.
34. **Miransari**, M. 2011. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89 (4): 917-630.

- 35. Perrin, R.** 1991. Mycorrhizas et protection phytosanitaire. In Les mycorrhizas des arbres et plantes cultivées. Ed. Strullu D G, pp 93-131. Lavoisier, Paris, France.
- 36. Perry, L. R.** Dickau, S. Zarrillo, I. Holst, D.M. Pearsall, D.R. Piperno, M.J. Berman, R.G. Cooke, K. Rademaker, A.J. Ranere, J.S. Raymond, D. H. Sandweiss, F. Scaramelli, K. Tarble y J.A. Zeidler. 2007. Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science* 315 (5814): 986-988. DOI: 10.1126/science.1136914
- 37. Rai, M.K.** 2001. Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In vitro. Cell. Dev. Biol. Plant.* 37: 158-167.
- 38. Rivera R., F.** Fernández, A. Hernández, J. R. Martín and Kalyanne Fernández. 2003. The effective management of arbuscular mycorrhizal symbiosis, a way to sustainable agriculture. Case study: The Caribbean. The Havana: INCA, 166 p. ISBN: 959 - 7023 - 24 - 5.
- 39. Rueda-Puente, E.O,** B. Murillo-Amador, T. Castellanos-Cervantes, J.L. García-Hernández, M.A. Tarazón-Herrera, S. Moreno-Medina, L.E. Gerlach-Barrera. 2010. Effects of plant growth promoting bacteria and mycorrhizal on *Capsicum annuum* L. var. aviculare ([Diebarch] D'Arcy and Esbaugh) germination under stressing abiotic conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 48 (8): 724-730.
- 40. SIAP** (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2015. <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/2014>. Consultado el 4 de Septiembre de 2015.
- 41. Tarkka, M.T.** y P. Frey-Klett. 2008. Mycorrhiza helper bacteria. En: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics, 3th Edition. Varma A, (ed.) Mycorrhiza. Helmholtz-Centre for Environ. Res. Department Soil Ecol. p. 113-133.
- 42. Varela, L.** y D. Trejo. 2001. Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie), Núm.1. p. 39-51.
- 43. Zhao, L., W.** Xiao-Qin W, Y. Jian-Ren. 2014. Isolation and characterization of a mycorrhiza helper bacterium from rhizosphere soils of poplar stands. *Biol. Fertility Soils.* 50 (4): 593-601.

Capítulo IV

«Crecimiento, producción de frutos y calidad postcosecha de tres genotipos de chile inoculados con hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal»

RESUMEN

La inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) junto con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Rpcv) mejora el crecimiento de las plantas de chile en semillero y después del trasplante; así como la resistencia de estas al ataque por hongos fitopatógenos. En este experimento se determinó la respuesta de la inoculación en semillero con HMA y Rpcv en el crecimiento de las plantas y, además, en la producción de frutos y calidad postcosecha de estos. Tres genotipos de chile sobresalientes en estudios previos fueron cultivados en condiciones de invernadero durante el período otoño-invierno 2015-2016. Los microorganismos en estudio disminuyeron el pH en el fruto y redujeron su firmeza, obteniendo con ello frutos más blandos que facilitan su consumo. El contenido de ácido cítrico y ascórbico aumentó con la inoculación microbiana. La pérdida de peso y la tonalidad verde (color externo del fruto) se incrementaron; además, la luminosidad de los frutos aumentó, al presentarse tonos claros más altos. En las evaluaciones realizadas a los 1, 4, 6 y 8 días después del corte (ddc), se encontró que los microorganismos inoculados incrementaron las características organolépticas y alargaron el tiempo de almacenamiento hasta en ocho días después de cosecha, mejorando con ello su vida de anaquel. La inoculación con HMA y Rpcv afectó positivamente la mayoría de las variables de estudio.

INTRODUCCIÓN

Desde hace algunas décadas los microorganismos más estudiados son los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), los que forman asociaciones simbióticas de manera natural con en el 85% de las especies vegetales, por lo que son considerados simbioses universales (Lorelí, *et al.*, 2002). La especificidad que ocurre entre ambos simbioses planta-microorganismos está condicionada por las características físico-químicas y biológicas del sustrato sobre el cual se desarrollen (Rai, 2001; Fernández, 2003) y de las prácticas agronómicas desarrolladas.

Existen microorganismos que realizan funciones como promotoras del crecimiento vegetal, participan en el control biológico de fitopatógenos, mejoran la eficiencia en procesos de fitoremediación de compuestos tóxicos encontrados en la rizósfera y son fuente de más de 20,000 compuestos biológicamente activos que influyen en el rendimiento y la supervivencia de las plantas (Pérez y Chamorro, 2013). También producen algunos metabolitos primarios que funcionan como antibióticos (Castillo, *et al.*, 2002), además de metabolitos secundarios (Jackson y Mason, 1984). Colonizan diferentes partes de la planta como el tejido de apoplasto, espacios intercelulares y vasos de xilema principalmente (Stone, *et al.*, 2000; Perrin, 1991; Pérez y Chamorro, 2013). Tienen la capacidad de colonizar flores, frutos y semillas. Se cree que estimulan el crecimiento de las plantas a través de la movilización de nutrientes del suelo a la planta produciendo una gran cantidad reguladores del crecimiento vegetal (Ahemad, 2012; Pérez y Chamorro, 2013; Barman *et al.*, 2015). Estos microorganismos forman ciertas infecciones sin daño alguno dentro de ciertos tejidos vegetales durante o parte de su ciclo de vida (Limsuwan, *et al.*, 2009). Se encuentran asociadas a diferentes tejidos de plantas leñosas (Chanway, 1998).

La colonización de rizobacterias endófitas inducen modificaciones en la pared celular como la deposición de calosa, pectina, celulosa y compuestos fenólicos formando una barrera estructural en el sitio de ataque de los fitopatógenos (Benhamou, 2000). El tiempo de

coexistencia con los hospederos (especies vegetales) ha resultado en un proceso co-evolutivo adquiriendo tales microorganismos una capacidad transformadora (Borges *et al.*, 2009). Algunos microorganismos endófitos sintetizan sustancias biológicamente activas muy similares a los metabolitos secundarios los que son producidos por las planta hospedera (Wang y Dai, 2011). Además de compuestos volátiles, producidos al interior de las plantas los que ocasionan una defensa contra el ataque de fitopatógenos (Macías-Ruvalcaba, *et al.*, 2010).

En la actualidad existe interés utilizar microorganismos con fines agrícolas para resolver los problemas presentados debido al incremento de enfermedades durante el desarrollo de cultivos y los elevados costos de producción por compra de pesticidas y fertilizantes químicos; además, de los problemas ambientales que la aplicación de estos representa (Aliye, *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

1. Determinar si las Rpcv asociadas a los HMA favorecen el crecimiento, producción de frutos y su calidad postcosecha en tres genotipos de Chile.
2. Diferenciar los efectos de la inoculación con HMA de aquellos derivados de los nutrientes aportados por el inoculante.

HIPÓTESIS

- 1.- Los HMA asociados a Rpcv favorecen el crecimiento, la producción de frutos y su calidad postcosecha en tres genotipos de Chile, en comparación con la inoculación de sólo HMA y de plantas sin inocular.
- 2.- El efecto en el crecimiento, producción de frutos y su calidad postcosecha de tres genotipos de Chile se debe a los HMA presentes en el inoculante y no a los nutrientes que el inoculante aporta.

MATERIALES Y MÉTODOS

De acuerdo a los resultados del Capítulo III, se seleccionaron tres genotipos de Chile debido a su respuesta a la inoculación con HMA y Rpcv:

- 1.- Pasilla,
- 2.- Ancho,
- 3.- Guajillo.

Además, se incluyeron las dos Rpcv que mayor germinación de esporas de HMA promovieron:

- 1.-*Pseudomonas tolasii* P-61.
- 2.-*Bacillus pumilus* R-44.

Se realizó una mezcla con los tres consorcios micorrízicos que mejor se asociaron a las Rpcv en condiciones *in vitro* (Capítulo II):

- 1.- *Rhizophagus intraradices*.
- 2.- Jalapa I.
- 3.- Cedro

El trabajo se realizó en condiciones de invernadero en el Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, durante el período otoño-invierno del año 2015-2016.

Preparación de semilleros

Semilleros de unicel de 200 cavidades a los que se les agregó turba fina esterilizada se utilizaron para la germinación de las semillas. La esterilización se realizó en olla de presión a 18.5 lb pulg⁻² (psi), con una temperatura de 120°C y durante tres h.

Desinfestación de las semillas

Las semillas de chile antes de la siembra se introdujeron en una solución de cloro comercial al 5% durante siete min, después se realizaron tres enjuagues con agua destilada y finalmente secadas a temperatura ambiente.

Siembra

La siembra de los tres genotipos de chile se realizó depositando dos semillas por cavidad, a una profundidad de 0.5 cm, cubriendo con una capa ligera de sustrato humedecido. Después el semillero se cubrió con polietileno negro para incrementar la temperatura, conservar la humedad y asegurar germinación. La germinación en los tres genotipos de chile inició a los 11 dds. Los riegos a los semilleros fueron de forma frecuente logrando siempre un contenido de humedad necesaria para el desarrollo de las plántulas de chile.

Inoculación con HMA y Rpcv

El inóculo de HMA (*Rhizophagus intraradices*, Jalapa I y Cedro) se aplicó al momento de la siembra depositando 10 g por cavidad, en contacto con las semillas. El inóculo contenía 1,788 esporas por 100 g de suelo húmedo y fue producido del mismo modo que se describió en el Capítulo III.

Para la inoculación de Rpcv se siguió el protocolo escrito en el Capítulo II. Un mL de medio de cultivo conteniendo 10⁸ bacterias mL⁻¹ se inoculó a los 11 dds, utilizando micro pipeta graduada y depositando las bacterias sobre la superficie de la cavidad.

Tratamientos de estudio

Los tratamientos de estudio fueron seis:

- 1.-Testigo (sin inoculación).
- 2.-Inoculante con HMA.

3.-Inoculante esterilizado. El inoculante con HMA se esterilizó en olla de presión a 18 lb plg⁻² durante 2 horas. Este proceso eliminó los propágulos micorrízicos y provocó que muchos de los nutrientes contenidos en tejidos vegetales y microbianos quedaran en sus formas disponibles para las plantas, además de los nutrimentos que posee normalmente el inoculante, debido a que su proceso de producción incluye el riego con soluciones nutritivas ricas en todos los nutrimentos excepto fósforo.

4.- Inoculación con Rpcv.

5.-Inoculante con HMA+Rpcv).

6.-Inoculante esterilizado +Rpcv.

Todos los tratamientos se establecieron para los 3 genotipos de chile con diez repeticiones en cada tratamiento. Debido a la presencia de nematodos en el inoculante con HMA, en los tratamientos 2 (Inoculante con HMA) y 5 (Inoculante con HMA+Rpcv) se presentó la muerte de hasta el 50% de las plántulas en semillero. Estas plantas faltantes se consideraron como datos perdidos en el análisis estadístico de las variables.

Trasplante

Sustrato

Una mezcla de suelo agrícola y Agrolita (60:40 V/V) fue utilizada. A cada bolsa de polietileno se le agregaron 1.7 kg de sustrato. El suelo agrícola se obtuvo de terrenos ubicados entre las localidades San Luis Huexotla y San Isidro en el municipio de Texcoco, estado de México. El suelo se secó a temperatura ambiente y a la sombra, se tamizó en malla de 6 mm, después se mezcló con Agrolita. Una muestra representativa del suelo agrícola (500 g) se separó para hacer su análisis físico y químico (Cuadro 4.1).

Cuadro 4. 1. Análisis físico y químico del suelo utilizado en este experimento.

Propiedades físicas	Método utilizado	Valor
Textura	Bouyucos	
Arena		61%
Limo		18%
Arcilla		21%
Tipo de suelo		Franco-arcillo-arenoso
Propiedades químicas		
pH	H ₂ O (1:2)	7.8
C.E.	H ₂ O (1:5)	0.03 dS m ⁻¹
M.O.	Walkley-Black	3.30%
CIC		19.2
Propiedades de fertilidad		
N	Estimado	0.16%
P	Olsen	40 ppm
K	NH ₄ OAc 1N (pH=7)	2.9 meq 100 g ⁻¹
Ca		20.0 meq 100g ⁻¹
Mg		4.9 meq 100g ⁻¹
Na		0.1 meq 100g ⁻¹
N-NO ₃	KCl (2 N)	18.0 ppm
N-NH ₄		13.0 ppm
Fe	DTPA	5.0 ppm
Cu		0.8 ppm
Zn		1.7 ppm
Mn		9.0 ppm

La esterilización del sustrato se llevó a cabo utilizando un tonel metálico (capacidad 200 L) con tapa, calentado con quemador de gas. Se introdujeron cinco sacos con 20 kg de sustrato cada uno. Se vertieron 40 L de agua y se tapó con bolsas de polipapel para evitar la pérdida de agua en forma de vapor. Se colocó la tapa metálica y se dejó el fuego durante seis h.

El trasplante se realizó a los 72 dds, cuando las plántulas tenían de ocho a nueve hojas verdaderas y una altura en el rango de 10 a 12 cm. Se utilizaron bolsas de plástico negro con 1.7 kg de sustrato cada una (Figura 4.1).



Figura 4. 1. Vista del experimento en invernadero.

Riegos del trasplante a la cosecha

Se realizó el primer riego a saturación a cada una de las macetas aplicando un L de agua corriente. Después de realizado el trasplante se aplicaron un total de 15 riegos con 50 mL por planta durante el desarrollo del cultivo hasta la cosecha de frutos, según las necesidades particulares de cada planta.

Plagas y enfermedades

Durante el desarrollo del cultivo se presentó mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) en bajas poblaciones, realizando aplicaciones frecuentes de téis orgánicos elaborados con frutos de chile, ajo y cebolla logrando la ausencia de insectos en la planta. También se observó, en baja escala, la presencia de Cenicilla (*Leveillula taurica* (Lev)); la cual se controló reduciendo la frecuencia de los riegos sin estresar por sequía a las plantas.

Cosecha

La madurez de los frutos en los tres genotipos de chile se presentó en el mismo periodo, por lo cual se hizo un único corte de frutos a los 78 ddt (Figura 4.2).



Figura 4. 2. Vista de los chiles producidos en los tres genotipos (De izquierda a derecha, Pasilla, Ancho y Guajillo).

Producción.

Se pesaron los frutos por cada planta y se hicieron cálculos para producción de frutos expresándola en kg ha^{-1} suponiendo 9 plantas m^{-2} .

Variables evaluadas durante el desarrollo del cultivo

Las variables que se evaluaron durante el desarrollo del cultivo fueron:

Altura de planta.

En la evaluación realizada a los 43 ddt se determinó la altura de planta. La medición se hizo desde la superficie del suelo hasta la presencia de las últimas hojas en crecimiento, utilizando regla graduada de 50 cm.

Diámetro de tallo.

La medición de esta variable se realizó a los 43 ddt, considerando una altura de 15 cm de la superficie del sustrato y utilizando un vernier (Truper MR) digital con escala de graduación de 150 mm.

Número de hojas por planta.

Para la variable número de hojas, se realizó un conteo en cada una de las plantas a los 43 ddt.

Número de flores por planta.

De la misma manera que la variable anterior el conteo del número de flores por planta se realizó a los 43 ddt, considerando solamente flores abiertas.

VARIABLES RELACIONADAS CON LOS FRUTOS

Los frutos de chile de los tres genotipos fueron cosechados durante la tarde. Después se llevaron al Laboratorio de Postcosecha, Programa de Fruticultura, Colegio de Posgraduados *Campus* Montecillo. Las variables evaluadas para producción y calidad postcosecha del fruto fueron:

Almacenamiento.

Los frutos de chile cosechados fueron almacenados en refrigerador a una temperatura de 22°C, hasta el proceso de evaluación destructiva.

Pérdida de peso.

Para determinar la pérdida de peso se utilizaron 12 chiles almacenados de cada tratamiento. Cada uno de los frutos se pesó en balanza digital (Mettler modelo EY2200A), con aproximación de 0.1 g. La ecuación descrita a continuación fue considerada para realizar los cálculos correspondientes.

$$\% \text{ Pérdida de peso} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso final}} \times 100$$

Patrón de maduración.

Para determinar el cambio de color en el patrón de maduración de los chiles se utilizaron 12 frutos de cada uno de los tratamientos en los tres genotipos (Figura 4.3). Se realizaron cuatro evaluaciones a los 1, 4, 6 y 8 días después de la cosecha (ddc).

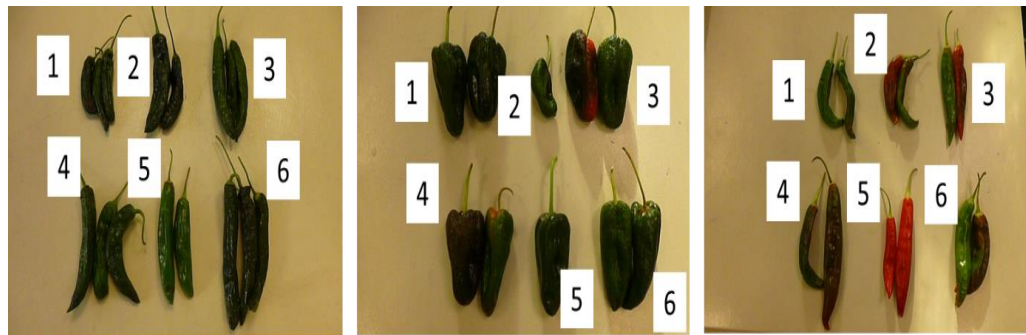


Figura 4. 3. Patrón de maduración de los frutos producidos por los tres genotipos (De izquierda a derecha, Pasilla, Ancho y Guajillo). 1= Testigo, 2= HMA, 3= Inoculante Esterilizado, 4= Rpcv, 5= HMA+Rpcv, 6= Inoculante Esterilizado+Rpcv.

Color externo.

El color externo de los frutos de chile se determinó considerando el índice de color (IC= $-10ab/L$), propuesto por Rueda-Puente *et al.*, (2010). Se utilizó un colorímetro de reflexión (Hunter Lab Reston Virginia, USA, Modelo D-25), determinando los parámetros adimensionales L, a, b. La literal L, refiere la luminosidad que es definida como la proporción de luz transmitida por el objeto de estudio, la que varía entre cero (0) negro y cien (100) blanco. El Chroma (croma) que expresa la proporción de contenido cromático es calculada mediante la función $(a^2+b^2)^{0.5}$. El Hue o ángulo de tono varía entre 0° y 360° (0° = Rojo, 90° = Amarillo, 180° = Verde, 270° = Azul) de acuerdo a McGuire (1992). El ángulo Hue se calculó según la metodología de Arias *et al.*(2000), cuando el valor de $a > 0$ y el valor de $b \geq 0$, se utiliza la ecuación $180 + \tan^{-1}(b/a)$, pero cuando el valor de $a < 0$, se utilizará la ecuación $\tan^{-1}(b/a)$ García-Espejel, (2015). Para la medición del color en los frutos de chile se consideraron tres posiciones cerca del parte basal, en la parte central y cerca de la parte apical.

Variables del fruto con pruebas destructivas

Se utilizaron 46 frutos por cada genotipo en cada evaluación destructiva, las cuales se realizaron a los 1, 4, 6 y 8 ddc.

Las variables a considerar para las evaluaciones realizando pruebas destructivas fueron:

Firmeza de los frutos.

La firmeza del fruto se determinó a través de un Texturómetro (Wagner Force Five modelo FDV-30), con base metálica (Marca Chatillón) adaptada con un puntal plano y realizando un corte seccionado. El corte de la pulpa se realizó en dos secciones (A y B) del fruto, considerando la parte central. Los valores fueron expresados en Newton (1 Newton= 0.101971 kgf).

pH del fruto.

La medición del pH se hizo en la solución que se obtuvo después de licuar los frutos para determinar el contenido de vitamina C. Se utilizó un potenciómetro digital (Corning Scientific Instruments modelo 12), de lectura directa y calibrado con los estándares correspondientes (pH= 4.0 y pH= 7.0). Después se obtuvo una muestra del filtrado que fue colocada en un vaso de precipitado con tal cantidad que lograra cubrir el electrodo de medición. Entre cada muestra se hizo un enjuague del electrodo utilizando agua destilada y secando con papel absorbente.

Ácido cítrico.

Ésta se determinó en muestras de pulpa de cada uno de los frutos de Chile de acuerdo a la metodología descrita por la A.O.A.C, (1990). Cada uno de los de los frutos se seccionó en trozos muy pequeños. Después se pesó una muestra de 5 g en balanza digital (Mettler modelo EY2200A), con aproximación de 0.1 g y se colocó en un frasco de vidrio (tipo Gerber). Se agregaron 50 mL de agua destilada, se realizó después el licuado de la muestra utilizando un molino vertical (marca Taurus) durante 3 min. Enseguida se utilizó un colador plástico y se tomaron 5 mL de alícuota depositados en un vaso de precipitado de vidrio (capacidad 50 mL) agregando dos gotas del indicador de fenolftaleína y después se tituló con solución de

hidróxido de sodio (0.1N). Para realizar los cálculos se utilizó la siguiente fórmula (los datos se expresaron en mg de ácido cítrico g⁻¹ de frutos frescos):

$$\% \text{ Ácido cítrico} = \frac{(\text{mL NaOH (0.1N) gastados}) (\text{N del NaOH}) (\text{Meq Ac. Oxálico}) (\text{Vol.}) (100)}{\text{Alícuota (5 mL)}}$$

N= Normalidad del NaOH que es igual a 0.1
Meq= Miliequivalentes del ácido oxálico que es igual a 0.064
Vol.= Volumen de agua destilada agregada
Alícuota= 5 mL

Contenido de vitamina C.

Se determinó de acuerdo a la metodología 2,6-Dicloroindolfenol descrito por la A.O.A.C, (1984). Se pesó una muestra de 3 g en balanza digital (Mettler modelo EY2200A) con aproximación de 0.1 g y se colocó en un frasco de vidrio (tipo Gerber), se agregaron 30 mL de ácido oxálico. Se realizó después el licuado de la muestra de fruto utilizando una licuadora de aspas (Marca Osterizer) durante 3 min. Enseguida se utilizó un colador plástico y se tomaron 3 mL de alícuota depositados en un vaso de precipitado de vidrio (50 mL), después se agregó una solución 2,6-Dicloroindolfenol para titular. Los resultados se expresaron en mg de ácido ascórbico g⁻¹ de frutos frescos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción

De manera general, la inoculación con HMA y con Rpcv tuvo sus mayores efectos en los genotipos Pasilla y Guajillo (Figura 4.4). Los efectos observados en las plantas de los tres genotipos se deben a la actividad de los HMA y no a los nutrientes aportados por el inoculante. En ninguno de los tres genotipos se observó que la inoculación de HMA+Rpcv tuviera un efecto mayor en producción de frutos que la inoculación sólo de HMA.



Figura 4. 4. Imágenes de la producción de frutos por los tres genotipos y en tres tratamientos.

En el genotipo Pasilla, la inoculación con microorganismos benefició la producción de frutos por las plantas. El testigo fue superado por la inoculación con HMA, con Rpcv y por la inoculación conjunta de HMA y Rpcv. En referencia a si el efecto en la producción de frutos se debe a los HMA o a los nutrientes presentes en el inoculante micorrízico, se pudo demostrar que son los HMA los que favorecen esta producción; ya que el tratamiento HMA superó al Inoculante Esterilizado. Sin embargo, en este genotipo se observó que el asociar las Rpcv con los HMA se redujo la producción de frutos, pues el tratamiento HMA superó al HMA+Rpcv (Cuadro 4.2).

Para el genotipo Ancho, la inoculación de HMA y Rpcv de manera separada produjeron similar cantidad de frutos que el testigo; aunque la doble inoculación aumentó la producción de estos. Los efectos observados en la producción de frutos por las plantas se pueden asociar a los HMA y no a los nutrimentos presentes en el inoculante, ya que el tratamiento con HMA superó al tratamiento con Inoculante Esterilizado (Cuadro 4.2).

Pare el genotipo Guajillo, la inoculación tanto de HMA, como de Rpcv y HMA+Rpcv mejoró la producción de frutos en comparación al testigo. Los efectos de la inoculación con HMA se debieron a la actividad de los HMA y no a los nutrientes presentes en el inoculante, ya que el tratamiento HMA superó al Inoculante Esterilizado. La inoculación solo de HMA produjo una respuesta similar en la producción de frutos por las plantas que la inoculación de HMA+Rpcv, pero la inoculación sólo de Rpcv produjo una respuesta menor (Cuadro 4.2).

Cuadro 4. 2. Producción de frutos en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.

Tratamientos	Pasilla	Ancho	Guajillo
		(kg ha ⁻¹)	
Testigo	1,323 d	2,813 bc	2,116 c
HMA	4,106 a	3,402 ab	3,830 a
Inoculante Esterilizado	1,853 cd	1,463 c	2,420 c
Rpcv	2,323 c	2,546 bc	3,096 b
HMA+Rpcv	3,446 b	3,893 a	3,903 a
Inoculante Esterilizado+Rpcv	1,653 a	2,263 c	2,360 c

Promedios con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$).

Variables evaluadas en el desarrollo del cultivo

Altura de planta

En cuanto a la altura de las plantas, en los tres genotipos y en casi todos los tratamientos, la altura de las plantas fue similar a los 43 ddt. Las únicas diferencias que se pudieron observar fueron en el genotipo Guajillo y sólo el tratamiento de inoculación con HMA+Rpcv superó al testigo (Cuadro 4.3).

Cuadro 4. 3. Altura de la planta a los 43 ddt en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.

Tratamientos	Pasilla	Ancho	Guajillo
		(cm)	
Testigo	23.00	24.40	24.93 b
HMA	25.53	28.63	33.16 ab
Inoculante Esterilizado	26.43	27.86	30.01 ab
Rpcv	29.40	27.16	31.73 ab
HMA+Rpcv	30.20	31.06	34.46 a
Inoculante Esterilizado+Rpcv	29.03	25.76	29.10 ab

Promedios con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$).

Diámetro de tallo

No se presentaron efectos en el diámetro de tallo por ninguno de los tratamientos en ninguno de los genotipos de chile evaluados (Cuadro 4.4).

Cuadro 4. 4. Diámetro de tallo a los 43 ddt en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.

Tratamientos	Pasilla	Ancho	Guajillo
		(mm)	
Testigo	3.66	4.43	4.58
HMA	4.35	4.34	4.69
Inoculante Esterilizado	4.21	4.36	4.27
Rpcv	4.49	4.75	4.29
HMA+Rpcv	4.15	4.73	4.61
Inoculante Esterilizado+Rpcv	4.32	4.05	4.05

Promedios con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$).

Número de hojas por planta

De manera general, la inoculación de microorganismos no mejoró la producción de hojas por las plantas en comparación con el testigo sin inocular. Con excepción de la doble inoculación HMA+Rpcv en el genotipo Guajillo.

En el genotipo Pasilla, sólo fue superior el tratamiento de Inoculante Esterilizado+Rpcv en comparación con el testigo. Lo que indica que la inoculación con microorganismos no mejoró el número de hojas en las plantas, como tampoco se pudo diferenciar entre los efectos de los HMA y de los nutrimentos aportados por el inoculante (Cuadro 4.5).

En el genotipo Ancho, el número de hojas que presentó el testigo fue similar al que presentaron los tratamientos inoculados. Del mismo modo, los valores fueron similares para el tratamiento con HMA y el de aplicación de Inoculante Esterilizado, lo que indica que no se pudieron diferenciar los efectos de los HMA con los de los nutrimentos aportados por el inoculante. Sólo el tratamiento con inoculación conjunta de HMA+Rpcv superó al de inoculación de Rpcv (Cuadro 4.5).

En el genotipo Guajillo, la mayoría de los tratamientos presentaron valores similares de número de hojas por planta. La inoculación conjunta de HMA+Rpcv superó al testigo sin inocular (Cuadro 4.5).

Cuadro 4. 5. Número de hojas por planta a los 43 ddt en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.

Tratamientos	Pasilla	Ancho	Guajillo
		(hojas planta ⁻¹)	
Testigo	19.6 b	30.6 ab	24.6 b
HMA	27.3 ab	34.0 ab	36.3 ab
Inoculante Esterilizado	22.3 ab	28.3 b	33.0 ab
Rpcv	27.6 ab	23.0 b	38.6 ab
HMA+Rpcv	29.0 ab	45.6 a	45.6 a
Inoculante Esterilizado+Rpcv	32.6 a	28.0 b	37.0 ab

Promedios con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$).

Número de flores por planta

La inoculación no favoreció la presencia de flores en las plantas con respecto al testigo en ninguno de los genotipos evaluados. Tampoco se pudo diferenciar entre efectos de los HMA y los nutrimentos aportados por el inoculante.

Cuadro 4. 6. Número de flores por planta a los 43 ddt en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.

Tratamientos	Pasilla	Ancho	Guajillo
	(flores planta ⁻¹)		
Testigo	2.3	6.6	5.0
HMA	6.0	6.3	10.3
Inoculante Esterilizado	4.3	3.3	5.6
Rpcv	3.0	5.6	8.6
HMA+Rpcv	7.0	6.3	8.6
Inoculante Esterilizado+Rpcv	4.6	5.6	7.6

Promedios con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$).

Variables relacionadas con los frutos

Pérdidas de peso en fruto

En referencia a la apariencia después del almacenamiento en los frutos evaluados se encontró que la inoculación con HMA mejoró características deseables. Los frutos pueden ser almacenados a 22°C durante seis días después de que son cosechados sin presentar cambios en su apariencia y color. Las características organolépticas en un fruto o una hortaliza (tamaño, color, brillantez, apariencia, aroma y sin defectos) son una condición que busca el consumidor.

En el genotipo Pasilla, el testigo superó al tratamiento inoculado con HMA. Lo anterior indica que la inoculación con HMA provocó la producción de frutos que pierden humedad a menor velocidad que los frutos no inoculados. En adición, se demostraron diferencias por la actividad de los HMA en comparación con los efectos debidos al aporte de nutrimentos por el inoculante (tratamiento Inoculante Esterilizado). En este sentido, también los frutos de plantas inoculadas con HMA pierden menos humedad que los de las plantas con Inoculante esterilizado (Cuadro 4.7).

De manera distinta, en el genotipo Ancho, el tratamiento con frutos que pierden más humedad fue el inoculado con HMA, el cual superó al testigo y al inoculado con HMA+Rpcv. También, los efectos de la actividad de los HMA se pudieron diferenciar del aporte de nutrimentos por el inoculante, ya que el tratamiento con Inoculante Esterilizado fue superado por el inoculado con HMA. También, se demostraron efectos de la inoculación conjunta de HMA+Rpcv en comparación con la inoculación de sólo los HMA, ya que el tratamiento HMA superó al tratamiento HMA+Rpcv (Cuadro 4.7).

En el genotipo Guajillo, los frutos producidos por las plantas de todos los tratamientos perdieron humedad de manera similar (Cuadro 4.7).

Cuadro 4.7. Pérdidas de peso en los frutos durante 8 días de almacenamiento después de su cosecha en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.

Tratamientos	Pasilla	Ancho	Guajillo
		(%)	
Testigo	51.82 ab	30.54 b	35.75
HMA	37.15 c	48.23 a	34.76
Inoculante Esterilizado	62.44 a	30.79 b	37.21
Rpcv	44.47 bc	32.43 ab	46.26
HMA+Rpcv	48.39 bc	24.48 b	39.80
Inoculante Esterilizado+Rpcv	43.19 bc	33.69 ab	37.15

Promedios con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$).

Color externo

En las cuatro evaluaciones realizadas (1, 4, 6 y 8 ddc) a los tratamientos y a los genotipos de chile (Pasilla, Ancho y Guajillo) con respecto al color externo obtenido en tres partes del fruto (1= cerca de la parte basal, 2= parte central, 3= cerca de la parte apical), se encontró que para el valor de “L” (Luminosidad o Claridad) del chile tipo Pasilla, el tratamiento inoculado con Rpcv presentó un aumento con respecto a los valores del Testigo (Cuadro 4.8 y 4.9). Esto indica que a medida que transcurrieron los días la maduración del fruto se incrementó presentando tonos más claros.

Característica similar mostró el genotipo Ancho, presentando tonos más claros en el tratamiento inoculado con Rpcv durante las cuatro evaluaciones realizadas. Para el chile tipo Guajillo, el tratamiento Testigo presentó valores de “L” más altos con respecto a los valores del tratamiento inoculado con Rpcv, esto indica que los frutos del Testigo maduraron más rápido. El comportamiento que tuvieron los frutos de chile en los tratamientos inoculados con HMA y HMA+Rpcv para el chile tipo Pasilla presentaron madurez más rápida que los de Inoculante Esterilizado. Para el chile tipo Ancho, se presentaron características similares al Pasilla.

Para los parámetros “a” y “b” estos mostraron similar comportamiento que el parámetro “L”, presentando valores más altos en el tratamiento Rpcv respecto a los valores del Testigo, para el genotipo Pasilla. Respecto al chile tipo Ancho, ambos parámetros “a” y “b” con valores mayores en el tratamiento Rpcv respecto al testigo. El testigo fue superado por los tratamientos HMA y HMA+Rpcv en los tres genotipos de chile. Las combinaciones de los parámetros “a” y “b” definen el Chroma (Croma) y el Hue, ello permite diferenciar el colorido y el tono del estado de madurez de los frutos de chile. Las mediciones de color en los seis tratamientos y los tres tipos de chile en general se localizaron entre valores más negativos para el parámetro “a” (-100= verde, +100= amarillo) esto refiere que el estado de madurez tiende a matices verdes (González-Cárdenas 2010). Por su parte los valores para el parámetro “b”(-100= azul, +100= rojo) se localizaron entre valores más positivos en los tratamientos Rpcv, HMA+Rpcv e Inoculante Esterilizado (Cuadros 4.8 y 4.9).

Cuadro 4. 8. Parámetros de color Ciel-Lab correspondientes al exocarpio externo de los frutos de chile obtenidos de cuatro evaluaciones (1, 4, 6 y 8 ddc) en condiciones de almacenamiento para cada uno de los tratamientos de estudio y tipos de chile. 2016.

	Tipo de chile	Evaluación	ddc	Cerca de la parte basal del fruto			Parte central del fruto			Cerca de la parte apical del fruto			
				L	a	b	L	a	b	L	a	b	
Sin Rpcv	T1	Pasilla	1a	1	24.0	-6.9	6.6	17.9	-3.9	4.4	19.8	-4.0	5.3
			2a	4	19.6	-4.9	5.7	21.2	-5.2	5.1	21.7	-4.8	4.1
			3a	6	19.8	-4.4	5.1	22.0	-6.0	5.9	22.2	-4.0	4.3
			4a	8	23.7	-6.2	6.8	20.6	-6.0	5.8	24.2	-5.9	9.2
	Ancho	1a	1	24.2	-6.1	6.6	19.4	-4.9	5.2	21.1	-2.8	2.7	
		2a	4	26.0	-7.0	6.2	20.7	-7.0	7.6	19.7	-4.4	6.5	
		3a	6	23.3	-4.5	4.4	18.3	-5.2	5.0	22.5	-3.8	4.1	
		4a	8	22.2	-5.5	6.2	19.5	-4.7	5.2	23.4	-5.3	4.8	
	Guajillo	1a	1	25.5	-8.1	10.0	24.3	-7.6	8.8	25.5	-8.5	11.2	
		2a	4	30.5	-10.0	12.8	29.2	-9.8	10.4	32.0	-9.2	11.8	
		3a	6	31.7	-6.6	11.5	25.3	-5.8	10.0	30.5	-14.6	12.5	
		4a	8	35.5	-0.6	12.5	29.0	0.7	11.4	31.5	4.4	13.1	
T2	Pasilla	1a	1	19.1	-0.3	1.5	15.3	-0.7	0.8	20.4	-1.4	0.8	
		2a	4	18.5	-2.5	4.0	17.3	-4.6	4.7	21.0	-2.2	2.3	
		3a	6	25.3	-2.8	2.2	19.7	-2.1	1.9	20.7	-5.1	3.2	
		4a	8	20.8	-3.9	3.8	23.1	-5.0	4.0	24.5	-6.8	6.0	
	Ancho	1a	1	25.4	-6.8	8.8	18.3	-4.4	5.5	26.2	-1.5	4.1	
		2a	4	28.1	-9.6	10.4	29.7	-7.6	8.7	29.4	-9.1	10.0	
		3a	6	25.3	-7.7	6.8	24.0	-8.9	8.4	24.2	-9.1	9.4	
		4a	8	27.4	-12.6	9.2	26.1	-11.7	9.2	26.0	-11.4	8.3	
	Guajillo	1a	1	31.7	-9.9	15.2	28.3	-7.7	12.0	26.4	-6.1	10.8	
		2a	4	32.3	-11.0	13.8	26.5	-9.1	12.9	33.8	-11.2	12.6	
		3a	6	33.7	-8.9	10.8	27.6	-4.0	7.7	31.8	-7.7	13.4	
		4a	8	33.9	0.8	12.7	28.1	-3.7	12.1	31.8	-6.2	12.4	
T3	Pasilla	1a	1	20.4	-3.1	5.1	20.1	-2.6	4.3	18.4	-2.5	4.2	
		2a	4	20.5	-8.8	9.0	22.4	-7.7	8.0	19.8	-8.2	8.3	
		3a	6	21.7	-6.3	7.1	21.2	-7.4	8.0	24.2	-8.0	7.4	
		4a	8	25.8	-11.8	11.2	27.1	-13.3	8.2	26.1	-10.4	8.4	
	Ancho	1a	1	23.3	-4.8	4.9	22.1	-4.3	4.5	20.0	-5.1	4.9	
		2a	4	25.3	-7.8	6.9	20.2	-9.5	7.5	22.2	-8.2	7.1	
		3a	6	22.2	-11.0	8.9	18.6	-12.5	9.5	23.1	-9.9	9.2	
		4a	8	25.5	-10.3	7.8	26.9	-10.0	7.5	25.2	-8.0	7.2	
	Guajillo	1a	1	38.0	-11.7	17.9	29.0	-9.8	12.6	26.8	-7.0	10.5	
		2a	4	34.5	-15.4	20.4	28.4	-16.2	17.2	24.1	-14.1	16.2	
		3a	6	35.1	-10.4	19.1	28.3	-8.7	15.8	29.6	-10.9	16.6	
		4a	8	38.6	-10.0	15.8	30.0	-10.2	13.5	34.2	-6.9	14.6	

Rpcv= Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal; T1= Testigo o Control, T2= HMA Sin Rpcv, T3= HMA Esterilizado Sin Rpcv, T4= Testigo + Rpcv, T5= HMA + Rpcv, T6= HMA Esterilizado + Rpcv; ddc= días después de cosecha

Cuadro 4. 9. Parámetros de color Ciel-Lab correspondientes al exocarpio externo de los frutos de chile obtenidos de cuatro evaluaciones (1, 4, 6 y 8 ddc) en condiciones de almacenamiento para cada uno de los tratamientos de estudio y tipos de chile. 2016.

Con Rpcv	Tipo de chile	Evaluación	ddc	Cerca de la parte basal del fruto			En la parte central del fruto			Cerca de la parte apical del fruto		
				L	a	b	L	a	b	L	a	b
T4	Pasilla	1a	1	22.6	-4.9	6.3	21.9	-5.6	6.9	22.0	-3.7	4.7
		2a	4	26.9	-10.5	11.1	20.7	-12.8	11.6	21.6	-10.3	10.2
		3a	6	25.5	-11.9	10.8	24.1	-13.7	11.3	21.9	-11.8	10.8
		4a	8	24.1	-10.4	9.3	25.6	-10.4	9.1	26.6	-10.1	9.3
	Ancho	1a	1	26.7	-9.2	7.8	23.2	-6.3	7.1	21.7	-5.9	6.8
		2a	4	25.4	-10.7	8.6	19.1	-12.1	11.9	26.3	-11.2	10.4
		3a	6	24.4	-11.5	11.2	20.2	-12.1	10.9	19.0	-12.5	10.4
		4a	8	28.8	-6.4	10.0	27.6	-1.5	8.8	25.2	-6.8	8.6
	Guajillo	1a	1	28.4	-7.5	9.1	23.1	-6.7	8.1	25.4	-8.2	10.1
		2a	4	29.1	-11.9	13.2	25.6	-10.7	11.7	27.1	-12.3	15.0
		3a	6	24.2	-9.0	8.9	22.5	-9.0	9.8	24.0	-10.4	8.9
		4a	8	28.7	-8.5	8.2	29.2	-6.5	6.4	30.5	-9.5	8.0
T5	Pasilla	1a	1	22.6	-3.9	5.0	19.5	-2.6	5.1	21.7	-1.0	2.9
		2a	4	22.7	-9.0	8.1	16.0	-9.8	9.0	19.9	-8.7	8.2
		3a	6	22.2	-14.3	15.1	20.7	-14.2	13.0	19.4	-16.1	13.3
		4a	8	33.4	-10.1	10.6	28.6	-9.7	12.1	31.7	-11.4	12.4
	Ancho	1a	1	26.9	-7.0	5.8	23.7	-6.5	7.0	24.0	-0.7	6.0
		2a	4	18.2	-11.9	10.5	18.2	-8.8	10.5	23.8	-6.0	6.6
		3a	6	24.9	-13.0	10.1	19.8	-15.2	12.3	18.2	-16.5	12.2
		4a	8	28.5	-8.1	6.3	26.5	-8.5	7.7	29.8	-6.8	5.8
	Guajillo	1a	1	32.4	-10.0	15.5	32.7	-11.7	16.0	29.7	-9.5	13.8
		2a	4	29.7	-2.9	13.6	23.5	-4.5	14.5	28.3	-10.0	15.6
		3a	6	34.1	-28.5	21.6	29.6	-20.5	16.4	32.0	-18.3	19.0
		4a	8	36.2	28.8	13.7	37.2	24.5	13.0	33.0	23.3	14.7
T6	Pasilla	1a	1	22.7	-4.1	5.2	21.4	-3.6	4.4	20.6	-2.4	4.4
		2a	4	24.6	-6.3	7.6	17.8	-5.2	7.4	22.7	-4.6	6.1
		3a	6	22.3	-13.3	10.2	18.7	-14.3	10.4	21.0	-13.0	10.3
		4a	8	28.4	-5.6	5.2	26.0	-5.6	5.5	30.3	-6.7	6.1
	Ancho	1a	1	25.6	-7.1	7.6	22.2	-4.4	6.6	20.9	-3.5	5.7
		2a	4	23.1	-10.7	10.5	20.9	-11.5	10.1	22.0	-11.2	10.6
		3a	6	22.6	-14.2	12.4	21.8	-14.6	12.8	20.8	-14.6	12.1
		4a	8	29.4	-6.7	6.3	26.4	-7.2	6.0	27.1	-7.7	6.5
	Guajillo	1a	1	34.0	-8.6	13.4	26.4	-7.4	11.2	29.4	-7.8	11.6
		2a	4	34.5	-15.0	16.1	26.1	-13.8	16.2	28.2	-11.0	14.1
		3a	6	34.9	-11.6	16.2	23.3	-17.6	15.3	31.1	-12.6	14.6
		4a	8	36.0	-9.1	12.7	31.4	-10.2	12.4	34.0	-6.9	10.4

Rpcv= Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal; T1= Testigo o Control, T2= HMA Sin Rpcv, T3= HMA Esterilizado Sin Rpcv, T4= Testigo + Rpcv, T5= HMA + Rpcv, T6= HMA Esterilizado + Rpcv; ddc= días después de cosecha.

VARIABLES DEL FRUTO CON PRUEBAS DESTRUCTIVAS

FIRMEZA DE LOS FRUTOS

En el genotipo Pasilla al primer día después del corte, el testigo fue superado por los tratamientos inoculados con HMA, Rcpv y la doble inoculación HMA+Rcpv. En el día 4 y en el 6 ddc, los valores fueron similares para el testigo y los tratamientos inoculados y para el día 8 el testigo superó en firmeza a los tratamientos inoculados con HMA y Rcpv. En ninguna de las fechas de evaluación se pudo diferenciar entre los efectos de los HMA en comparación con los nutrimentos que aporta el inoculante, ya que el tratamiento HMA y el tratamiento Inoculante Esterilizado presentaron valores similares (Cuadro 4.10).

En el genotipo Ancho, a los 1,4 y 8 ddc, el testigo superó al tratamiento HMA y a los 4, 6 y 8 ddc el testigo superó a los tratamientos Rcpv y HMA+Rcpv. Lo anterior indica que en estas fechas de evaluación, los tratamientos inoculados produjeron frutos más blandos que el testigo. Únicamente a los 8 ddc, se presentaron diferencias entre el tratamiento HMA y el tratamiento con Inoculante Esterilizado, lo que indica que los frutos más blandos se asociaron a la actividad de los hongos y no al aporte de nutrientes del inoculante. A los 4, 6 y 8 ddc, se observó que la asociación entre HMA+Rcpv produce frutos más firmes que la inoculación sólo de HMA (Cuadro 4.10).

En el genotipo Guajillo, sólo a los 8 ddc se presentaron frutos más blandos por efecto de la inoculación con HMA en comparación con el testigo. No se observaron efectos diferentes entre la inoculación con HMA y la adición de Inoculante Esterilizado. Del mismo modo, no se presentaron efectos aditivos por la inoculación de Rcpv junto con HMA en comparación con la inoculación sólo de HMA (Cuadro 4.10).

Cuadro 4. 10. Medias para firmeza del fruto de tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.

Genotipo	Tratamiento	Días después del corte			
		1	4	6	8
		(Newtons)			
Pasilla	Testigo	8.86 a	5.70a	3.83ab	4.96a
	HMA	5.91b	5.53a	4.50a	2.69b
	IE	5.88 b	5.97a	4.67a	3.19b
	Rpcv	5.94 b	6.80a	3.12b	3.23b
	HMA+Rpcv	4.59 b	3.84a	4.70a	4.28a
	IE+Rpcv	6.35 b	5.57a	4.18ab	3.04b
Ancho	Testigo	6.79a	8.05a	3.21b	4.06a
	HMA	3.75b	6.39b	3.40b	1.78b
	IE	6.58ab	5.52bc	3.11b	3.29a
	Rpcv	5.55ab	3.90d	4.42a	3.24a
	HMA+Rpcv	4.02ab	4.26cd	4.40a	3.33a
	IE+Rpcv	5.96ab	4.13cd	4.40a	4.31a
Guajillo	Testigo	6.89ab	5.34a	3.80a	4.40a
	HMA	7.18a	6.20a	3.89a	3.42b
	IE	6.98ab	6.04a	4.07a	3.62b
	Rpcv	5.85ab	5.09a	3.65a	4.57a
	HMA+Rpcv	4.12ab	5.98a	3.64a	3.88ab
	IE+Rpcv	6.37ab	4.44a	3.62a	3.95ab

IE= Inoculante Esterilizado. Promedios del mismo genotipo con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$).

pH del fruto

En el genotipo Pasilla, el pH de los frutos fue similar en los tratamientos inoculados en comparación con el testigo. Sólo a los 1 y 4 ddc se observó que el tratamiento inoculado con Rpcv produjo frutos más ácidos que el inoculado con HMA. Al primer día después del corte se pudo diferenciar un efecto por la actividad de los HMA en comparación con la aplicación de Inoculante Esterilizado. En este caso, los frutos de plantas inoculadas con HMA son más alcalinos que los del tratamiento con Inoculante Esterilizado. No se presentaron diferencias por la inoculación sólo de HMA en comparación de asociar HMA+Rpcv (Cuadro 4.11).

En el genotipo Ancho, la inoculación de los microorganismos no tuvo efecto en el pH de los frutos en comparación con el testigo. Sólo el tratamiento doble inoculado HMA+Rpcv produjo frutos más ácidos a los 6 ddc, en comparación con el pH de los frutos del testigo. En ninguno de los casos se observaron diferencias entre el tratamiento con HMA y el de aplicación de Inoculante Esterilizado. Sólo al primer día después del corte se observaron frutos más ácidos en el tratamiento con la doble inoculación HMA+Rpcv en comparación con la inoculación de HMA (Cuadro 4.11). Para el genotipo Guajillo, en ninguna de las fechas evaluadas se presentaron diferencias debidas a la inoculación de los microorganismos ni a la aplicación de Inoculante Esterilizado (Cuadro 4.11).

Cuadro 4. 11. pH del fruto en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.

Tipo de chile	Tratamiento	Días después del corte			
		1	4	6	8
Pasilla	Testigo	5.92 ab	5.68 ab	5.40 a	5.96 a
	HMA	6.10 a	5.85 a	5.68 a	5.53 a
	IE	5.73 b	5.71 ab	5.21 ab	6.01 a
	Rpcv	5.62 b	5.29 b	5.70 a	5.92 a
	HMA+Rpcv	5.79 ab	5.52 ab	5.30 ab	5.38 a
	IE+Rpcv	5.63 b	5.51 ab	4.66 b	5.32 a
Ancho	Testigo	5.91 ab	5.56 a	5.88 a	5.45 a
	HMA	6.25 a	5.42 a	5.42 ab	5.71 a
	IE	6.05 a	5.96 a	5.66 ab	5.25 a
	Rpcv	5.74 ab	5.76 a	5.73 ab	5.60 a
	HMA+Rpcv	5.47 b	5.72 a	5.18 b	5.27 a
	IE+Rpcv	5.89 ab	5.56 a	5.34 ab	5.65 a
Guajillo	Testigo	5.45 a	5.44 a	5.31 ab	5.36 a
	HMA	5.68 a	5.50 a	4.57 b	4.86 a
	IE	5.47 a	5.31 a	5.31 ab	5.19 a
	Rpcv	5.41 a	5.39 a	5.56 ab	5.75 a
	HMA+Rpcv	5.73 a	5.47 a	5.14 ab	5.00 a
	IE+Rpcv	5.77 a	5.50 a	6.84 a	5.42 a

IE= Inoculante Esterilizado. Promedios del mismo genotipo con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$).

Ácido cítrico

En el genotipo Pasilla, al primer día después del corte el contenido de ácido cítrico de los frutos del testigo fue superado por el de los tratamientos inoculados con HMA, Rpcv y HMA+Rpcv. A los 4 ddc, el tratamiento HMA superó al testigo. A los 6 y 8 ddc no hubo diferencias entre el testigo y los tratamientos inoculados (Cuadro 4.12). A los 1, 4 y 8 ddc, Los frutos del tratamiento HMA tuvieron mayor contenido de ácido cítrico que los del tratamiento con aplicación de Inoculante Esterilizado, lo que indica que el efecto en acumulación de este ácido se debe a la actividad de los hongos y no a los nutrimentos aportados por el inoculante. El contenido de ácido cítrico fue similar entre los tratamientos inoculados con HMA y los inoculados con HMA+Rpcv, con lo que se descarta un efecto aditivo de la co-inoculación en esta variable y en este genotipo (Cuadro 4.12).

En el genotipo Ancho, a los 1 y 8 ddc el contenido de ácido cítrico en los frutos fue mayor en el tratamiento HMA comparado con el testigo. A los 4 y 8 ddc, los frutos del tratamiento Rpcv tuvieron más ácido cítrico que los del testigo. A los 8 ddc, el contenido de ácido cítrico en los frutos del tratamiento inoculado con HMA fue mayor que el del tratamiento con aplicación del Inoculante Esterilizado, lo que indica que para esta fecha, el efecto en acumulación de este ácido se debe a la actividad de los HMA y no al aporte de nutrimentos del inoculante (Cuadro 4.12).

En el genotipo Guajillo, la inoculación con HMA+Rpcv provocó mayores contenidos de ácido cítrico en los frutos en comparación con el testigo. No hubo efectos por la inoculación de HMA ni de Rpcv sin asociar. A los 1 y 6 ddc, el tratamiento inoculado con HMA superó al de aplicación de Inoculante Esterilizado, lo que indica que en estas fechas de evaluación, los efectos observados se deben a la actividad de los HMA y no al aporte de nutrimentos por el inoculante. Sólo a los 8 ddc, se observó un beneficio de la co-inoculación HMA+Rpcv en comparación con la inoculación de HMA solos.

Cuadro 4. 12. Contenido de ácido cítrico en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.

Tipo de chile	Tratamientos	Días después del corte			
		1	4	6	8
(mg g⁻¹ de fruto fresco)					
Pasilla	Testigo	1.69d	2.80c	3.19a	2.98ab
	HMA	3.45b	2.83b	1.91a	3.31a
	IE	2.44cd	1.64c	2.13a	2.46b
	Rpcv	4.68a	2.65bc	1.92a	2.89ab
	HMA+Rpcv	2.88bc	2.17bc	3.25a	2.97ab
	IE+Rpcv	2.34cd	3.86a	1.92a	3.20a
Ancho	Testigo	2.53b	2.26b	1.91ab	1.92c
	HMA	3.79a	1.80c	2.14a	3.83a
	IE	3.65a	3.53a	1.92ab	3.24b
	Rpcv	2.40b	3.33a	1.92ab	2.89b
	HMA+Rpcv	2.01b	2.63b	1.69b	1.29d
	IE+Rpcv	2.38b	3.53a	2.34a	2.13bc
Guajillo	Testigo	2.77bc	2.44ab	2.34ab	3.41b
	HMA	3.53ab	1.55b	3.19a	2.84bc
	IE	1.80c	2.80a	1.70b	3.41b
	Rpcv	1.89c	2.16ab	3.20a	2.68c
	HMA+Rpcv	4.72a	1.53b	1.92b	4.14a
	IE+Rpcv	2.68bc	2.81a	2.56ab	3.53b

IE= Inoculante Esterilizado. Promedios del mismo genotipo con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$).

Contenido de vitamina C (ácido ascórbico)

En el genotipo Pasilla, solo a los 8 ddc se observó que el contenido de vitamina C fue mayor en los frutos del tratamiento inoculado con HMA comparado con el testigo. En ninguna fecha de evaluación el tratamiento HMA presentó valores diferentes a los del tratamiento con aplicación de Inoculante Esterilizado. De igual manera, en ninguna de las fechas se observó un efecto aditivo de la co-inoculación HMA+Rpcv en comparación con la inoculación de sólo HMA.

En el genotipo Ancho, sólo al primer día después del corte se observó que el tratamiento inoculado con HMA+Rpcv superó en contenido de ácido ascórbico al testigo. En esta misma fecha de evaluación, los frutos con menor contenido de vitamina C fueron los del tratamiento inoculado con HMA. No se presentaron diferencias en otros tratamientos en ninguna de las fechas de muestreo posteriores (Cuadro 4.13). Del mismo modo, todos los valores para todas las fechas de muestreo fueron similares en el genotipo Guajillo (Cuadro 4.13).

Cuadro 4. 13. Contenido de ácido ascórbico en el fruto en tres genotipos de chile inoculados con HMA y Rpcv.

Tipo de chile	Tratamientos	Días después del corte			
		1	4	6	8
		(mg g ⁻¹ de fruto fresco)			
Pasilla	Testigo	1.18a	1.17a	1.17a	1.16b
	HMA	1.17a	1.20a	1.25a	1.27a
	IE	1.19a	1.17a	1.22a	1.19ab
	Rpcv	1.20a	1.21a	1.22a	1.22ab
	HMA+Rpcv	1.22a	1.21a	1.24a	1.22ab
	IE+Rpcv	1.20a	1.19a	1.23a	1.26a
Ancho	Testigo	1.20b	1.21a	1.44a	1.22ab
	HMA	1.14c	1.32a	1.20a	1.28a
	IE	1.18bc	1.16a	1.19a	1.22ab
	Rpcv	1.19bc	1.18a	1.23a	1.22ab
	HMA+Rpcv	1.26a	1.19a	1.22a	1.20b
	IE+Rpcv	1.20b	1.26a	1.21a	1.23ab
Guajillo	Testigo	1.23a	1.23ab	1.21a	1.26a
	HMA	1.18a	1.15b	1.27a	1.25a
	IE	1.22a	1.21ab	1.22a	1.28a
	Rpcv	1.26a	1.22ab	1.24a	1.22a
	HMA+Rpcv	1.22a	1.29a	1.20a	1.30a
	IE+Rpcv	1.22a	1.24a	1.23a	1.26a

IE= Inoculante Esterilizado. Promedios del mismo genotipo con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$).

CONCLUSIONES

- 1.- La inoculación con HMA provocó mayor producción de frutos en Pasilla y Guajillo, frutos que pierden menos humedad en Pasilla y que pierden más humedad en Ancho; además, frutos más blandos en Pasilla y Ancho.
- 2.- La inoculación con Rpcv promovió la producción de frutos en Pasilla y Guajillo y tonos más claros en la maduración de los tres genotipos.
- 3.- La co-inoculación HMA+Rpcv fue mejor que HMA solos en altura de planta y número de hojas en Guajillo y produjo chiles más ácidos en Ancho.
- 4.- Se diferenciaron los efectos de la inoculación con HMA en comparación con el aporte de nutrimentos en el Inoculante Esterilizado en producción de frutos de los tres genotipos.

LITERATURA CITADA

1. **Ahemad**, M. 2012. Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: a review. *IIOABJ* 3:39–46.
2. **AOAC** (Association of Official Analytic Chemists). 1984. *Officialis methods of analysis*. K. Helrich (ed). 15 th Edition. Vol II. USA. 1298 p.
3. **AOAC** (Association of Official Analytic Chemists). 1990. *Officialis methods of analysis*. K. Helrich (ed). 15 th Edition. Vol II. USA. 1298 p.
4. **Arias**, R.L., L. Tung Ching, L. Logendra, H. Janes. 2000. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L, a, b, color reading of hydroponic tomato and the relationship oh maturity with color and lycopene content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1697-1702.
5. **Barman**, P., S.K. Singh, V.B. Patel, A.K. Singh, L. Nain. 2015. Synergistic interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza helper bacteria improving antioxidant activities in Troyer citrange and Cleopatra mandarin under low moisture stress. *Indian J. Hortic.* 72:1 33-37.
6. **Benhamou**, N., S. Gagné, D.L. Quéré, L. Dehbi. 2000. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Biochem. Cell Biol* 90: 45-56.
7. **Borges**, W.D.S., K.B. Borges, K.B, P.S. Bonato, S. Said, M.T. 2009. Endophytic fungi: Natural products, enzymes and biotransformation reactions. *Current Organic Chemistry* 13(12):1137–1163.
8. **Castillo**, U.F., G.A. Strobel, E.J. Ford, W.M. Hess, H. Porter, J.B. Jensen. 2002. Munumbicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* (NRRL30562) endophytic on *Kennediana griseans*. *Microbiology* 148: 2675–2685.
9. **Chanway**, C.P. 1998. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia* 50, 149-170.
10. **Fernández**, M. F. 2003. Factibilidad biológica de la micorrización “*in vitro*” de papa (*Solanum tuberosum*). Informe Científico Final. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Departamento de Agroquímica y Nutrición de Plantas. La Habana, Cuba. Pp 1-94.
11. **García-Espejel**, F. 2015. Calidad y vida anaquel del fruto de dos variedades mexicanas de fresa con altas concentraciones de CO₂. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Programa Fruticultura.

12. **Jackson** RM. y **Mason** PA. 1984. Mycorrhiza. Edward Arnold, Ltd, London. 60 pp. ISBN 0-7131-2876-3.
13. **Limsuwan**, S., E.N. Trip, T. Kouwenc, S. Piersmac, A. Hiranrat, W. Mahabusarakam. 2009. A new candidate as natural antibacterial drug from *Rhodomystomentosa*. *Phytomedicine* 16: 645-51.
14. **Lorelí**, M., E. Ortega, R. Rodés, F. Fernández. 2002. Métodos efectivo para la desinfección total de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA): Aislamiento y caracterización de Bacterias endospóricas en *Glomus clarum*. *Cultivos Tropicales*. 23 (1): 21-24.
15. **Macías-Rubalcava**, M., B. Hernández-Bautista, F. Oropeza, G. Duarte, M. González, A. Glenn. 2010. Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodoryucatanensis*; a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *Journal of Chemical Ecology*, 36 (10): 1122–1131.
16. **McGuire**, R.G.1992. Reporting of objective color measurements. *Hortscience* 27: 1254-1255.
17. **Pérez**, C. A. y A. L. Chamorro. 2013. Bacterias endófitas: Un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Revista Colombiana Ciencia Animal*. Vol. 5. No. 2: 439-462.
18. **Perrin**, R. 1991. Mycorrhizes et protection phytosanitaire. In *Les mycorrhizes des arbres et plantes cultives*. Ed. Strullu D G, pp 93-13(1. Lavoisier, Paris, France.
19. **Rai**, M.K. 2001. Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In vitro*. *Cell. Dev. Biol. Plant*. 37: 158-167.
20. **Rueda-Puente**, E.O, B. Murillo-Amador, T. Castellanos-Cervantes, J.L. García-Hernández, M.A. Tarazón-Herrera, S. Moreno-Medina, L.E. Gerlach-Barrera. 2010. Effects of plant growth promoting bacteria and mycorrhizal on *Capsicum annum* L. var. aviculare ([Diebarch] D’Arcy and Esbaugh) germination under stressing abiotic conditions. *Plant Physiol. Biochem*. 48 (8): 724-730.
21. **Stone**, J.K., C.W. Bacon, J.R. White. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined [J]. In: Bacon CW, White Jr JF, editors. *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker; p.3-29.
22. **Wang**, Y., C.C. Dai. 2011. Endophytes: A potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology*, 61(2): 207–215.