

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Azospirillum* sp.
INOCULADO EN EL CULTIVO DE CHILE JALAPEÑO (*Capsicum
annuum* L. HÍBRIDO “GRANDE”)**

GLORIA LAURA NUNCIO ORTA

TESIS

**Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN HORTICULTURA**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

Saltillo, Coahuila, México. Diciembre del 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Azospirillum* sp. INOCULADO EN
EL CULTIVO DE CHILE JALAPEÑO (*Capsicum annuum* L. HÍBRIDO
“GRANDE”)**

POR

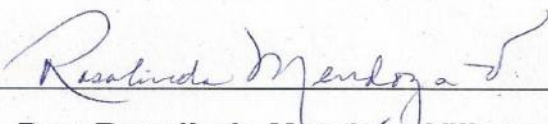
GLORIA LAURA NUNCIO ORTA

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada
como requisito parcial, para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN HORTICULTURA

COMITÉ PARTICULAR


Asesor principal:

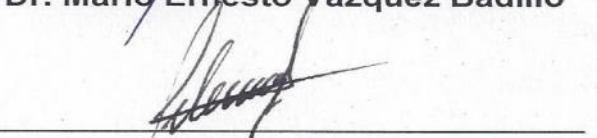

Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Asesor:


Dr. Valentín Robledo Torres

Asesor:


Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo


Dr. Fernando Ruiz Zárate
Subdirector de Postgrado

Saltillo, Coahuila, México. Diciembre del 2013

AGRADECIMIENTOS

A mi **ALMA TERRA MATER** que me abrió las puertas para emprender una trayectoria de conocimientos para superarme en aspectos profesionales y personales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**).

A la Dra. **Rosalinda Mendoza Villarreal** por su tiempo, asesoría y amistad durante la realización de este trabajo.

Al Dr. **Valentín Robledo Torres** por su asesoramiento y amistad durante la realización del trabajo.

Al Dr. **Mario Ernesto Vázquez Badillo** por sus consejos, asesoría y amistad durante la realización del trabajo.

Al M.C. **Víctor Martínez Cueto** por su apoyo en la realización de este trabajo.

A la T.L.Q. **Martha Patricia Herrera Gaytán** por su apoyo en la realización de análisis de laboratorio.

Al T.L.Q. **Carlos Alberto Arévalo Sanmiguel** por su apoyo en la realización de análisis de laboratorio.

A la T.A. **Martina De la Cruz Casillas** por su amistad y apoyo en la realización de este trabajo.

A la T.L.Q. **Laura María Duron Ochoa** por su amistad y apoyo en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con profundo amor y respeto a mis padres **Roberto Alejandro Nuncio Yáñez** y **Gloria María Orta Jaques**, quienes durante mi crecimiento me brindaron amor y enseñaron valores, lo cual me ha permitido alcanzar grandes logros.

A mi hermano **Alejandro Nuncio Orta** quien me apoyo en la realización de este trabajo y quiero mucho.

A mi abuelita, **María del Socorro Yáñez Santos** quien me aconseja y quiero mucho.

Al **Ing. Jesús Pérez Morales** por su gran compañía y apoyo en parte de este trabajo.

A todas las personas que conocí durante el transcurso del trabajo y que de alguna manera colaboraron con mi superación profesional y personal.

COMPENDIO

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Azospirillum* sp. INOCULADO EN EL CULTIVO DE CHILE JALAPEÑO (*Capsicum annuum* L. HÍBRIDO “GRANDE”)

POR

GLORIA LAURA NUNCIO ORTA

MAESTRÍA EN CIENCIAS

EN HORTICULTURA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

Saltillo, Coahuila, México. Diciembre de 2013

Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal – Asesora-

Palabras clave: rizobacterias, biofertilizante, BPCV, caracteres agronómicos.

El objetivo del estudio fue aislar y caracterizar cepas rizosféricas de *Azospirillum* sp. para evaluar su potencial biofertilizante en plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”). La investigación se realizó en dos etapas durante 2011 – 2013. Se aislaron rizobacterias de *Azospirillum* de plantas de chile, nopal y tomate, las bacterias se identificaron a nivel de género

mediante la tinción Gram y características morfológicas. Durante la etapa de aislamientos, se encontraron cepas de *Acetobacter* y *Azotobacter* sp., éstas también fueron caracterizadas e incluidas en las posteriores evaluaciones. Por lo que, las seis cepas de *Azospirillum*, cuatro de *Acetobacter* y dos de *Azotobacter* sp. fueron evaluadas en una prueba de germinación y vigor en condiciones *in vitro*, cada cepa fue inoculada con tres concentraciones de inóculo 10^4 , 10^6 y 10^8 UFC mL⁻¹ en semillas de chile jalapeño, añadiendo un testigo sin inóculo, el cual presentó agua destilada. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 2 factores A) cepas y B) concentración de inóculo aplicando la prueba de comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$). Los resultados sobresalientes en esta primer etapa fueron por parte de la cepa *Azospirillum* sp. (AzGT1) aislada de la rizósfera de tomate la cual promovió 24% la germinación con las concentraciones de inóculo 10^4 y 10^6 UFC mL⁻¹. La ganancia de biomasa fresca y seca de plántulas fue estimulada con la dosis 10^8 UFC mL⁻¹ de la cepa *Azospirillum* sp. (AzTT2) de tomate y la longitud radicular se incrementó 36% al inocular la cepa AzTCH3 aislada de plantas de chile con la concentración 10^6 UFC mL⁻¹.

En base a los mejores resultados, durante la segunda etapa se seleccionaron dos cepas de *Azospirillum* (AzGT1 y AzTCH3), una de *Acetobacter* (AceGN2) y se incluyó la cepa *Azospirillum* (AzSTC-5) aislada de raíces de trigo (Mendoza, 2009), éstas cepas fueron caracterizadas por medio de la actividad reductora de acetileno, producción de ácido indolacético y solubilización de fósforo. Los resultados mostraron una alta producción de ácido

indolacético (AIA) por parte de las cepas *Azospirillum* (AzGT1 y AzTCH3) y la *Acetobacter* (AceGN2) con 59.78, 84.14 y 181.76 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. La actividad reductora de acetileno fue baja menor a los 10 nmoles de etileno. Con respecto a la solubilización de fósforo la cepa incluida de *Azospirillum* (AzSTC-5) presentó una cantidad elevada de 277.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fosfato soluble.

Posterior a esto las cepas fueron inoculadas en plantas de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero. Cada cepa fue inoculada con dos concentraciones de inóculo 10^6 y 10^4 UFC mL^{-1} y se añadió un testigo sin inóculo, se utilizó sustrato de perlita y peat moss (1:1). Para los riegos de las plantas inoculadas se usó la solución nutritiva Steiner modificada con el 20% de nitrógeno y para el tratamiento testigo la solución Steiner fue completa. El diseño experimental utilizado fue el de bloques completamente al azar y una prueba de comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$). La respuesta de la inoculación en plantas fue positiva por parte de todas las cepas, pero la mejor fue *Azospirillum* (AzSTC-5) debido a que incrementó el peso seco aéreo 43 % más que el testigo al ser inoculada con 10^6 UFC mL^{-1} , AzSTC-5 también incrementó la longitud de raíz con 47% mayor que el testigo. Esta cepa AzSTC-5 tiene potencial sustituir parcialmente la fertilización nitrogenada y promover el crecimiento y desarrollo de plantas de chile jalapeño.

ABSTRACT

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Azospirillum* sp. INOCULATED
IN THE JALAPENO CHILLI CROP (*Capsicum annuum* L. HYBRID "GREAT")**

BY

GLORIA LAURA NUNCIO ORTA

MASTER IN SCIENCE

IN HORTICULTURE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

Saltillo, Coahuila, México. December 2013

Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal – Adviser-

Key words: rhizobacterias, biofertilizer, BPCV, agronomic characters.

The aim of the study was to isolate and characterize strains rhizospheric of *Azospirillum* to evaluate their potential biofertilizer in jalapeno chilli plants (*Capsicum annuum* L. Hybrid "Great"). The research was conducted in two stages during 2011 to 2013. The *Azospirillum* rhizobacterias were isolated of chilli plants, prickly pear and tomato were identified to genus level by Gram

staining and morphological characteristics. During the isolates, strains of *Acetobacter* and *Azotobacter* sp. were found they were also characterized and included in subsequent evaluations. Therefore, the six strains of *Azospirillum*, four *Acetobacter* and two of *Azotobacter* sp. were evaluated in a test of germination and vigor under in vitro conditions, each strain was inoculated with three concentrations inoculum 10^4 , 10^6 and 10^8 CFU mL⁻¹ in jalapeño seeds, adding a control without inoculum, which presented distilled water. The experimental design was completely randomized with two factors A) and B (strains) inoculum concentration, applying the test of comparison Tukey means ($P \leq 0.05$). The outstanding results in this first stage were by the strain *Azospirillum* sp. (AzGT1) isolated tomato rhizosphere which promoted germination with 24 % inoculum concentrations 10^4 and 10^6 CFU mL⁻¹. The gain of fresh and dry biomass of seedlings by was stimulated dose 10^8 UFC mL⁻¹ of strain *Azospirillum* sp. (AzTT2) tomato and root length increased 36% with the inoculum 10^6 CFU mL⁻¹ of strain AzTCH3 isolated of chile.

On the basis of these results, during the second stage two strains of *Azospirillum* (AzGT1 and AzTCH3), one of *Acetobacter* (AceGN2) and was included isolated *Azospirillum* strain (AzSTC-5) of roots of wheat (Mendoza, 2009), these strains were characterized by the acetylene reduction activity, indoleacetic acid production and solubilization of phosphorus. The results showed a high production of indole acetic acid (IAA) by the *Azospirillum* strains (AzGT1 and AzTCH3) and *Acetobacter* (AceGN2) with 59.78, 84.14 and 181.76 mg mL⁻¹ respectively. The acetylene reduction activity was low less than 10 nmol of ethylene. With respect at phosphorus solubilization the *Azospirillum*

strain included (AzSTC-5) had high amount of 277.22 mg mL⁻¹ of soluble phosphate.

After this it, the strains were inoculated in jalapeno chilli plants under greenhouse conditions. Each strain was inoculated with two inoculum concentrations of 10⁶ and 10⁴ CFU mL⁻¹ was added a control without inoculum, was used as a substrate perlite and peat moss (1:1). To the risks of inoculated plants was applied modified Steiner nutrient solution with 20 % nitrogen and to the control treatment was used complete the Steiner solution. The experimental design was block completely randomized and comparison of means test Tukey ($P \leq 0.05$). The response of plant inoculation was positive from all strains, but the best was *Azospirillum* (AzSTC -5) because the aerial dry weight increased 43 % over the control to inoculate with 10⁶ CFU ml⁻¹, AzSTC-5 also increased root length 47 % greater than the control. This strain AzSTC-5 has potential for partially replace nitrogen fertilization and promote the growth and development of jalapeno chilli plants.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo General.....	4
Objetivo Específico.....	4
Hipótesis.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 <i>Azospirillum</i>	6
2.2 Aislamiento.....	7
2.3 Identificación.....	7
2.4 Distribución.....	7
2.5 Mecanismos de colonización.....	8
2.6 <i>Azospirillum</i> como bacteria promotora de crecimiento vegetal	9
2.7 Interacción <i>Azospirillum</i> – planta.....	10
2.8 Aspectos generales del cultivo de chile jalapeño....	12
III. ARTÍCULO 1: INFLUENCIA DE RIZOBACTERIAS EN LA GERMINACIÓN Y VIGOR DE SEMILLAS DE CHILE JALAPEÑO (<i>Capsicum annuum</i> L. Híbrido “Grande”).....	14
IV. ARTÍCULO 2: EFECTO DE CEPAS NATIVAS COMO BIOFERTILIZANTES EN CARACTERES AGRONÓMICOS DE CHILE JALAPEÑO (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	43
V. CONCLUSIONES GENERALES.....	71
VI. LITERATURA CITADA.....	73

ÍNDICE DE CUADROS

ARTÍCULO 1

	PÁGINA
CUADRO 1. Descripción de cepas nativas de <i>Azospirillum</i> , <i>Acetobacter</i> y <i>Azotobacter</i> sp, aisladas en tres localidades del Estado de Coahuila.....	22
CUADRO 2. Prueba de comparación de medias de la actividad reductora de acetileno (ARA) y producción de ácido indolacético (AIA) de las rizobacterias en estudio.....	26
CUADRO 3. Efecto de la interacción de cepas y concentración de inóculo en el porcentaje de germinación de semillas de chile jalapeño (<i>Capsicum annuum</i> L. Híbrido “Grande”).....	28
CUADRO 4. Efecto de la interacción de cepas y concentración de inóculo en el peso fresco de plántulas de chile jalapeño (<i>Capsicum annuum</i> L. Híbrido “Grande”).....	30
CUADRO 5. Efecto de la interacción de cepas y concentración de inóculo en el peso seco de plántulas de chile jalapeño (<i>Capsicum annuum</i> L. Híbrido “Grande”).....	32
CUADRO 6. Efecto de la interacción de las cepas y concentración de inóculo en la variable longitud de raíz de plántulas de chile jalapeño (<i>Capsicum annuum</i> L. Híbrido “Grande”).....	34
CUADRO 7. Efecto de la interacción de cepas y concentración de inóculo en la variable longitud de tallo de plántulas de chile jalapeño (<i>Capsicum annuum</i> L. Híbrido “Grande”).....	35
CUADRO 8. Efecto de la interacción de cepas y concentración de inóculo en la variable longitud de hoja de plántulas de chile jalapeño (<i>Capsicum annuum</i> L. Híbrido “Grande”).....	36

ÍNDICE DE CUADROS

ARTÍCULO 2

	PÁGINA
CUADRO 1. Descripción de cepas nativas aisladas.....	51
CUADRO 2. Solución Steiner aplicada durante el experimento.....	54
CUADRO 3. Propiedades químicas y físicas del suelo donde fueron extraídas las rizobacterias en estudio.....	55
CUADRO 4. Unidades formadoras de colonias de cepas <i>Azospirillum</i> y <i>Acetobacter</i>	55
CUADRO 5. Características morfológicas de cepas nativas aisladas.....	56
CUADRO 6. Respuesta del peso fresco y seco de plantas de chile jalapeño inoculadas con cepas de <i>Azospirillum</i> y <i>Acetobacter</i> sp. a diferentes concentraciones de inóculo durante los tres muestreos.....	58
CUADRO 7. Respuesta del Peso fresco y seco de Raíz en plantas de chile jalapeño inoculadas con cepas de <i>Azospirillum</i> y <i>Acetobacter</i> sp. a diferentes concentraciones de inóculo durante los tres muestreos.....	59
CUADRO 8. Respuesta de la longitud de raíz de plantas de chile inoculadas con cepas de <i>Azospirillum</i> y <i>Acetobacter</i> sp. a diferentes concentraciones de inóculo durante los tres muestreos.....	60
CUADRO 9. Caracterización de cepas en estudio aisladas de tomate, chile, trigo y nopal.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

ARTÍCULO 2

	PÁGINA
FIGURA 1. Peso fresco de frutos de chile jalapeño en plantas inoculadas con rizobacterias <i>Azospirillum</i> y <i>Acetobacter</i> a diferente concentración de inóculo.....	61
FIGURA 2. Peso seco de frutos de chile jalapeño en plantas inoculadas con rizobacterias <i>Azospirillum</i> y <i>Acetobacter</i> a diferente concentración de inóculo.....	62
FIGURA 3. Peso de frutos de plantas inoculadas con rizobacterias <i>Azospirillum</i> y <i>Acetobacter</i> a diferente concentración de inóculo.....	63

I. INTRODUCCIÓN

Según FAOSTAT (2012) la producción mundial de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) está dominada por el país de China, sin embargo México es considerado centro de origen y domesticación del cultivo, debido a que presenta gran variabilidad de formas cultivadas y silvestres. Además presenta un alto consumo y demanda de mano de obra, siendo así un cultivo con gran importancia socioeconómica (Macías *et al.*, 2012).

Los requerimientos para elevar la producción y rendimiento del cultivo radican en gran medida en el uso de plántulas vigorosas y con un alto porcentaje de germinación (Carballo, 1992). Esto podría conseguirse mediante la inoculación con biofertilizantes hechos a base de microorganismos que promuevan el crecimiento y desarrollo vegetal (Luna *et al.*, 2013). La función de los inoculantes en las plantas radica en cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos en la célula vegetal, lo cual incrementa el potencial de crecimiento de las plantas (Shigueru *et al.*, 2013).

En varios estudios de biofertilización en plantas se han utilizado microorganismos como *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Acetobacter*, porque son consideradas Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV), llamadas

así por beneficiar el crecimiento y desarrollo de plantas (Moreno & Galvis, 2013) mediante la fijación biológica de nitrógeno (Camelo *et al.*, 2011), producción de fitohormonas (Tsavkelova *et al.*, 2006) y facilitar la disponibilidad y absorción de nutrientes en plantas (Richardson *et al.*, 2009).

Desde hace varios años se mencionan experimentos de biofertilización utilizando estas bacterias y además las óptimas dosis de inóculo aplicados en plantas oscilan entre 10^4 a 10^8 UFC mL⁻¹ en el desarrollo aéreo y radicular para el cultivo de sorgo (Hernández *et al.*, 1996). Canto *et al.* (2004) encontraron incrementos significativos en el peso seco aéreo y radical cuando se han inoculado plantas de chile habanero con 10^7 UFC mL⁻¹ de *Azospirillum*. Plantas de trigo inoculadas con *Azospirillum* presentaron cambios morfológicos en raíz debido a la producción de ácido indolacético por la bacteria (Spaepen *et al.*, 2008). La fijación biológica de nitrógeno por *Azospirillum* spp. aisladas de maíz es alta con actividad nitrogenasa de 8 a 70 nmoles de etileno en condiciones *in vitro* (Carcaño *et al.*, 2006). *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum* solubilizan fósforo tricálcico en condiciones *in vitro* mediante la liberación de ácido glucónico (Rodríguez *et al.*, 2004).

Azotobacter además de fijar nitrógeno presentan un rápido crecimiento bacteriano (Kokusnan *et al.*, 2013). También secreta sustancias biológicamente activas que aceleran el crecimiento y desarrollo de las plantas (Pogorelova *et al.*, 2012) y la producción de ácido indolacético, puede ser de 7 a 58 µg/mg⁻¹ (Escobar *et al.*, 2011). Al ser inoculada en plántulas de pasto con la

concentración de 1×10^6 UFC mL⁻¹ incrementó la longitud de tallo (Lara *et al.*, 2011).

Por su parte, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* perteneciente a las *Acetobacter* libera hasta un 50% de nitrógeno transformado a través de la fijación biológica (Cojho *et al.*, 1993). Suman *et al.* (2005) mencionan que *Gluconoacetobacter diazotrophicus* produce fitohormonas y tiene efecto positivo en la germinación y el crecimiento en plantas de caña de azúcar. Además Madhaiyan *et al.* (2004) mencionan que *G. diazotrophicus* es eficaz para solubilizar fósforo en condiciones *in vitro* mediante el ácido acético.

De acuerdo con lo anterior, la biofertilización en plantas con estas bacterias puede promover el crecimiento y desarrollo vegetal (Luna *et al.*, 2013), además, mediante la fijación biológica de nitrógeno logra reducir el uso de fertilizantes químicos y la contaminación ambiental (Shankar *et al.*, 2011). Por lo tanto, el estudio tuvo como objetivo aislar bacterias nativas de la rizósfera de nopal, tomate y chile para evaluar su efecto biofertilizante en plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”) debido a que es un cultivo agrónomicamente importante y que demanda gran cantidad de nutrientes, principalmente nitrógeno (De Grazia *et al.*, 2006).

Objetivo General:

Aislar y caracterizar cepas rizosféricas de *Azospirillum* sp. para evaluar su potencial biofertilizante en plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido "Grande").

Objetivos Específicos:

1. Aislar y caracterizar cepas *Azospirillum* sp. para evaluar su fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas y solubilización de fósforo.
2. Inocular semillas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido "Grande"). con las cepas *Azospirillum* sp. a diferentes concentraciones de inóculo.
3. Inocular plántulas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido "Grande") con cepas *Azospirillum* sp. a diferentes concentraciones de inóculo.

Hipótesis:

1. Las cepas *Azospirillum* sp. serán fijadoras de nitrógeno atmosférico, solubilizadoras de fósforo y producirán fitohormonas.

2. Las cepas *Azospirillum* sp. incrementarán la germinación y vigor en semillas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”).

3. Las cepas *Azospirillum* sp. inoculadas en plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”) incrementarán su crecimiento, desarrollo y rendimiento.

I. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Azospirillum*

Azospirillum es un género de bacterias presentes en la rizósfera del suelo en forma de vida libre o asociadas a raíces de plantas (Krieg y Döbereiner, 1984) con gran capacidad para mejorar el crecimiento y desarrollo vegetal mediante la fijación de nitrógeno atmosférico, síntesis de fitohormonas y vitaminas, inhibición de la síntesis de etileno, aumento de la resistencia a estrés, mejorar la absorción de nutrientes y solubilización de fósforo inorgánico (Dobbelaere *et al.*, 2003), además también protege a las plantas de patógenos del suelo mediante la producción de sideróforos, quitinasas, glucanasas y antibiosis (Shigueru *et al.*, 2013). Debido a estas propiedades, *Azospirillum* forma parte del grupo de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) (Kapulnik *et al.*, 1985). Beijerinck en 1925 descubrió la primera bacteria nombrada *Spirillum lipoferum* y en la actualidad se conocen siete especies: *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense* y *A. largimobile* *A. doebereineriae* (Eckert *et al.*, 2001).

2.2 Aislamiento

Diversos estudios hablan sobre el aislamiento de *Azospirillum* a partir del suelo y raíces de plantas hospederas como por ejemplo, gramíneas (Pedraza y Díaz, 2000), plátano, yuca y algodón (Lara *et al.*, 2011). El medio de cultivo para su aislamiento es NFb (medio libre de nitrógeno) con malato como fuente de carbono (Döbereiner *et al.*, 1976) y el cultivo bacteriano puro es obtenido mediante el uso del colorante Rojo Congo (Rodríguez, 1982).

2.3 Identificación

Azospirillum pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias, con forma de vibroide, pleomorfismo y movilidad en espiral (Döbereiner, 1992). Presentan granulos intercelulares de poli - β - hidroxibutirato, posee un flagelo polar y pertenece al grupo de bacterias Gram negativas y Gram variables (Tarrand *et al.*, 1978). Al ser vistas en el microscopio presentan forma de bacilos ligeramente curvados, con 1 μm de diámetro celular, móviles, además son microaerófilas y crecen en pH de 6.8 a 7.8 (Madigan, *et al.*, 1999).

2.4 Distribución

Azospirillum presenta una amplia distribución geográfica, a pesar de ser más abundante en regiones tropicales, también se encuentra en regiones desérticas, frías y templadas (Dobereiner *et al.*, 1976). También la presencia de *Azospirillum* depende en gran medida del pH del suelo, por ejemplo, las especies de *A. brasilense* y *A. lipoferum* se encuentran en suelos con pH cercanos a la neutralidad, aún cuando el pH se encuentra por debajo de 5 se

encuentran en forma esporádica, pero en pH menor de 4.5 no se logra encontrar presencia (Döbereiner *et al.*, 1976. Döbereiner, 1978. New *et al.*, 1989). En suelos, *Azospirillum brasilense* es beneficiada en su sobrevivencia por factores abióticos como porcentaje de arcilla, materia orgánica, capacidad de retención de agua y contenido de nitrógeno (Bashan *et al.*, 1995), pero la alta concentración de carbonatos de calcio afecta negativamente su sobrevivencia.

2.5 Mecanismo de colonización en raíces

Azospirillum presenta un flagelo polar para desplazarse en medios líquidos, mediante el cual migra hacia las raíces y se adhiere a la superficie radicular para colonizar la parte interna o externa de raíz. Pero en condiciones de medios sólidos induce la expresión de múltiples flagelos laterales (Moens *et al.*, 1995).

El proceso de colonización por *Azospirillum* depende en gran medida de la "quimiotaxis", lo cual es denominado como la atracción entre estas bacterias con las raíces de plantas a través de los exudados radiculares. Entre estos exudados se encuentran compuestos como malato, succinato y fructosa (Alexandre y Zhulin, 2001). La colonización radical es una condición para que las bacterias fijadoras de nitrógeno interactúen con las plantas (Kim *et al.* 2005).

2.6 *Azospirillum* como bacteria promotora de crecimiento vegetal

Azospirillum tiene la capacidad de sintetizar ácido indolacético (AIA) a través de la vía del ácido indol-3-pirúvico (IPA) (Patten y Glick, 1996). La producción de AIA promueve el crecimiento de raíces mediante la alteración morfológica. *Azospirillum brasilense* cuenta con un gen llamado ipdC que codifica una enzima clave en la vía IPA de la síntesis de ácido indolacético (Dobbelaere *et al.*, 1999). La técnica colorimétrica Salkowski permite detectar la presencia de ácido indolacético (AIA) en un rango de 5 a 200 (MU Mg / ml) (Glickmann and Dessaux, 1995).

Como ya se había mencionado antes *Azospirillum* es fijadora de nitrógeno molecular, lo cual podría sustituir parcialmente el uso de fertilizantes químicos en la agricultura. El ensayo *in vitro* para medir la fijación biológica de nitrógeno en bacterias es la actividad reductora de acetileno (ARA) establecida por Hardy *et al.* (1973).

Otro mecanismo para contribuir con el crecimiento y desarrollo vegetal es la solubilización de fósforo mediante la producción de ácidos orgánicos por bacterias *Azospirillum* (Paredes y Espinosa, 2009). Rodríguez *et al.* (2004) realizaron el primer estudio *in vitro* para evaluar los ácidos orgánicos producidos por *A. brasilense* y *A. lipoferum*, lo cual demostró la producción del ácido glucónico y la acidificación del pH del medio de cultivo, esto indujo a la solubilización del fósforo tricálcico.

Para evaluar el potencial de *Azospirillum* como bacteria promotora de crecimiento vegetal se han hecho diversos estudios. Por su parte, Lara *et al.* (2011) determinaron la secreción de ácido indolacético (AIA) en bacterias *Azospirillum* mediante la técnica colorimétrica con el reactivo de Salkowski, las cuales producen AIA en un rango de 3 a 45 ppm. Mascarua *et al.* (1988) obtuvieron una producción de 36.5 a 77 ppm de ácido indolacético y una reducción de acetileno de 25 a 49,6 nmol / h·mL en cepas identificadas como *Azospirillum brasilense* aislada de raíces de *Stenocereus*. Además, Carcaño *et al.* (2006) aislaron cepas *Azospirillum* de plantas de maíz y teocintle, éstas presentaron una actividad de la enzima nitrogenasa mayor a los 10 nanomoles de etileno (C_2H_2 h mL⁻¹). Por otro lado, cepas *Azospirillum* aisladas de raíces de arroz en agar Rojo Congo presentaron una producción de 2.69 a 38.02 ppm de AIA y 7.95 – 29.09 ppm de nitrógeno fijado (García *et al.*, 2010). También, Obando *et al.* (2010) asilaron cepas de raíces de eucalipto, las cuales producen ácido indolacético entre valores de 20 – 0 mg/mL para el caso de *Azospirillum brasilense* y valores de 16 a 32 mg/mL por parte de *Azospirillum lipoferum*.

2.7 Interacción *Azospirillum* – planta

Azospirillum ha sido usada en numerosos estudios agronómicos por sus propiedades anteriormente mencionadas (Dobbeleare *et al.*, 2001). Como por ejemplo, *Azospirillum* aislada de maíz Chalqueño produjo mayor tejido de raíz en las plantas inoculadas de la misma especie, lo cual quiere decir que la cepa en estudio presentó un alto grado de afinidad al ser reinoculada en la misma planta donde fue extraída (Rangel *et al.*, 2011).

Así también, la inoculación de *Azospirillum* con la concentración de 10^6 UFC mL⁻¹ en semillas de trigo produjo un aumento en el porcentaje de germinación y longitud de plúmula (Rojas *et al.*, 2008). También se han hecho estudios de inoculación en cultivos como arroz, caña de azúcar, maíz, trigo y *Brachiaria* spp. obteniendo como resultado la reducción de fertilizante químico nitrogenado (Shigueru *et al.*, 2013).

Por otro lado, se evaluó el efecto de *Azospirillum brasilense* el cultivo de trigo con diferente dosis de nitrógeno, para lo cual, los tratamientos inoculados con la bacteria mejoraron la fijación de nitrógeno en la planta, además de disminuir la cantidad de fertilizante aplicado (Piccinin *et al.*, 2013). Además, *Azospirillum* aislado de raíces de pasto fue inoculada en semillas de chile habanero, los resultados fueron positivos debido a que la inoculación aceleró la germinación y con respecto a las concentración de inóculo las mejores fueron las de 3×10^7 UFC mL⁻¹ y 1×10^7 UFC mL⁻¹ debido a que tuvieron mayor efecto en el peso seco aéreo radicular y en el número de raíces de plantas.

Dobbelaere *et al.* (1999) indicaron que la inoculación de la especie de *Azospirillum brasilense* en semillas produce incrementos en el desarrollo y la morfología de raíces utilizando bajas concentraciones de inóculo como 10^6 UFC mL⁻¹ sin embargo, Molina *et al.* (2009) inocularon semillas de tomate Cherry con una concentración de 10^9 UFC mL⁻¹ lo cual aumentó la germinación y contenido de materia seca en plántulas, además ellos sugieren la mezcla de diferentes cepas de *Azospirillum* para la inoculación en semillas.

Por otro lado, en plantas de caña se inocularon cepas de *Azospirillum* y *Gluconacetobacter* sp. lo cual indujo la multiplicación y elongación de brotes en plantas (Anand *et al.*, 2004). *Azospirillum* sp. inoculado en semillas de trigo, cebada y avena con 32 kg de N/ha los aumento significativamente el rendimiento en grano de cebada, además de sustituir parcialmente la fertilización nitrogenada (Dalla *et al.*, 2008).

Así también, bajo condiciones de invernadero se inoculó *Azospirillum brasiliense* y *A. irakense* en plantas de trigo y maíz con diferentes concentraciones de inóculo. Los mejores resultados obtenidos fueron con las concentraciones de 10^5 y 10^6 UFC/planta¹, lo cual estimuló el desarrollo radicular, peso seco de plantas, en cambio las concentraciones de inóculo de 10^7 y 10^8 UFC/planta⁻¹ no tuvieron efecto positivo, incluso inhibieron el desarrollo vegetal (Dobbelaere *et al.*, 2002). La inoculación de *Azospirillum* con 10^7 UFC mL⁻¹ en pasto guinea incrementó su peso radical (Hernández *et al.*, 1996).

2.8 Aspectos generales e importancia del cultivo de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.)

El chile (*Capsicum* spp.) se desarrolla en las regiones templadas y cálidas del mundo (Nuez *et al.*, 2003). La mayoría de las especies del género *Capsicum* son originarias de América del Sur. Sin embargo, México es el país que presenta una mayor variedad de chiles silvestres y cultivados (López –

Riquelme, 2003). En nuestro país existen 22 variedades chile, entre las cuales el cultivo de chile jalapeño es el más destacado, ocupando una superficie aproximada de 29,495 hectáreas, con una producción de 772,889 toneladas (SIAP – SAGARPA, 2012).

El fruto de chile forma parte de la dieta nutricional en el humano, debido a que en promedio 148 gramos de frutos aportan 30 calorías, 7 gramos de carbohidratos, 2 gramos de fibra, 4 gramos de azúcar, 1 gramo de proteína y 8 % de vitamina A, además de 180% de vitamina C y 2 % de calcio y hierro (Bosland y Votava, 2000).

El rendimiento del cultivo de chile depende del incremento y acumulación de biomasa en los órganos principales, además de un eficiente transporte de fotoasimilados en el sistema fuente – demanda. Por su parte, la distribución de la materia seca en la planta tiene como objetivo incrementar la producción del cultivo (Peil y Gálvez, 2005).

El incremento en la producción de *Capsicum* en el país es de gran importancia para la economía, la generación de empleo y el valor al país como principal centro de origen del cultivo, las condiciones para llevar a cabo esto, involucran factores entrelazados como lo es el clima, las características del suelo, dosis de fertilización, el agua disponible, además de prácticas agrícolas óptimas, el uso de infraestructura y tecnología como lo son los invernaderos de alta tecnología (SIAP, 2010) y actualmente el uso de biofertilizantes orgánicos elaborados con bacterias (Armenta *et al.*, 2010).

III. ARTÍCULO 1

**INFLUENCIA DE RIZOBACTERIAS EN LA GERMINACIÓN Y VIGOR DE
SEMILLAS DE CHILE JALAPEÑO (*Capsicum annuum* L. HÍBRIDO
“GRANDE”)**

INFLUENCIA DE RIZOBACTERIAS EN LA GERMINACIÓN Y VIGOR DE SEMILLAS DE CHILE JALAPEÑO (*Capsicum annuum* L. HÍBRIDO “GRANDE”)

Influence of Rhizobacteria on Seeds Germination and Vigor of Seeds

Jalapeno Chilli (*Capsicum annuum* L. Hybrid “Great”)

G. Nuncio - Orta*, R. Mendoza - Villarreal*,¹ V. Robledo - Torres*, M. Vázquez - Badillo*, J.J. Almaraz – Suárez**

* Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro #1923, Colonia Buenavista, C.P. 25315. Saltillo, Coahuila, México.

** Programa de Edafología. Colegio de Posgraduados. Carretera México – Texcoco km 36.5. Montecillo, C.P. 56230. Texcoco, Estado de México.

¹Autor para correspondencia: rosalindamendoza@hotmail.com

RESUMEN

Se aislaron cepas de *Azospirillum*, *Acetobacter* y *Azotobacter* sp., presentes en raíces de nopal, tomate y chile, las cuales fueron caracterizadas de acuerdo a su actividad nitrogenasa y producción de ácido indolacético. Las mejores fueron seleccionadas para evaluar su efecto en la germinación y vigor de semillas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”). Se

realizó la inoculación en semillas con diferente concentración de inóculo (10^4 , 10^6 y 10^8 UFC mL⁻¹) de cada cepa, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 2 factores: A) cepas y B) concentración de inóculo. La cepa AzGN3 aislada de la rizósfera de nopal promovió 27% la germinación de semillas con la concentración de inóculo de 10^6 UFC mL⁻¹. La ganancia de biomasa fresca y seca fue estimulada por la cepa AzTT2 de *Azospirillum* sp. con la concentración de 10^8 UFC mL⁻¹, la longitud radicular se incrementó 36% al usar la dosis 10^6 UFC mL⁻¹ con la cepa AzTCH3. De acuerdo con la caracterización, la cepa aislada de la rizósfera de nopal (AceGN2) de *Acetobacter* sp., obtuvo la mayor concentración de ácido indolacético. Se concluye que las rizobacterias nativas presentan potencial para estimular el crecimiento y desarrollo vegetal de semillas de chile jalapeño.

Palabras clave: Rizósfera, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Capsicum annum* L.

ABSTRACT

Azospirillum, *Acetobacter* and *Azotobacter* sp. strains were isolated in roots of prickly pear, tomato and chilli, which were characterized according to their nitrogenase activity and indoleacetic acid production. The best strains were selected to evaluate their effect on seed germination and vigor jalapeno chilli (*Capsicum annum* L. Híbrido "Great"). Inoculation was performed with different seed inoculum concentration (10^4 , 10^6 and 10^8 CFU mL⁻¹) of each strain, we

used a completely randomized design with two factors: A) strains and B) inoculum concentration. The AzGN3 isolated strain from the rhizosphere of nopal promoted 27% seed germination with inoculum concentration of 10^6 CFU mL^{-1} . The gain of fresh and dry biomass was stimulated by the strain of *Azospirillum* sp AzTT2. with the dose of 10^8 CFU mL^{-1} , the root length was increased 36% by using the concentration 10^6 CFU mL^{-1} strain AzTCH3. According to the characterization of the strain isolated from the rhizosphere of cactus (AceGN2) of *Acetobacter* sp. it obtained the highest concentration of indoleacetic acid. We conclude that native rhizobacteria have potential to stimulate plant growth and seed development of jalapeno.

Key words: Rhizosphere, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Capsicum annum* L.

INTRODUCCIÓN

La importancia socioeconómica del chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) radica en su alto consumo, redituabilidad y demanda de mano de obra (Macías *et al.*, 2012). En México, ocupa una superficie aproximada de 29.495 hectáreas, con una producción de 772,889 toneladas (SIAP – SAGARPA, 2012). Sin embargo, dentro de las condiciones que se requieren para elevar la producción y rendimiento del cultivo se encuentra el uso de plántulas vigorosas y con un alto porcentaje de germinación (Carballo, 1992). Esto podría conseguirse con la inoculación de rizobacterias en semillas que promueven el crecimiento y desarrollo de plántulas (Vessey, 2003). De acuerdo con Shigueru *et al.* (2013) la aplicación de inoculantes líquidos directamente en las semillas promueve cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos en la célula vegetal e incrementa el potencial de crecimiento de las plantas. Por su parte, Di Barbaro *et al.* (2005) indican que la inoculación con rizobacterias en semillas de pimiento podría beneficiar a la planta desde la germinación, hasta un desarrollo posterior.

Las rizobacterias como *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Acetobacter* sp., son llamadas bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) porque incrementan la productividad y crecimiento de plantas (Ferrera y Alarcón, 2007) debido a la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Camelo *et al.*, 2011) y producir sideróforos (Whipps, 2001) y hormonas vegetales, como auxinas, giberelinas y citocininas (Tsavkelova *et al.*, 2006).

Azospirillum es un género muy estudiado debido a diversas propiedades que posee, como la capacidad de sintetizar ácido indolacético (AIA) a través de la vía del ácido indol-3-pirúvico (IPA) (Patten y Glick, 1996). De acuerdo a Pedraza *et al.* (2004) *Azospirillum* puede producir de 16.5 a 38 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido indolacético. Carcaño *et al.* (2006) observaron que la actividad de la enzima nitrogenasa de cepas *Azospirillum* spp., aisladas de maíz fue de 8 a 70 nanomoles de etileno. Se ha encontrado que la inoculación con esta rizobacteria incrementa la germinación de semillas, ganancia de peso seco y contenido de nitrógeno en plantas de pimiento (Reyes *et al.*, 2008) y con las concentraciones de inoculante de 10^8 y 10^9 UFC mL^{-1} se obtienen las mayores respuestas en germinación, emergencia y desarrollo de plántulas (Di Barbaro *et al.*, 2005) además, Mendoza *et al.* (2009) mencionan que la inoculación con 10^9 UFC mL^{-1} aumenta el peso seco en plantas de pimiento morrón.

Azotobacter también tiene capacidad para fijar nitrógeno (Drummond *et al.*, 1995). Esta rizobacteria, además de fijar nitrógeno presentan un rápido crecimiento bacteriano (Kokusnan *et al.*, 2013) y secreta sustancias biológicamente activas que aceleran el crecimiento y desarrollo de las plantas (Pogorelova *et al.*, 2012). La producción de ácido indolacético en cepas de *Azotobacter* spp., puede ser de 7 a 58 $\mu\text{g/mg}^{-1}$ (Escobar *et al.*, 2011). Lara *et al.* (2011) mencionan que la mejor producción de auxina correspondió a *Azotobacter* sp. ésta cepa con la concentración de 1×10^6 UFC mL^{-1} incrementó la longitud de tallo en plántulas de pasto.

Acetobacter también es otro género de rizobacterias con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (Lee *et al.*, 2000), al respecto, Cavalcante y Dobereiner (1988) reportan altas tasas de fijación de nitrógeno *in vitro* en cepas aisladas de raíces y tallos de caña de azúcar. Por otro lado, Suman *et al.* (2005) mencionan que *Gluconoacetobacter diazotrophicus* especie perteneciente a las *Acetobacter* produce fitohormonas y tiene efecto positivo en la germinación y el crecimiento en plantas de caña de azúcar.

De acuerdo con lo anterior, la inoculación con rizobacterias en semillas contribuye a elevar la germinación y crecimiento de plántulas, lo cual puede beneficiar los cultivos y reducir el uso de nutrientes químicos y la contaminación ambiental (Doria, 2010). El objetivo del estudio fue evaluar la germinación y vigor de semillas de chile jalapeño inoculadas con cepas *Azospirillum*, *Acetobacter* y *Azotobacter* sp., aisladas de la rizósfera de plantas de nopal, tomate, chile y trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos de rizobacterias para la preparación de inoculante líquido

La investigación se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), en Saltillo, Coahuila, México. Se aislaron rizobacterias provenientes de la superficie e interior de raíces de nopal, tomate, chile y trigo (Cuadro 1). Los medios de crecimiento empleados fueron NFb (medio selectivo de nitrógeno) para *Azospirillum* sp., utilizando malato como fuente de carbono (Döbereiner *et al.*, 1976). Para *Acetobacter* sp., se utilizó también medio NFb, pero con pH ácido para especies tolerantes y el medio Ashby complementado con manitol para cepas *Azotobacter* sp. (Bashan *et al.*, 1993). Para la preparación de los inoculantes líquidos, las 13 cepas aisladas fueron sembradas en caldo nutritivo líquido y puestas en incubadora (Precisión Scientific 815) durante 7 días a 29° C para su multiplicación, la suspensión obtenida fue de 1×10^{10} UFC mL⁻¹. Después, mediante el método de diluciones seriadas, se prepararon las concentraciones de inóculo 10^8 , 10^6 , 10^4 UFC mL⁻¹ para cada una de las cepas. Cabe mencionar que éstas fueron caracterizadas como promotoras de crecimiento vegetal debido a su actividad nitrogenasa y producción de ácido indolacético.

Cuadro 1. Descripción de cepas nativas de *Azospirillum*, *Acetobacter* y *Azotobacter* sp, aisladas en tres localidades del Estado de Coahuila.

Table 1. Description of native strains of *Azospirillum*, *Acetobacter* and *Azotobacter* sp., isolated on three locations of Coahuila.

Clave	BPCV (sp.)	Hospedero	Localidad
AzGN3	<i>Azospirillum</i>	Nopal	General Cepeda
AzGT1	<i>Azospirillum</i>	Tomate	General Cepeda
AzTN5,AzTN7	<i>Azospirillum</i>	Nopal	Torreón
AzTCH3	<i>Azospirillum</i>	Chile	Torreón
AzTT2	<i>Azospirillum</i>	Tomate	Torreón
AzSTC-5	<i>Azospirillum</i>	Trigo	Saltillo
AceGN1, AceGN2	<i>Acetobacter</i>	Nopal	General Cepeda
AceTT	<i>Acetobacter</i>	Tomate	General Cepeda
AceTN	<i>Acetobacter</i>	Nopal	Torreón
AzoTN	<i>Azotobacter</i>	Nopal	Torreón
Azo GN	<i>Azotobacter</i>	Nopal	General Cepeda

Caracterización de rizobacterias

Se midió la actividad nitrogenasa de las rizobacterias mediante el método indirecto de la actividad reductora de acetileno (ARA), se utilizó el medio NFb semigelificado (Döbereiner *et al.*, 1976) y dicha prueba fue basada en la técnica de Hardy *et al.* (1973). Las cepas se cultivaron en tubos con 4 mL de medio semisólido por 4 días hasta que se formó una película de crecimiento bacteriano abajo de la superficie del medio. Cada tubo se cerró herméticamente y con una jeringa se extrajo el 10% del volumen de aire, que se substituyó con acetileno con la ayuda de una jeringa. Los tubos se incubaron por 24 h a temperatura ambiente; se tomaron muestras de 5 mL de la fase gaseosa de cada tubo y se depositaron en tubos al vacío. Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (Hewlett 5890 Packard series II con columna Poraplot Q 25 mx 0.3 mm) para determinar la cantidad de etileno reducido.

Se cuantificó la producción de ácido indolacético (AIA) de las cepas, en el medio Luria – Bertani (LB), mediante el método colorimétrico con el reactivo Salkowski (Glickmann y Dessaux, 1995). Las cepas se cultivaron por 3 días en el medio líquido LB, se tomaron muestras de 1 mL y se centrifugaron por 25 minutos, se tomó un alícuota de 150 μL de cada muestra y se depositaron en microplacas de 96 pozos; a cada uno se le adicionó 100 μL de reactivo Salkowski, se incubaron todas las microplacas en oscuridad por 30 minutos. Las lecturas de absorbancia fueron tomadas por medio de un espectrofotómetro con lector de microplaca (Synergy 2 microplate reader, Biotek instruments, Inc.).

Inoculación de rizobacterias en semillas de chile jalapeño

Para evaluar el potencial de las rizobacterias se realizó una prueba de germinación y vigor en semillas de chile jalapeño híbrido “Grande”, las cuales se lavaron utilizando alcohol al 70% y después con agua destilada. Se utilizaron 3 matraces de 125 mL, los cuales contenían diferente concentración de inóculo líquido 10^8 , 10^6 , 10^4 UFC mL^{-1} de cada cepa, en cada matraz se colocaron 50 semillas durante 4 horas para llevar a cabo la imbibición. Se añadió un testigo absoluto sin inóculo, el cual solo fue tratado con agua destilada. Al término del tiempo de imbibición, las semillas se colocaron en cajas petri esterilizadas, las cuáles contenían un disco de papel filtro como soporte.

Condiciones *in vitro*

Las cajas petri fueron llevadas a una Cámara de Germinación (Biotronette Mark II, Environment Chamber) a 28° C, donde permanecieron 14

días después de ser imbibidas. El papel filtro de las cajas fue humedecido diariamente con agua destilada.

Variables evaluadas

Las variables de respuesta fueron porcentaje de germinación siguiendo la metodología descrita por Moreno (1984), solamente se tomaron en cuenta las plántulas normales. El peso fresco y seco de plántulas se determinó mediante una balanza analítica (AND modelo HR – 200) y la longitud de raíz, hoja y tallo fueron estimadas con un vernier. Estas variables fueron registradas a los 14 días cuando finalizó el experimento.

Diseño experimental

Se diseñó un experimento completamente al azar con arreglo factorial de 2 factores (14x2) con tres repeticiones, dónde los factores y sus niveles fueron: A) cepas (catorce niveles: descritos en la tabla 1) y B) concentraciones de inóculo (tres niveles: 10^8 , 10^6 , 10^4 UFC ml⁻¹).

Análisis estadístico

La comparación entre tratamientos se realizó mediante ANOVA con una prueba Tukey ($\alpha = 0,05$), los datos fueron procesados mediante el paquete estadístico SAS versión 9,0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad de la enzima nitrogenasa

En relación a la actividad de la enzima nitrogenasa se encontraron diferencias altamente significativas entre las cepas de *Azospirillum* sp. AzTT2 y AzTN7 (Cuadro 2) aisladas de la rizósfera de tomate y nopal, éstas presentaron 8.9 y 4.5 (nmoles $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot vial$). Por otro lado, la cepa *Acetobacter* sp. AceGN2 aislada de raíz de nopal, presentó 3,8 nmoles de etileno (Cuadro 2). Estos valores son bajos en comparación con otros reportados por Mascarua *et al.* (1988) quienes aislaron cepas de *Azospirillum* de raíz de nopal, las cuales produjeron de 17.6 a 32.8 (nmoles $C_2H_4 h^{-1} mL^{-1}$). Carcaño *et al.* (2006) obtuvieron una reducción de 8.62 a 70.08 nmoles de etileno ($C_2H_4 h^{-1} mL^{-1}$) con cepas *Azospirillum* spp., aisladas de maíz. La diferencia en la actividad nitrogenasa de rizobacterias podría deberse a que la enzima varía su función dependiendo de la especie vegetal donde se encuentra y de la composición de la cepa (Orozco y Martínez, 2009). Por otro lado, Eckert *et al.* (2001) mencionan que la cantidad de nitrógeno fijado depende probablemente al genotipo asociado con la bacteria.

Cuadro 2. Prueba de comparación de medias de la actividad reductora de acetileno (ARA) y producción de ácido indolacético (AIA) de las rizobacterias en estudio.

Table 2. Comparison of means test of acetylene reduction activity (ARA) and indole acetic acid production (AIA) of rhizobacteria under study.

Cepa	Actividad nitrogenasa (nmolesC₂H₄· 1h⁻¹·vial)	Indoles totales (µg ml⁻¹)
AzGN3	0.51 c	3.49 de
AzGT1	0.13 c	59.78 c
AzTN4	0.77 c	9.54 de
AzTN7	4.51 b	12.80 de
AzTCH3	1.15 c	84.14 bc
AzTT2	8.90 a	106.06 b
AzSTC-5	0.12 c	17.94 de
AceGN1	1.35 c	16.52 de
AceGN2	3.70 b	181.76 a
AceGT	1.17 c	71.89 c
AceTN	0.49 c	11.06 de
AzoTN	1.44 c	29.04 d
AzoGN	0.79 c	19.59 de
Testigo	0.14 c	0.00
C.V. %	41.80	21.74

Medias con la misma letra dentro de la misma columna, son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$). C.V. % = Coeficiente de variación.

Producción de indoles totales

De acuerdo al Cuadro 2, la producción de ácido indolacético fue mayor en la cepa de *Acetobacter* sp. AceGN2 aislada de raíz de nopal y la de *Azospirillum* sp. AzTT2 aislada de tomate, con una producción de 181.76 y 106.06 µg·mL⁻¹ respectivamente. Estos resultados son superiores a los reportados por Lara *et al.* (2011) que obtuvieron niveles de ácido indolacético de 29.65 ppm en cepas *Azospirillum* sp. Por otro lado, Fuentes *et al.* (1993) reportan que cepas de *Acetobacter diazotrophicus* aisladas de la superficie de raíz de caña de azúcar producen de 0.14 a 2.42 µg·mL⁻¹ de ácido indolacético y *Azospirillum brasilense* sp-7, produce 40.17 µg mL⁻¹ de ácido indolacético

(Obando *et al.*, 2010). Éstas diferencias pudieran deberse al tipo de suelo donde fueron aisladas o la especie a cual pertenecen (Loredo *et al.*, 2004). Por otro lado, Rengel (1997) menciona que la composición de los microorganismos del suelo varía de acuerdo a la especie o genotipo de la planta o a la cantidad y calidad de los exudados radicales.

Respuesta de la germinación de semillas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”) con la inoculación de rizobacterias.

El 61% de las rizobacterias incrementaron la germinación de semillas, el 30% la redujeron y el 15% no tuvieron efecto. Las cepas de *Azospirillum* sp. que promovieron la germinación fueron AzGN3 a 10^6 UFC mL⁻¹ presentó un 27% más germinación, mientras que el resto de las concentraciones la inhibieron (Cuadro 3), también la cepa AzGT1 demostró su máximo potencial a 10^4 y 10^6 UFC mL⁻¹ debido a que estimularon la germinación un 24% a diferencia de la dosis de 10^8 UFC mL⁻¹. De acuerdo con estos resultados se observa que las concentraciones de inóculo influyen en la respuesta germinativa de semillas, por lo tanto, no todas las cepas responden de igual manera con las concentración utilizadas, esto también sucedió con la *Acetobacter* sp. (AceTN), la cual generó un mayor número de semillas germinadas con la concentración menor de 10^4 UFC mL⁻¹ (Cuadro 3), también la cepa AzTCH3 produjo alto porcentaje de germinación, debido a que superó al testigo con 7%, por lo tanto, AzTCH3 de *Azospirillum* sp., puede ser inoculada en semillas de chile con cualquiera de las tres concentraciones de inóculo (Cuadro 3). Estos resultados coinciden con Di Barbaro *et al.* (2005) quienes reportan valores de germinación con 6,5% superior al testigo en semillas de pimiento inoculadas con cepas

Azospirillum brasilense, también Molina *et al.*, (2009) reportaron incrementos en la germinación de semillas de tomate al inocular cepas *Azospirillum* sp., con una concentración de 10^9 UFC mL⁻¹. Los efectos positivos en la germinación podrían deberse a que las bacterias de *Azospirillum* liberan fitohormonas como giberelinas, citocininas o auxinas, lo cual favorece la germinación (Rojas *et al.*, 2008). De acuerdo a los resultados obtenidos con *Acetobacter* sp. (AceTN) se sabe que también son efectivas para incrementar la germinación en semillas de chile.

Cuadro 3. Efecto de la interacción de cepas y concentración de inóculo en el porcentaje de germinación de semillas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”).

Table 3. Effect of interaction of strains and inoculums concentration on seed germination percentage jalapeno (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Great”).

Concentración de inóculo	10 ⁴ UFC mL ⁻¹	10 ⁶ UFC mL ⁻¹	10 ⁸ UFC mL ⁻¹	Medias
Cepas				
AzGN3	73 B b	93 A a	73 B c	80 d
AzGT1	96 A a	93 A a	76 B bc	88 abcd
AzTN5	83 A ab	80 A a	90 A abc	84 bcd
AzTN7	86 A ab	86 A a	76 A bc	83 cd
AzTCH3	96 A a	96 A a	100 A a	97 a
AzTT2	90 A ab	96 A a	100 A a	95 abc
AzSTC-5	93 A ab	100 A a	96 A ab	96 ab
AceGN1	90 A ab	96 A a	93 A abc	93 abc
AceGN2	96 A a	90 A a	96 A ab	94 abc
AceTT	96 A a	93 A a	100 A a	96 ab
AceTN	96 A a	80 B a	93 AB abc	90 abcd
AzoTN	90 A ab	90 A a	93 A abc	91 abcd
AzoGN	96 A a	93 A a	93 A abc	94 abc
Testigo (SN)	90 A ab	90 A a	90 A abc	90 abcd
Media	91	91	90	91
C.V.%	7.29	6.39	10.07	8.46

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones. C.V. % = Coeficiente de variación; (SN) = sin inóculo. Literales en mayúscula demuestran las diferencias estadísticas entre la interacción de factores y las literales en minúsculas las diferencias estadísticas entre las cepas.

Peso fresco de plántulas

Existieron diferencias significativas ($P \leq 0.0001$) en el peso fresco de plántulas por efecto de la interacción de los factores cepa y concentración de inóculo. El peso fresco de plántulas fue estimulado por los tratamientos AzTT2 de *Azospirillum* sp., con una concentración de 10^8 UFC mL⁻¹ y *Acetobacter* sp. (AceTN) con el inóculo de 10^4 UFC mL⁻¹, éstas cepas produjeron más biomasa fresca con 13 y 10% respectivamente mayores que el testigo. Por otro lado, la cepa AzoGN de *Azotobacter* sp., es efectiva al utilizarla con cualquiera de las tres concentraciones, debido a que superó al resto de los tratamientos con 37% mayor biomasa fresca (Cuadro 4). Resultados similares a estos son los de Di Barbaro *et al.* (2005) que al inocular *Azospirillum brasilense* en semillas de pimiento también aumentó la biomasa fresca de plántulas, debido probablemente a la liberación de sustancias promotoras vegetales. Sethi y Adhikary *et al.* (2009) evaluaron el efecto de *Azotobacter* en plantas de *Capsicum annuum* observando incrementos significativos en la producción de biomasa. Cabe mencionar que *Azotobacter* es fijadora de nitrógeno, lo cual contribuye a incrementar la biomasa vegetal (Lee *et al.*, 2000). Por otro lado, Rodelas *et al.* (1999) mencionan que bacterias del género *Azotobacter* sp., sintetizan vitaminas y hormonas vegetales, lo cual podría contribuir con un mejor desarrollo vegetal.

Cuadro 4. Efecto de la interacción de cepas y concentración de inóculo en el peso fresco de plántulas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”).

Table 4. Interaction effects strains and inoculum concentration in fresh weight of jalapeno seedlings (*Capsicum annuum* L. Hybrid “Great”).

Concentración de inóculo	10 ⁴ UFCmL ⁻¹	10 ⁶ UFC mL ⁻¹	10 ⁸ UFC mL ⁻¹	Medias
Cepas				
AzGN3	347 B f	475 AB b	525 A abcd	449 efg
AzGT1	362 B f	558 A ab	373 B cd	431 fg
AzTN5	433 A def	420 A b	360 A d	404 g
AzTN7	374 B ef	419 AB b	532 A abcd	442 fg
AzTCH3	570 A abcde	472 A b	438 A bcd	493 cdefg
AzTT2	477 AB cdef	600 AB ab	667 A a	581 bc
AzSTC-5	527 A abcdef	537 A ab	518 A abcd	527 bcdefg
AceGN1	583 A abcd	532 A ab	495 A abcd	537 bcdef
AceGN2	351 B f	478 AB b	566 A abc	465 defg
AceTT	693 A ab	565 A ab	636 A ab	631 ab
AceTN	643 A abc	454 B b	593 A ab	563 bcde
AzoTN	522 A bcdef	536 A ab	639 A ab	565 bcd
AzoGN	723 A a	726 A a	673 A a	707 a
Testigo SN	586 A abcd	586 A ab	586 A ab	586 bc
Media	513	525	544	527
C.V.%	25	15	18	22.27

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones. C.V. % = Coeficiente de variación; SN = sin inóculo. Literales en mayúscula (A) demuestran las diferencias estadísticas entre concentraciones de inóculo y las literales en minúsculas (a) las diferencias estadísticas entre las cepas. Unidades expresadas en miligramos (mg).

Peso seco de plántulas

La variable peso seco presentó diferencias significativas ($P \leq 0.0001$) por parte del tratamiento *Azospirillum* sp. (AzTT2), el cual produjo 65% mayor biomasa seca al ser inoculada con la concentración de 10⁸ UFC mL⁻¹ (Cuadro 5), también la rizobacteria AzTCH3 de *Azospirillum* sp., con la dosis 10⁴ UFC mL⁻¹ resultó efectiva, debido a que presentó 31% más peso seco que el testigo. Al respecto, Molina *et al.* (2009) sugieren inocular cepas de *Azospirillum* sp.

con 10^9 UFC mL^{-1} en plantas de tomate para el incremento de materia seca. Por otro lado, Molla *et al.* (2001) mencionan que *Azospirillum brasilense* produce grandes cantidades de ácido indolacético extracelular, lo cual favorece el contenido de materia seca en plantas, también bacterias de este género aisladas de plantas de arroz sintetizaron 38 ppm de ácido indolacético, lo que contribuyó a un incremento de biomasa en relación con los demás tratamientos (García *et al.*, 2010). Lo antes citado sugiere que la cepa de *Azospirillum* sp. (AzTT2) indujo la ganancia de biomasa seca, debido probablemente a que produjo $106 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido indolacético (Cuadro 2).

Cuadro 5. Efecto de la interacción de cepas y concentración de inóculo en el peso seco de plántulas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”).

Table 5. Interaction effects of strains and inoculum concentration on the dry weight of jalapeno seedlings (*Capsicum annuum* L. Hybrid “Great”).

Cepas	Concentración de inóculo			Medias
	10 ⁴ UFCmL ⁻¹	10 ⁶ UFC mL ⁻¹	10 ⁸ UFCmL ⁻¹	
AzGN3	38 A b	48 A ab	38 A b	42 b
AzGT1	44 A b	47 A ab	41 A b	44 b
AzTN5	47 A ab	42 A ab	45 A b	45 b
AzTN7	43 A b	43 A ab	40 A b	42 b
AzTCH3	67 A a	37 B b	44 B b	49 ab
AzTT2	47 B ab	55 B a	84 A a	62 a
AzSTC-5	48 A ab	51 A ab	54 Ab	51 ab
AceGN1	49 A ab	48 A ab	41 A b	46 b
AceGN2	47 A ab	43 A ab	51 A b	47 b
AceTT	53 A ab	53 A ab	53 A b	53 ab
AceTN	55 A ab	37 B b	47 AB b	46 b
AzoTN	48 A ab	51 A ab	52 A b	50 ab
AzoGN	55 A ab	48 A ab	54 A b	52 ab
Testigo SN	51 A ab	51 A ab	51 A b	51 ab
Media	50	47	50	49
C.V.%	14	12	23	16.34

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones. C.V. % = Coeficiente de variación; SN = sin inóculo. Literales en mayúscula (A) demuestran las diferencias estadísticas entre concentraciones de inóculo y las literales en minúsculas (a) las diferencias estadísticas entre las cepas. Unidades expresadas en miligramos (mg).

Desarrollo de plántulas

Respecto a la longitud de raíz hubo diferencias estadísticas ($P \leq 0.0001$), debido a que la cepa *Azospirillum* sp. (AzGT1) con la concentración de 10⁶ UFC mL⁻¹ produjo 25% mayor longitud que el testigo, también AzTCH3 con la misma concentración superó al resto de los tratamientos con 36% mayor longitud radicular (Cuadro 6), el género *Acetobacter* sp. también provocó longitudes de raíz superiores que el tratamiento testigo, con la inoculación de la cepa AceTN con la dosis de 10⁸ UFC mL⁻¹ la cual produjo 28% más longitud, también AceTT

propicio aumentos de 32% más de longitud de raíz al ser aplicada con cualquiera de las tres concentraciones de inóculo. Cabe mencionar que estas cepas producen de 11 a 84 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido indolacético (Cuadro 2) y de acuerdo con Lara *et al.* (2011) indican que las bacterias *Azospirillum* inducen la producción de ácido indolacético, lo cual podría contribuir al aumento de la elongación y crecimiento de raíces, coincidiendo con Di Barbaro *et al.* (2005) quienes agregan que la estimulación del crecimiento radicular está relacionada de alguna manera con la producción de ácido indolacético y otras hormonas vegetales como citocininas y giberelinas.

Cuadro 6. Efecto de la interacción de las cepas y concentración de inóculo en la variable longitud de raíz de plántulas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”).

Table 6. Interaction effects of the strains and concentration of inoculum concentration in the variable length seedling root jalapeno pepper (*Capsicum annuum* L. Hybrid “Great”).

Cepas	Concentración de inóculo			Medias
	10 ⁴ UFC mL ⁻¹	10 ⁶ UFC mL ⁻¹	10 ⁸ UFC mL ⁻¹	
AzGN3	48.03 A abcd	47.50 A abc	50.03 A a	48.52 bcd
AzGT1	40.43 B cd	56.70 A abc	46.66 AB a	47.93 bcd
AzTN5	47.63 A abcd	57.36 A abc	50.03 A a	51.67 abc
AzTN7	42.66 A bcd	50.10 A abc	46.36 A a	46.37 bcd
AzTCH3	55.66 AB abc	61.66 A ab	44.63 B a	53.98 abc
AzTT2	52.00 A abcd	58.00 A abc	46.66 A a	52.22 abc
AzSTC-5	58.33 A ab	51.10 A abc	57.30 A a	55.57 ab
AceGN1	39.66 A cd	46.10 A bc	48.00 A a	44.58 cd
AceGN2	38.16 A d	43.36 A c	43.00 A a	41.51 d
AceTT	61.06 A a	63.86 A a	54.23 A a	59.72 a
AceTN	39.66 B cd	48.46 AB abc	58.00 A a	48.71 bcd
AzoTN	48.76 A abcd	52.33 A abc	51.66 A a	50.92 abcd
AzoGN	51.96 A abcd	53.14 A abc	50.43 A a	51.84 abc
Testigo SN	45.22 A abcd	45.22 A bc	45.22 A a	45.22 cd
Media	47.67	52.78	49.19	49.91
C.V.%	15	12	9.28	17.60

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones. C.V. % = Coeficiente de variación; SN = sin inóculo. Literales en mayúscula (A) demuestran las diferencias estadísticas entre concentraciones de inóculo y las literales en minúsculas (a) las diferencias estadísticas entre las cepas. Unidades expresadas en milímetros (mm).

El Cuadro 7 muestra que la longitud de tallo en plántulas de chile presentó diferencias significativas ($P \leq 0.0001$), con el incremento de 36% por efecto de la cepa *Azospirillum* sp. (AzTT2) con la dosis 10⁴ UFC mL⁻¹, también la longitud de hoja fue estimulada con la concentración de inóculo 10⁴ UFC mL⁻¹ de las cepas AzTT2 y AzTCH3 de *Azospirillum* sp. (Cuadro 8). Estos resultados pueden deberse a que la inoculación con rizobacterias como *Azospirillum* interviene en la fenología de plántulas (Tran van *et al.*, 2000). De acuerdo con

Rojas *et al.* (2009) evaluaron el efecto de *Azospirillum* sp., en semillas de trigo duro con una concentración de 10^6 UFC mL⁻¹ que causó incrementos de la longitud de hoja a diferencia del resto de los tratamientos. Las mejores rizobacterias para propiciar el desarrollo de plántulas de chile jalapeño podrían ser utilizadas para estimular el enraizamiento, mejorar el crecimiento y procesos metabólicos de plantas de chile jalapeño, además de promover la fijación de nitrógeno (Fuentes *et al.*, 1993).

Cuadro 7. Efecto de la interacción de cepas y concentración de inóculo en la variable longitud de tallo de plántulas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”).

Table 7. Interaction effects of strains and concentration of inoculum in the variable length stalk jalapeno pepper seedlings (*Capsicum annuum* L. Hybrid “Great”).

Cepas	Concentración de inóculo			Media
	10 ⁴ UFC mL ⁻¹	10 ⁶ UFC mL ⁻¹	10 ⁸ UFC mL ⁻¹	
AzGN3	22.60 A ab	20.83 A a	21.33 A abc	21.58 ab
AzGT1	20.06 A b	22.20 A a	21.66 A abc	21.31 ab
AzTN5	18.16 A b	20.33 A a	19.33 A bc	19.27 bc
AzTN7	20.66 A b	22.46 A a	21.66 A abc	21.60 ab
AzTCH3	20.33 A b	20.00 A a	23.33 A ab	21.22 ab
AzTT2	28.66 A a	22.00 B a	24.66 B a	25.11 a
AzSTC-5	19.30 A b	19.96 A a	19.56 A abc	19.61 bc
AceGN1	19.33 A b	20.16 A a	21.00 A abc	20.16 bc
AceGN2	19.00 A b	21.13 A a	20.90 A abc	20.34 bc
AceTT	20.03 A b	20.10 A a	18.56 A bc	19.66 bc
AceTN	21.00 A b	20.00 A a	19.33 A bc	20.11 bc
AzoTN	17.83 A b	17.46 A a	18.50 A bc	17.93 c
AzoGN	18.33 A b	18.23 A a	17.23 A c	17.93 c
Testigo SN	21.00 A b	21.00 A a	21.00 A abc	21.00 b
Media	20.52	20.44	20.50	20.49
C.V.%	13.17	7	10	12.95

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0,05$). Promedio de tres repeticiones. C.V. % = Coeficiente de variación; SN = sin inóculo. Literales en mayúscula (A) demuestran las diferencias estadísticas entre concentraciones de inóculo y las literales en minúsculas (a) las diferencias estadísticas entre las cepas. Unidades expresadas en milímetros (mm).

Cuadro 8. Efecto de la interacción de cepas y concentración de inóculo en la variable longitud de hoja de plántulas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”).

Table 8. Interaction effects of strains and inoculum concentration in the variable length blade jalapeno seedlings (*Capsicum annuum* L. Hybrid “Great”).

Concentración de inóculo	10 ⁴ UFC mL ⁻¹	10 ⁶ UFC mL ⁻¹	10 ⁸ UFC mL ⁻¹	Media
Cepas				
AzGN3	16.00 A de	16.00 A de	17.00 A abc	16.30 de
AzGT1	12.30 B f	16.40 A cde	12.50 B d	13.70 f
AzTN5	15.26 A ef	17.00 Aabcde	16.30 A bc	16.20 de
AzTN7	14.36 A ef	15.00 A e	15.70 A cd	15.00 ef
AzTCH3	21.66Aab	19.33 B abc	19.33 B ab	20.10 a
AzTT2	22.33 A a	18.33 B abcd	20.33 AB a	20.33 a
AzSTC-5	18.66 A bcd	16.30 B cde	17.63 ABabc	17.53 cd
AceGN1	15.10 A ef	15.83 A de	17.80 A abc	16.52 de
AceGN2	14.66 B ef	16.50 ABbcde	17.73 A abc	16.30 de
AceTT	19.80 A abc	20.00 A a	19.00 A ab	19.60 ab
AceTN	20.00 A abc	19.06 A abcd	18.00 A abc	19.02 abc
AzoTN	17.46 A cde	16.90 Aabcde	17.76 A abc	17.37 cd
AzoGN	17.00 B cde	19.80 A ab	17.43 B abc	18.10 bcd
Testigo SN	19.60 A abc	19.60 A abc	19.60 A ab	19.61 ab
Media	17.53	17.50	17.63	17.55
C.V.%	17.13	10	11	14.25

Medias con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0.05$). Promedio de tres repeticiones. C.V. % = Coeficiente de variación; SN = sin inóculo. Literales en mayúscula (A) demuestran las diferencias estadísticas entre concentraciones de inóculo y las literales en minúsculas (a) las diferencias estadísticas entre las cepas. Unidades expresadas en milímetros (mm).

CONCLUSIONES

Las cepas *Azospirillum* sp. (AzGN3 y AzGT1) aisladas de la rizósfera de nopal y tomate respectivamente promovieron la germinación de semillas con las concentraciones de inóculo de 10^6 UFC mL⁻¹ y 10^4 UFC mL⁻¹. La rizósfera AzTT2 de *Azospirillum* sp., aislada de tomate favoreció la acumulación de biomasa seca en plántulas de chile jalapeño con la dosis de 10^8 UFC mL⁻¹. Mientras que la cepa *Azospirillum* sp. (AzTCH3) aislada de la rizósfera de chile con la concentración de inóculo 10^6 UFC mL⁻¹ aumentó la longitud radicular de plántulas. De acuerdo con la caracterización, la cepa aislada de la rizósfera de nopal (AceGN2) de *Acetobacter* sp., obtuvo la mayor concentración de ácido indolacético. Estos resultados permitieron identificar rizobacterias nativas con potencial para estimular el crecimiento y desarrollo vegetal de semillas de chile jalapeño.

LITERATURA CITADA

- Bashan, Y., Holguin, G. and Lifshitz, R. 1993. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria. P 337 – 338. *In*: Methods in plant molecular biology and biotechnology. Glick BR. Thompson JE. (Eds). CRC. ISBN-10 0849351642.
- Camelo, M., Vera, S.P. y Bonilla, R.R. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 12: 159 – 166.
- Carballo, C.A. 1992. La calidad genética y su importancia en la producción de semillas. *In*: Mendoza, O.L.; Favela, C.E.; Cano, R.P.; y Esparza, M.J.H. 1992. Situación actual de la producción, investigación y comercio de semillas en México. Memoria tercer Simposium, Torreón, Coahuila, México. pp. 80–101.
- Carcaño – Montiel, M.G., Ferrera – Cerrato, R., Pérez – Moreno, J., Molina – Galán, J.D. y Bashan, Y. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. Revista Terra Latinoamericana. 24: 493 – 502.
- Cavalcante, V.A. and Döbereiner, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. Plant and soil. 108: 23 – 31.
- Di Barbaro, G., Pernasetti, S. and Stegmayer, A. 2005. Effects evaluation of *Azospirillum brasilense* inoculation on pepper (*Capsicum annuum* L. Var. Trompa de elefante) seeds germination and plants emergence. Revista del Cizas. 6: 74 – 85.
- Döbereiner, J., Marriel, I.E. and Nery, M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Canadian Journal of Microbiology. 22: 1464 – 1473.
- Doria, J. 2010. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. Revista Scielo. I Reserva Científica del departamento de Fitotecnia, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 13: 74 – 85.
- Drummond, M., Walmsley, J. and Kennedy, C. 1995. Expression form the nifB Promoter of *Azotobacter vinelandii* can be activated by NifA, VnfA, or AnfA Transcriptional Activators. Journal of Bacteriology. 178: 788 – 792.
- Eckert, B., Weber, O.B., Kirchhof, T., Halbritter, A., Stoffels, M. y Hartmann, A. 2001. Dobereineriae *Azospirillum* sp. noviembre, una bacteria fijadora de

nitrógeno asociada con el C4 – grass Miscanthus. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 17 – 26.

- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C. y Mendoza, G. 2011. Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria.* 2: 39 – 49.
- Ferrera – Cerrato, R. y Alarcón, A. 2007. *Microbiología Agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta – microorganismo.* Ed. Trillas. Pp. 162 – 166.
- Fuentes – Ramírez, L.E., Jiménez – Salgado, T., Abarca – Ocampo, I.R. y Caballero – Mellado, J. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, una bacteria productora de ácido indolacético aislado de cultivos de caña de azúcar de México. *Plant and Soil.* 154: 145 – 150.
- García, F., Muñoz, H., Carreño, C. y Mendoza, G. 2010. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria.* 1: 107 – 116.
- Glickmann, E. and Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* 61: 793 – 796.
- Hardy, R.W.F., Burns, R.C. and Holsten, R.D. 1973. Applications of the acetylene – ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 5: 47 – 81.
- Koksunan, S., Vichitphan, S., Laopaiboon, L., Vichitphan, K. and Han, J. 2013. Growth and cyanide degradation of *Azotobacter vinelandii* in cyanide-containing wastewater system. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 23: 572 – 578.
- Lara – Mantilla, C., Oviedo – Zumaqué, L.E. y Betancur – Hurtado, C.A. 2011. Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Revista Zootecnia Tropical.* 29: 187 – 194.
- Lee, S., Reth, A., Meletzus, D., Sevilla, M. and Kennedy, C. 2000. Characterization of a major cluster of *nif*, *fix* and associate genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Bacteriology.* 182: 7088 – 7091.
- Loredo – Osti, C., López – Reyes, L. y Espinosa – Victoria, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Revista Terra Latinoamericana.* 22: 225 – 239.

- Macías – Duarte, R., Grijalva – Contreras, R.L. y Robles – Contreras, F. 2012. Respuesta de la aplicación de estiércol y fertilizantes sobre el rendimiento y cantidad del chile jalapeño. *Biotecnia. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. 14: 32 - 38.
- Mascarua – Esparza, M.A., Villa – González, R. y Caballero – Mellado, J. 1988. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from *Cactaceous* plants. *Plant and Soil*. 106: 91 – 95.
- Mendoza – Villarreal, R., Hernández – Florentino, A., Ramírez – Rodríguez, H., Molina – Abadía, G.S. y Quezada – Martín, M.R. 2009. “Efecto de cepas de *Azospirillum* sp. en la productividad del pimiento morrón” en *Agricultura sostenible Vol. 6*. Galdaméz G J, Guevara H F, Soto P L, Vázquez G M, (comp.). Universidad Autónoma de Chiapas. Ed. Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible, A. C. México. p.p.1:17. ISBN 978 – 607 – 8003 – 16 – 7.
- Molina, S., Mendoza, R., Torres, A., Sifuentes, D. y Rojas, B. 2009. Germinación de semillas de tomate cherry (*Lycopersicum pimpinellifolium*) inoculadas con diferentes cepas de *Azospirillum* sp. XIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas A.C. Torreón, Coahuila, México. P 49.
- Molla, A.H., Shamsuddin, Z.H. and Saud, H.M. 2001. Mechanism of root growth and promotion of nodulation in vegetable soybean by *Azospirillum brasilense*. *Com – mun. Soil Sci. Plant Anal*. 32: 2177 – 2187.
- Moreno, E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas, 1º. Ed. Instituto de Biología. UNAM. México, D.F. Pp. 250 – 252.
- Obando – Castellanos, D.M., Burgos – Zabala, L.B., Rivera – Botía, D.M., Rubiano – Garrido, M.F., Divan – Balandi, V.L. y Bonilla – Buitrago, R.R. 2010. Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, César (Colombia). *Acta Botánica Colombiana*. 15: 107 – 120.
- Orozco – Jaramillo, C. y Martínez – Nieto, P. 2009. Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *BOSQUE (Valdivia)*. 30: 70 – 77.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid. *Can. J. Microbiol*. 42: 207-220.
- Pedraza, R.O., Ramírez – Mata, A., Xiqui, M.L. y Baca, B.E. 2004. Aromatic amino acid aminotransferase activity and índole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 233: 15 – 21.

- Pogorelova, V.V., Bega, Z.T. y Kurdo, I.K. 2012. Interrelations of infusoria with *Azotobacter* and their influence on plants. *Mikrobiol Z.* 74: 48 – 54.
- Rengel, Z. 1997. Exudados de raíces y la microflora de la rizósfera de genotipo de cultivos que difieren en la tolerancia a la deficiencia de micronutrientes. *Plant and Soil.* 196: 255 – 260.
- Reyes, I., Álvarez, L., El – Ayoubi, H. y Valery, A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimiento y maíz. *Bioagro.* 20: 37 – 48.
- Rodelas, B., González – López, J., Pozo, C., Salmerón, V. y Martínez – Toledo, M.V. 1999. Response of Faba bean (*Vicia faba* L.) to combined inoculation with *Azotobacter* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *Applied Soil Ecology.* 12: 51-59.
- Rojas – Sierra, J. y Moreno – Sarmiento, N. 2008. Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología.* 10: 50 – 62.
- Rojas – Méndez, B.A., Mendoza – Villarreal, R., Mellado, K., Torres – Tapia, A. y Vázquez – Siller, L.M. 2009. Respuesta de trigo duro a la inoculación de *Azospirillum* sp. en la germinación y vigor. *Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible. A.C.* 6 ISBN: 978 – 607 – 8003 – 17 – 4.
- Sethi, S.K. and Adhikary, S.P. 2009. Efficacy of region specific *Azotobacter* strain on vegetative growth and yield of solanum melongena, *Lycopersicum esculentum* and *Capsicum annum*. *Revista de pura y aplicada microbiología.* 3: 331 – 336.
- SIAP – SAGARPA. 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/index.php> (15 Julio 2013).
- Shigueru – Okumura, R.; De Cinque – Mariano, D.; Dallacort, R.; Nogueira – De Albuquerque, A.; Da Silva – Lobato, A.K.; Silva – Guedes, E.M.; De Oliveira – Neto, C.F.; Oliveira – Da Conceicao, H.E.; Ruffei – Alves, G.A. 2013. *Azospirillum*: a new and efficient alternative to biological nitrogen fixation in grasses. *Journal of food agriculture and environment.* 11: 142 – 1146.
- Suman, A., Gaur, A., Shrivastava, A.K. y Yadav, R.L. 2005. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconoacetobacter diazotrophicus*. *Plant Growth Regulation.* 47: 155 – 162.

- Tran – Vam, V., Berge, S., Ngo – Ke, S., Balandreau, J. and Heulin, T. 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility acids of Vietnam. *Plant and Soil*. 218: 273 – 284.
- Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Yu., Cherduntseva, T.A. and Netrusov, A.I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 42: 117 – 126.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as fertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571 – 586.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions ADN biocontrol in the rizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 52: 487 – 511.

IV. ARTÍCULO 2

**EFFECTO DE CEPAS NATIVAS COMO BIOFERTILIZANTES EN CARACTERES
AGRONÓMICOS DE CHILE JALAPEÑO (*Capsicum annum* L.)**

**EFFECTO DE CEPAS NATIVAS COMO BIOFERTILIZANTES EN
CARACTERES AGRONÓMICOS DE CHILE JALAPEÑO (*Capsicum annuum*
L.)**

**Effect of Native Strains as Biofertilizers in Agronomic Traits of Jalapeno
Chilli (*Capsicum annuum* L.)**

G.L. Nuncio - Orta*, R. Mendoza - Villarreal*,¹ V. Robledo - Torres*, M.E.
Vázquez - Badillo*

* Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro #1923,
Colonia Buenavista, C.P. 25315. Saltillo, Coahuila, México.

¹Autor para correspondencia: rosalindamendoza@hotmail.com

Resumen

La inoculación con rizobacterias puede ser una alternativa para incrementar el crecimiento y desarrollo vegetal y reducir el uso de fertilizantes químicos. El objetivo de esta investigación fue aislar rizobacterias para evaluar su potencial biofertilizante en plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido "Grande"). El experimento se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México, en el año 2012. Se aislaron cepas *Azospirillum* y *Acetobacter* y se realizaron pruebas de actividad reductora de acetileno, indoles totales y solubilización de fósforo. En base a las mejores tres cepas de *Azospirillum* y una de *Acetobacter* fueron inoculadas en las plantas con 10^4 y 10^6 UFC mL⁻¹ como sustrato se utilizó perlita y peat moss (1:1). Para los riegos se aplicó solución nutritiva Steiner modificada con el 20%

de nitrógeno y se añadió un testigo con solución Steiner completa. Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar y prueba de comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$). Se evaluó el peso fresco y seco aéreo, peso fresco y seco radical, longitud de raíz, peso fresco y seco de frutos y peso de frutos por planta. Los resultados más significativos fueron con la cepa *Azospirillum* AzSTC-5 con 10^6 UFC mL^{-1} que incrementó el peso fresco, peso seco aéreo de plantas con 31% y 43% respectivamente y longitud de raíz con 47% más que el testigo, además es altamente solubilizadora de fósforo con $277.22 \mu\text{g mL}^{-1}$ lo cual la hace una cepa interesante a nivel agronómico.

Palabras clave: *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Capsicum annuum*, inoculación.

Abstract

Inoculation with rhizobacteria can be an alternative to increase the plant development and growth and reduce the use of chemical fertilizers. The objective of this research was to isolate rhizobacteria to assess their biofertilizer potential in jalapeno chilli plants (*Capsicum annuum* L. Hybrid "Great"). The experiment was conducted at the University Autónoma Agraria Antonio Narro in Saltillo, Coahuila, México in 2012. *Azospirillum* and *Acetobacter* strains were isolated and tests of acetylene reduction activity, phosphorus solubilization and total indoles were performed. Based on the three best strains of *Azospirillum* and *Acetobacter* were inoculated to plants with 10^4 and 10^6 CFU mL^{-1} as substrate it was used perlite and peat moss (1:1). For irrigation it was used

Steiner nutrient solution amended with 20% nitrogen and was added a full solution Steiner as control. An experimental block design randomly and test comparison of Tukey means ($P \leq 0.05$) was used. Weight Fresh and air Dry weight, weight fresh root and dry, root length, fresh and dry weight of fruits and fruit weight per plant were evaluated. The most significant results were with strain *Azospirillum* AzSTC-5 with 10^6 CFU ml⁻¹ which increased the fresh weight, shoot dry weight of plants with 31% and 43% respectively and root length 47% more than the witness, besides it is highly phosphorus solubilizer with 277.22 mg mL⁻¹ which makes it an interesting strain in an agronomic level.

Key words: *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Capsicum annuum*, inoculation.

INTRODUCCIÓN

Las rizobacterias que colonizan la raíz de las plantas presentan mayor adaptación al medio en el que se encuentren (Abril *et al.*, 2006). Las Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) forman parte de este grupo de microorganismos y son llamadas así por su capacidad para colonizar y permanecer en la rizósfera para beneficiar el crecimiento y desarrollo de plantas (Moreno & Galvis, 2013) mediante la fijación biológica de nitrógeno (Camelo *et al.*, 2011), producción de fitohormonas (Tsavkelova *et al.*, 2006) y facilitar la disponibilidad y absorción de nutrientes en plantas (Richardson *et al.*, 2009).

En relación a la producción de fitohormonas por medio de las BPCV como *Azospirillum*, la cual produce ácido indolacético, una auxina capaz de intervenir en el sistema radicular de plantas causando el desarrollo de raíces laterales y la división de meristemas que promueven la longitud de raíz (Dobelare *et al.*, 2003) y de acuerdo con Obando *et al.* (2010) la especie *Azospirillum brasilense* sp-7 produce $40.17 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido indolacético en condiciones *in vitro*. También *Acetobacter*, otra BPCV produce sustancias promotoras de crecimiento vegetal (Dibut *et al.*, 2010) como ácido indolacético en concentraciones de 9.25 a $32.14 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Rojas *et al.*, 2009).

Estudios como el de Canto *et al.* (2004) encontraron incrementos significativos en el peso aéreo y radical cuando se han inoculado plantas de chile habanero con 10^7 UFC mL^{-1} de *Azospirillum*. También en plantas de trigo inoculadas con *Azospirillum* hubo cambios morfológicos en raíz debido a la producción de ácido indolacético por la bacteria (Spaepen *et al.*, 2008).

La fijación biológica de nitrógeno por BCPV ha sido evaluada en diversos estudios como Carcaño *et al.* (2006) quienes demostraron que cepas *Azospirillum* spp. aisladas de maíz presentaron una actividad nitrogenasa de 8 a 70 nmoles de etileno en condiciones *in vitro*. Por su parte, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* perteneciente a las *Acetobacter* libera hasta un 50% de nitrógeno transformado a través de la fijación biológica (Cojho *et al.*, 1993). Se han reportado altas tasas de fijación de nitrógeno *in vitro* en cepas *Acetobacter* aisladas de raíces y tallos de caña de azúcar (Cavalcante y Dobereiner, 1988).

Respecto a la solubilización de fósforo por parte de las BPCV Rodríguez *et al.* (2004) realizaron el primer estudio para evaluar los ácidos orgánicos producidos por *A. brasilense* y *A. lipoferum* los resultados lograron demostrar la producción del ácido glucónico y la acidificación del pH del medio de cultivo, lo cual indujo a la solubilización del fósforo tricálcico en condiciones *in vitro*. Además Madhaiyan *et al.* (2004) mencionan que *G. diazotrophicus* es eficaz para solubilizar fósforo en condiciones *in vitro* mediante el ácido acético producido por la bacteria y la inoculación de esta bacteria en el cultivo de caña de azúcar presenta un efecto positivo en el desarrollo de la planta (Anand *et al.*, 2004).

De acuerdo con los estudios mencionados, la biofertilización en plantas con estas bacterias puede promover el crecimiento y desarrollo vegetal (Luna *et al.*, 2013), además de reducir el uso de fertilizantes químicos y la contaminación ambiental (Shankar *et al.*, 2011). Según Armenta *et al.* (2010) la elaboración de

biofertilizantes hechos con bacterias nativas presentan mayor efectividad en la agricultura debido a su capacidad de adaptación a las condiciones adversas del suelo para cada región.

El objetivo del estudio fue aislar bacterias nativas de la rizósfera de nopal, tomate, trigo y chile con el fin de evaluar su potencial biofertilizante en plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”) debido a que es un cultivo agrónomicamente importante y que demanda gran cantidad de nutrientes, principalmente nitrógeno (De Grazia *et al.*, 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de raíces

Se colectaron raíces de plantas de chile, nopal, tomate y trigo en los municipios de Saltillo, Torreón y General Cepeda, Coahuila, a una profundidad de 30 cm, las cuales se depositaron en bolsas identificando su origen y en otra bolsa se tomó 1 kg de suelo de cada muestra para realizar el análisis fisicoquímico de materia orgánica, carbonatos, pH, conductividad eléctrica, textura y minerales.

Tratamiento de raíces

Las raíces fueron lavadas sucesivamente con agua para eliminar residuos de suelo adheridos, después de cada raíz se cortaron trozos de raicillas secundarias de 1 cm de largo con 4 réplicas por muestra, se desinfectaron con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio 2% durante 1 y 2 minutos respectivamente. Al final se enjuagaron varias veces con agua destilada y se colocaron en viales que contenían solución salina al 0.85% de NaCl, cada vial fue identificado según muestra y repetición (Cuadro 1), enseguida fueron puestos en incubadora (Precisión Scientific 815) a temperatura de 29° C durante 7 días.

Aislamiento y recuento de rizobacterias

Transcurrido el tiempo de incubación, se extrajo 1 mL de cada vial y se inoculó en otros que contenían medio de cultivo semisólido NFb (nitrogen fixation biology) para aislar bacterias *Azospirillum*. Para el caso de *Acetobacter*

sp. el medio de cultivo presentó modificaciones ácidas para especies tolerantes (Bashan *et al.*, 1993). Los viales fueron incubados por 48 horas a 29 °C hasta la formación de una película blanquecina como indicador de crecimiento bacteriano positivo (Döbereiner y Day, 1976).

Para el recuento de colonias se hicieron diluciones seriadas de 10^1 a 10^9 . El total de unidades formadoras de colonias se obtuvieron con las diluciones 10^7 , 10^8 , 10^9 y 10^{10} para *Azospirillum* y para *Acetobacter* con 10^4 , 10^5 y 10^6 UFC mL⁻¹. De acuerdo a las características propias que presentaron las cepas fueron identificadas a nivel de género mediante la prueba de tinción Gram y características morfológicas.

Cuadro 1. Descripción de cepas nativas aisladas.

Table 1. Description of native strains isolated.

Cepas	BPCV (sp.)	Hospedero	Localidad
AzGT1	<i>Azospirillum</i>	Tomate	General Cepeda
AzTCH3	<i>Azospirillum</i>	Chile	Torreón
AzSTC-5	<i>Azospirillum</i>	Trigo	Saltillo
AceGN2	<i>Acetobacter</i>	Nopal	General Cepeda

BPCV = Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal.

Actividad nitrogenasa

Se midió la actividad nitrogenasa de las rizobacterias mediante el método indirecto de la actividad reductora de acetileno (ARA), se utilizó el medio NFb semigelificado (Döbereiner *et al.*, 1976) dicha prueba fue basada en la técnica de Hardy *et al.* (1973). Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (Hewlett 5890 Packard series II con

columna Poraplot Q 25 mx 0,3 mm) para determinar la cantidad de etileno reducido.

Producción de ácido indolacético

Se cuantificó la producción de ácido indolacético (AIA) utilizando medio líquido Luria – Bertani (LB), las muestras se incubaron por 3 días en agitador (Thermo Scientific MaxQ2000) a 200 rpm durante 4 días, después se tomó 1 mL de cada muestra para ser centrifugada a 14000 rpm por 25 minutos, se tomó un alícuota de 150 μ L de cada muestra y se llevó a microplaca con 96 pozos a cada uno se le añadió 100 μ L de reactivo Salkowski (Glickmann y Dessaux, 1995), después permanecieron en obscuridad por 30 minutos. Las absorbancias fueron tomadas por espectrofotómetro con lector de microplaca (Synergy 2 microplate reader, Biotek instruments, Inc.).

Solubilización de fósforo

Se utilizó medio de cultivo Pikovskaya's (1948), para lo cual las muestras se agitaron a 200 rpm durante 7 días, transcurrido el tiempo se tomó 1 mL del sobrenadante se centrifugó y colocó en microplacas, a las cuales se añadieron 100 μ L de vanadato de sodio 5 % y 100 μ L de molibdato de sodio, luego se dejaron reposar por 5 minutos y se tomaron las lecturas en espectrofotómetro con lector de microplaca (Synergy 2 microplate reader, Biotek instruments, Inc.).

Preparación de inoculantes bacterianos

Las 3 cepas aisladas de *Azospirillum* y la de *Acetobacter* sp. fueron sembradas en caldo nutritivo líquido y puestas en incubadora (Precisión Scientific 815) durante 7 días a 29° C para su multiplicación, la suspensión obtenida fue de 1×10^{10} UFC mL⁻¹ y nuevamente con el método de diluciones seriadas se prepararon los inóculos 10^6 y 10^4 UFC mL⁻¹ para cada cepa.

Inoculación bacteriana en plantas de chile jalapeño

Esta etapa se realizó bajo condiciones de invernadero, las semillas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”) fueron sembradas el 5 de Julio de 2012 en charola de poliestireno de 200 cavidades, utilizando como sustrato peat moss y perlita (1:1). Las plántulas se trasplantaron 31 días después de la siembra (DDS) en macetas de polietileno color negro de 20 L con sustrato peat moss y perlita (1:1). A los 30 y 60 días después del trasplante (DDT) se realizaron las inoculaciones bacterianas con volumen de 50 mL, al testigo solo se le aplicó agua, las concentraciones de inóculo fueron de 10^4 y 10^6 UFC mL⁻¹ de cada cepa. Se utilizó la solución nutritiva Steiner (1961) completa y modificada en el contenido de nitrógeno (Cuadro 2). La solución nutritiva se fue adaptando según las etapas del desarrollo del cultivo al 25, 50, 75 y 100% (meqL⁻¹ de 12 de NO₃, 1 de H₂PO₄, 7 de K y 2 de SO₄) durante el trasplante, desarrollo vegetativo, floración y fructificación respectivamente. El número de tratamientos fueron nueve, siendo estos: AzGT1 (10^6 UFC mL⁻¹), AzGT1 (10^4 UFC mL⁻¹), AzTCH3 (10^6 UFC mL⁻¹), AzTCH3 (10^4 UFC mL⁻¹), AzSTC-5 (10^6 UFC mL⁻¹), AzSTC-5 (10^4 UFC mL⁻¹), AceGN2 (10^6 UFC mL⁻¹),

AceGN2 (10^4 UFC mL⁻¹) y un testigo. Durante los riegos en las plantas se usó solución nutritiva Steiner modificada con el 20% de nitrógeno para todos los tratamientos excepto el Testigo, debido que para este se aplicó la solución Steiner completa (Cuadro 2). El sistema de riego para cada tratamiento fue independiente para evitar contaminación. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar. Las macetas fueron acomodadas en trasbolillo con una separación de 40 cm entre ellas. Las variables de respuesta fueron peso fresco aéreo (PFA), peso seco aéreo (PSA), peso fresco raíz (PFR), peso seco raíz (PSR), longitud de raíz (LR), peso fresco de fruto (PFF) y peso seco de fruto (PSF), se realizaron 3 muestreos destructivos a los 30, 62 y 92 días después del trasplante (DDT). Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA con una prueba de comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$), los datos fueron procesados en el paquete estadístico SAS versión 9.0.

Cuadro 2. Solución Steiner aplicada durante el experimento.

Table 2. Steiner solution applied during the experiment.

Compuesto	SSC	SSM (20% N)
Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	1060	250
MgSO ₄ · 7H ₂ O	487	494
KNO ₃	71	0
K ₂ SO ₄	347	610
CaSO ₄ · 2H ₂ O	0	535
H ₃ PO ₄	0	150
KH ₂ PO ₄	211	0

SSC = Solución Steiner Completa; SSM = Solución Steiner Modificada. Las unidades están expresadas en partes por millón (ppm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis físicos y químicos realizados a los suelos corroboran su clasificación y composición (Cuadro 3), además tienen los nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento de bacterias, debido a que hubo comunidad bacteriana donde se encontró predominio de bacterias *Azospirillum* con respecto a las *Acetobacter* en los diferentes tipos de suelo muestreados, como lo fue con la cepa AzSTC-5 de *Azospirillum* con mayor población bacteriana con 153×10^8 UFC mL^{-1} (Cuadro 4) esto podría deberse a la capacidad de las bacterias para adherirse a las partículas de arcillas (Pazos *et al.*, 2000).

Cuadro 3. Propiedades químicas y físicas del suelo donde fueron extraídas las rizobacterias en estudio.

Table 3. Chemical and physical properties of the ground where they were extracted the rhizobacteria in study.

Cepas (suelo)	N (%)	P	K	Ca (ppm)	Mg	pH	C.E.mS/cm	Clase textural
AzGT1	0.088	4.76	300	184	40	7.61	3.66	M.A.
AzTCH3	0.145	4.18	1400	6000	68	7.36	7.69	M.A.
AzSTC-5	0.260	5.37	0.374	3605	-	7.8	1.35	F.A.
AceGN2	0.096	5.76	260	97	21	7.67	2.71	M.A.

M.A.=Migajón arcilloso; F.A.=Franco arenoso.

Cuadro 4. Unidades formadoras de colonias de cepas *Azospirillum* y *Acetobacter*.

Table 4. Colony-forming units of *Azospirillum* strains and *Acetobacter*.

Cepa	10^7 (UFC mL^{-1})	10^8 (UFC mL^{-1})	10^9 (UFC mL^{-1})
AzGT1	72	59	43
AzTCH3	69	48	32
AzSTC-5	10^8 (UFC mL^{-1}) 153	10^9 (UFC mL^{-1}) 20	10^{10} (UFC mL^{-1}) 2
AceGN2	10^4 (UFC mL^{-1}) 9	10^5 (UFC mL^{-1}) 4	10^6 (UFC mL^{-1}) 2

UFC mL^{-1} = Unidades formadoras de colonias por mililitro.

Aislamientos bacterianos

En base a la caracterización a nivel de género, se obtuvieron cepas Gram negativas en forma de bacilos con forma redonda, las características de color, borde, elevación, consistencia y longitud variaron para cada cepa como se puede observar en el Cuadro 5 y con respecto a la prueba de la enzima catalasa fue positiva, lo cual indica una actividad oxidoreductora y microaerofílica de las cepas característica propia de algunas bacterias fijadoras de nitrógeno.

Cuadro 5. Características morfológicas de cepas nativas aisladas.

Table 5. Morphological characteristics of native strains isolated.

Cepa	Gram	Forma	Cat	Morfología					
				Forma	Color	Borde	Elevación	Consistencia	Long.
AzGT1	Negativa	Bacilos	+	Redonda	Beige	Entero	Cóncava	Seca-viscosa	2 mm
AzTCH3	Negativa	Bacilos	+	Redonda	Verde claro	Entero ondulado	Cóncava	Viscosa	2.5 mm
AzSTC5	Negativa	Bacilos	+	Redonda	Crema	Entero	Cóncava	Viscosa	2.5 mm
AceGN2	Negativa	Bacilos	+	Redonda	Crema	Entero	Plana	Viscosa	2 mm

Efecto de rizobacterias en el crecimiento y desarrollo de plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. Híbrido “Grande”)

En cuanto al efecto de las rizobacterias en plantas de chile jalapeño, todos los tratamientos demostraron efectos positivos en las variables en estudio (PFA, PSA, PFR, PSR, LR, PFF y PSF). Pero la cepa AzSTC-5 aislada de raíces de trigo ha demostrado provocar un importante desarrollo vegetal en plantas de chile jalapeño como lo fue en el peso fresco y seco aéreo (PFA y PSA), los cuales fueron incrementados en promedio un 31% y 43 % más que el

testigo, durante los tres muestreos con este tratamiento AzSTC-5 a una concentración de 10^6 UFC ml^{-1} (Cuadro 6). Esto es similar con lo reportado por Canto *et al.* (2004) que inocularon cepas de *Azospirillum* sp., en plantas de chile habanero, lo cual también provocó diferencias estadísticas ($P \leq 0.0001$) en biomasa seca a diferencia del testigo. También el peso fresco de raíz (PFR) fue estimulado por esta cepa con las dos concentraciones 10^6 y 10^4 UFC ml^{-1} debido a que las raíces presentaron 61% más peso fresco que el testigo en el primer muestreo (Cuadro 7) y en los posteriores muestreos el mismo tratamiento AzSTC-5 pero con la concentración mayor 10^6 UFC ml^{-1} incrementó simultáneamente el peso fresco y seco de raíz (PFR y PSR) en 75% más que el testigo (Cuadro 7), la concentración de inóculo 10^6 UFC mL^{-1} predominó debido a que la mayor cantidad de biomasa microbiana favorece el crecimiento vegetal debido a la mayor liberación de sustancias (Bastida *et al.*; 2008). Además Hernández *et al.* (1996) mencionan que las óptimas dosis de inóculo bacteriano oscilan entre 10^4 a 10^8 UFC mL^{-1} en el desarrollo aéreo y radicular en plantas de sorgo.

Cuadro 6. Respuesta del peso fresco y seco de plantas de chile jalapeño inoculadas con cepas de *Azospirillum* y *Acetobacter* sp. a diferentes concentraciones de inóculo durante los tres muestreos.

Table 6. Response of the fresh and dry weight of plants of jalapeno chilli inoculated with strains of *Azospirillum* and *Acetobacter* sp. to different concentrations of inoculum during the three samplings.

Tratamientos (Cepas)		M1		M2		M3	
		PFA	PSA	PFA	PSA	PFA	PSA
AceGN2	(1)	4.75 ab	1.75 ab	149.42 b	53.72 bc	169.67 bc	63.87 ab
AceGN2	(2)	4.45 b	1.42 ab	138.8 b	49.92 c	147.79 d	54.76 b
AzTCH3	(1)	4.55 b	1.47 ab	143.24 b	50.85 bc	149.85 cd	57.25 b
AzTCH3	(2)	4.42 b	1.40 ab	137 b	48.86 c	145.90 d	53.82 b
AzGT1	(1)	4.61 b	1.52 ab	145.7 b	52.24 bc	153.86 cd	60.70 ab
AzGT1	(2)	4.47 b	1.45 ab	141.25 b	50.77 bc	149.16 cd	54.85 b
AzSTC-5	(1)	5.47 a	1.85 a	185.12 a	66.42 a	191.25 a	74.75 a
AzSTC-5	(2)	4.90 ab	1.81 ab	175.75 a	56.67 b	189.5 ab	64.41 ab
Testigo	(SN)	4.27 b	1.27 b	135.32 b	48.13 c	144.7 d	50.72 b
C.V. %		6.7	15.16	4.13	4.9	5.43	11.87

Medias con la misma letra dentro de la misma columna, son estadísticamente iguales. C.V. % = Coeficiente de variación. Todas las concentraciones de los tratamientos se encuentran en UFC mL⁻¹. Los valores en resultados están expresados en gramos. (1) = 10⁶ UFC mL⁻¹; (2) = 10⁴ UFC mL⁻¹. SN = Sin inóculo. M1, M2 Y M3 = Muestreos 1, 2 y 3.

Cuadro 7. Respuesta del Peso fresco y seco de Raíz en plantas de chile jalapeño inoculadas con cepas de *Azospirillum* y *Acetobacter* sp. a diferentes concentraciones de inóculo durante los tres muestreos.

Table 7. Response of the fresh and dry weight of root in plants of jalapeno chilli inoculated with strains of *Azospirillum* and *Acetobacter* sp. to different concentrations of inoculum during the three samplings.

Tratamientos (Cepas)		M1		M2		M3	
		PFR	PSR	PFR	PSR	PFR	PSR
AceGN2	(1)	2.00 ab	0.75 a	29.51 ab	5.60 abc	33.12 abc	6.71 ab
AceGN2	(2)	1.77 abc	0.71 ab	26.95 bc	4.90 cde	29.00 bc	5.00 cde
AzTCH3	(1)	1.81 abc	0.73 a	27.25 bc	5.29 abcde	32.60 abc	5.92 bc
AzTCH3	(2)	1.45 bc	0.68 ab	25.26 bc	4.12 e	28.90 bc	4.94 de
AzGT1	(1)	1.92 abc	0.75 a	27.21 bc	5.62 abcd	32.60 abc	5.95 bc
AzGT1	(2)	1.79 abc	0.72 a	27.16 bc	4.95 bcde	29.52 bc	5.67 cd
AzSTC-5	(1)	2.28 a	0.85 a	32.60 a	6.42 a	37.13 a	7.15 a
AzSTC-5	(2)	2.20 a	0.76 a	32.15 a	6.22 ab	34.75 ab	6.85 ab
Testigo	(SN)	1.38 c	0.50 b	23.22 c	4.45 de	28.00 c	4.70 e
C.V. %		13.21	12.45	6.82	10.02	7.95	6.70

Medias con la misma letra dentro de la misma columna, son estadísticamente iguales. C.V. % = Coeficiente de variación. Todas las concentraciones de los tratamientos se encuentran en UFC mL⁻¹. Los valores en resultados están expresados en gramos. (1) = 10⁶ UFC mL⁻¹; (2) = 10⁴ UFC mL⁻¹. SN = Sin inóculo. M1, M2 Y M3 = Muestreos 1, 2 y 3.

Por otro lado, también la variable longitud de raíz (LR) incrementó un 47% con el tratamiento AzSTC-5 bajo las dos concentraciones de inóculo 10⁶ y 10⁴ UFC mL⁻¹ durante los tres muestreos (Cuadro 8). En la producción de frutos (Figura 1) se comprobó que la variable peso fresco de frutos (PFF) incrementó 39% más que el testigo con el tratamiento AzSTC-5 (10⁶ UFC mL⁻¹) durante la primer evaluación. Para las posteriores evaluaciones se presentaron diferencias estadísticas ($P \leq 0.0001$) en relación con el testigo por parte de los tratamientos AceGN2 (10⁶ UFC mL⁻¹), AzSTC-5 (10⁶ UFC mL⁻¹) y AzSTC-5 (10⁴ UFC mL⁻¹) a pesar de esto el tercer muestreo dio a conocer que el tratamiento más eficiente para incrementar el peso fresco de frutos (PFF) fue nuevamente AzSTC-5 (10⁶ UFC mL⁻¹). En relación con este resultado la ganancia del peso seco de frutos

(PSF) incrementó 48% más que el testigo (Figura 2) con el mismo tratamiento. El rendimiento obtenido mediante el peso de frutos por planta se observa en la Figura 3 que los tratamientos AzSTC-5 (10^4 UFC ml^{-1}) y AzSTC-5 (10^6 UFC ml^{-1}) elevaron el peso de frutos a diferencia del testigo con 19 y 22 % respectivamente (Figura 3).

Cuadro 8. Respuesta de la longitud de raíz de plantas de chile jalapeño inoculadas con cepas de *Azospirillum* y *Acetobacter* sp. a diferentes concentraciones de inóculo durante los tres muestreos.

Table 8. Response of the root length of jalapeno chilli plants inoculated with strains of *Azospirillum* and *Acetobacter* sp. to different concentrations of inoculum during the three samplings.

Tratamientos (Cepas)		Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3
AceGN2	(1)	18.65 ab	45.75 a	70.50 ab
AceGN2	(2)	15.32 cde	39.75ab	66.26 ab
AzTCH3	(1)	16.85 bcd	43.75 a	68.93 ab
AzTCH3	(2)	14.05 de	39.00 ab	60.40 bc
AzGT1	(1)	18.32 abc	45.30 a	69.26 ab
AzGT1	(2)	15.92 bcde	42.75ab	66.50 ab
AzSTC-5	(1)	20.75 a	47.00 a	74.50 a
AzSTC-5	(2)	20.37 a	46.62 a	71.10 a
Testigo	(SN)	13.45 e	31.50 b	51.33 c
C.V. %		7.75	11.07	6.42

Medias con la misma letra dentro de la misma columna, son estadísticamente iguales. C.V. % = Coeficiente de variación. Todas las concentraciones de los tratamientos se encuentran en UFC mL^{-1} . Los valores en resultados están expresados en gramos. (1) = 10^6 UFC ml^{-1} ; (2) = 10^4 UFC ml^{-1} . (SN) = Sin inóculo.

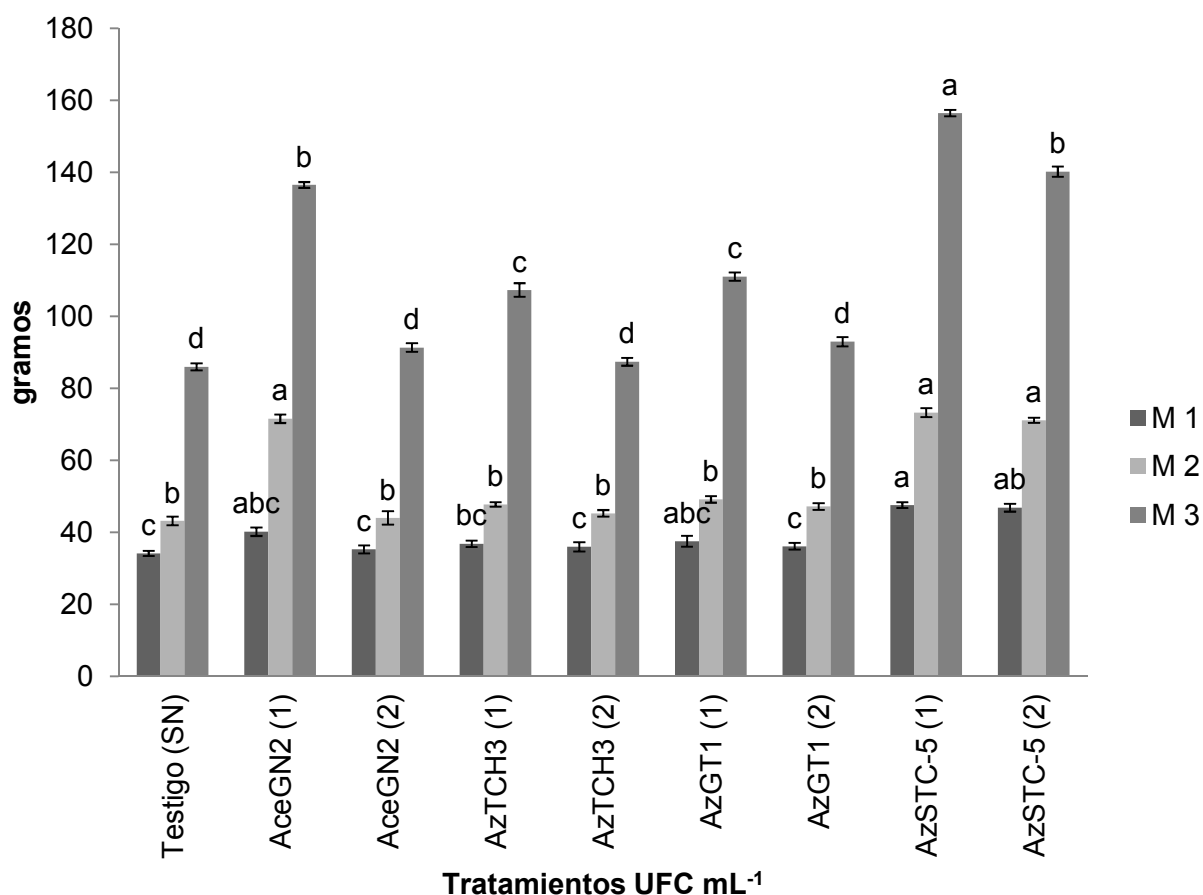


Figura 1. Peso fresco de frutos de chile jalapeño en plantas inoculadas con *Azospirillum* y *Acetobacter* a diferente concentración de inóculo. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey $P \leq 0.05$). (1) = 10^6 UFC ml^{-1} ; (2) = 10^4 UFC ml^{-1} . (SN) = Sin inóculo. M1, M2 Y M3 = Muestras 1, 2 y 3.

Figure 1. Fresh weight of fruits of jalapeno chilli in plants inoculated with *Azospirillum* and *Acetobacter* to different concentration of inoculum during the three samplings. Different letters indicate significant differences (Tukey $P \leq 0.05$). (1) = 10^6 CFU mL^{-1} ; (2) = 10^4 CFU mL^{-1} . (SN) = without inoculum. M1, M2 and M3 = Samples 1, 2 and 3.

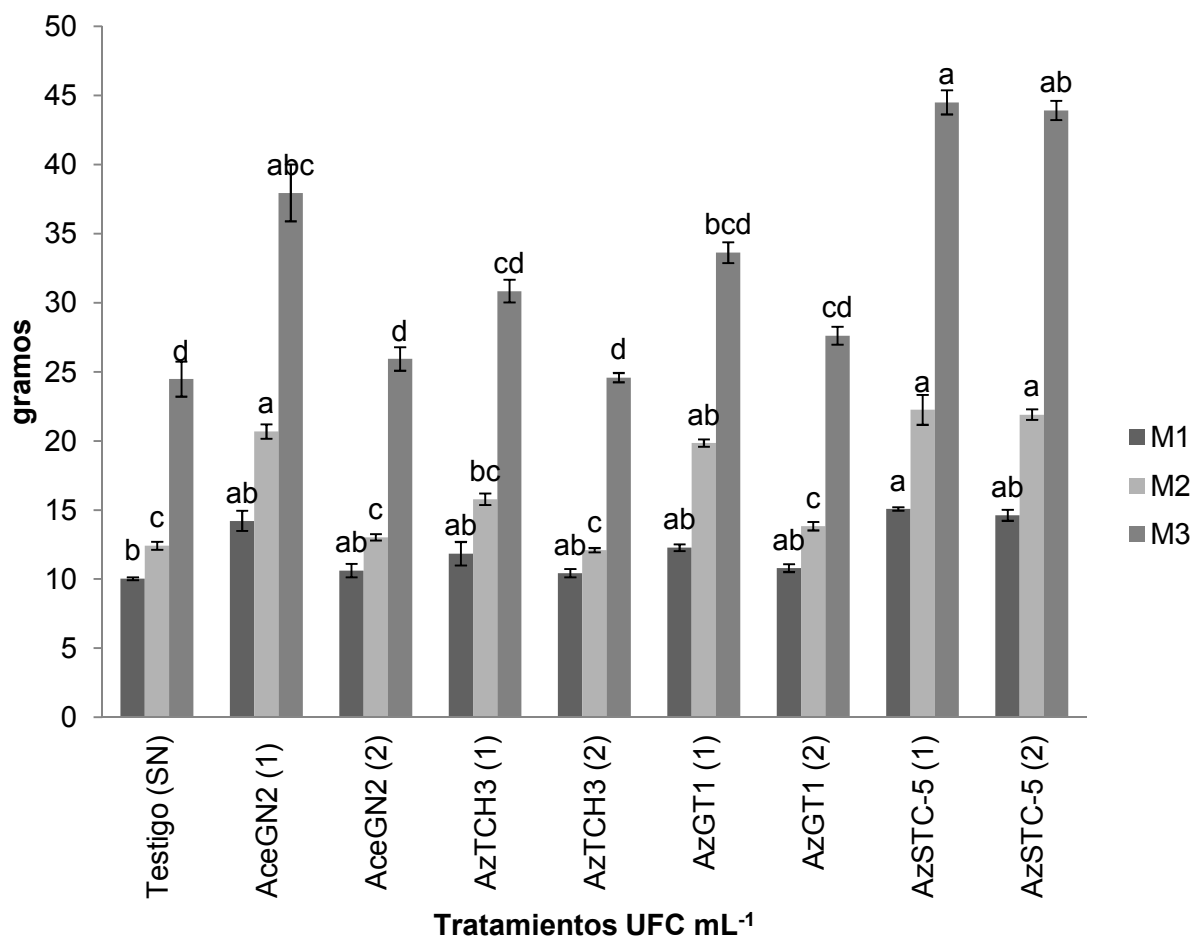


Figura 2. Peso seco de frutos de chile jalapeño en plantas inoculadas con *Azospirillum* y *Acetobacter* a diferente concentración de inóculo. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey $P \leq 0.05$). (1) = 10^6 UFC mL^{-1} ; (2) = 10^4 UFC mL^{-1} . (SN) = Sin inóculo. M1, M2 Y M3 = Muestras 1, 2 y 3.

Figure 2. Dry weight of fruits of jalapeno chilli in plants inoculated with *Azospirillum* and *Acetobacter* to different concentration of inoculum during the three samplings. Different letters indicate significant differences (Tukey $P \leq 0.05$). (1) = 10^6 CFU mL^{-1} ; (2) = 10^4 CFU mL^{-1} . (SN) = without inoculum. M1, M2 and M3 = Samples 1, 2 and 3.

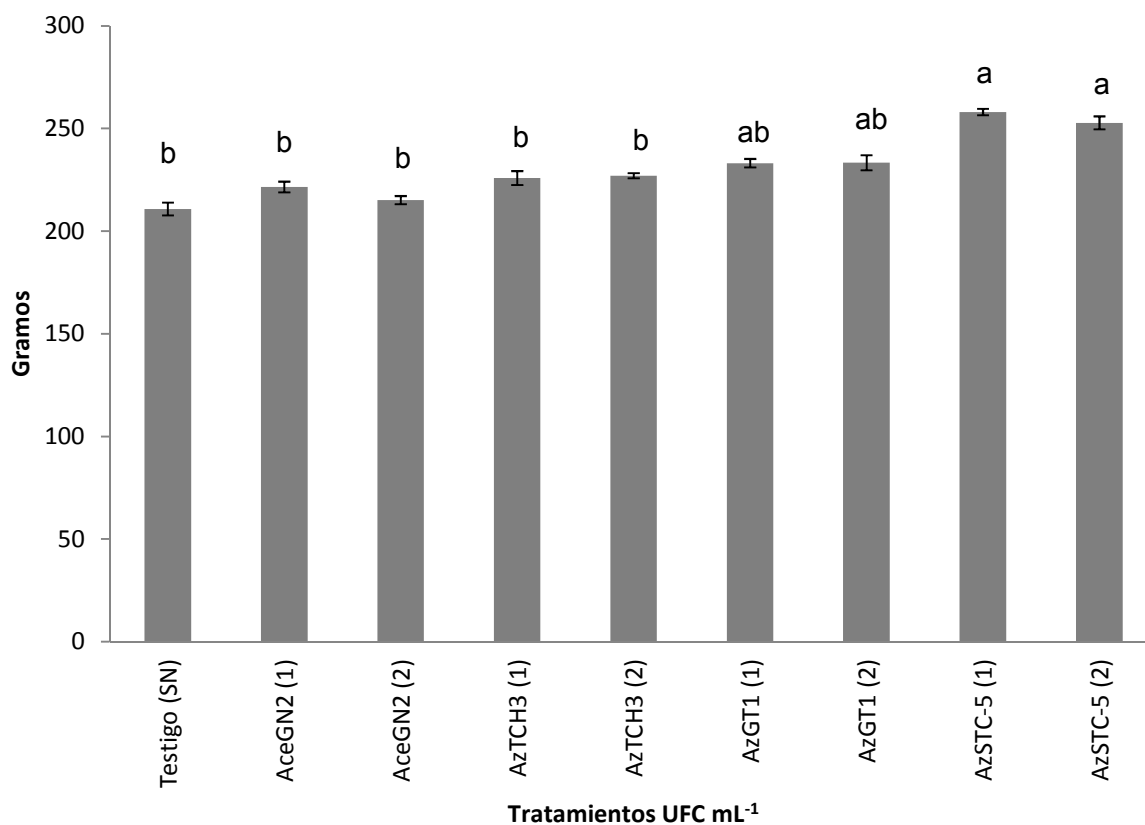


Figura 3. Peso de frutos de plantas inoculadas con *Azospirillum* y *Acetobacter* a diferente concentración de inóculo. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey $P \leq 0.05$). (1) = 10^6 UFC ml⁻¹; (2) = 10^4 UFC ml⁻¹. (SN) = Sin inóculo.

Figure 3. Weight of fruit plants inoculated with *Azospirillum* and *Acetobacter* to different concentration of inoculum during the three samplings. Different letters indicate significant differences (Tukey $P \leq 0.05$). (1) = 10^6 CFU ml⁻¹; (2) = 10^4 CFU ml⁻¹. (SN) = without inoculum.

De acuerdo con la caracterización (Cuadro 9), esta bacteria AzSTC-5 produce $17.94 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido indolacético (AIA), lo cual es una cantidad menor en comparación con *Azospirillum brasilense* sp-7 que produce $40.17 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA en condiciones *in vitro* (Obando *et al.*, 2010). Aunque en condiciones *in vitro* AzSTC-5 produce pequeñas cantidades de AIA en raíces de

plantas de chile jalapeño mejoró sus mecanismos quizá porque la raíz le proporciona los insumos que regula la bacteria debido a que la composición de microorganismos depende de la cantidad y calidad de los exudados radicales (Rengel, 1997) logrando incrementar el crecimiento de raíces para facilitar la absorción de agua, nutrientes e incremento en rendimiento (Dobbelaere *et al.*, 2002). Además, la producción de AIA por *Azospirillum* en bajas concentraciones es el principal mecanismo para promover el crecimiento vegetal y la elongación celular de raíces (Pazos *et al.*, 2000) (Ross *et al.*, 2000).

Cuadro 9. Caracterización de cepas en estudio aisladas de tomate, chile, trigo y nopal.

Table 9. Characterization of strains isolated in study of tomato, pepper, wheat and prickly pear.

Cepa	Actividad nitrogenasa (nmoles C ₂ H ₄ · 1h ⁻¹ · vial)	Indoles totales (µg mL ⁻¹)	Fosfato soluble (µg mL ⁻¹)
AzGT1	0.13 b	59.78 c	33.57 d
AzTCH3	1.15 b	84.14 b	161.23 b
AzSTC-5	0.12 b	17.94 d	277.22 a
AceGN2	3.70 a	181.76 a	123.73 c
Testigo	0.14 b	0.00 e	0.72 e
C.V.%	55.79	8.00	6.92
Media	1.05	68.72	119.29

Medias con la misma letra dentro de la misma columna, son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0,05$). C.V. % = Coeficiente de variación.

Otro mecanismo clave para estimular el desarrollo vegetal en plantas de chile pudo ser la solubilización de fósforo, de acuerdo con el Cuadro 9 la cepa AzSTC-5 solubiliza 277.22 µg mL⁻¹ de fósforo tricálcico, este valor es superior al de bacterias *Bradyrhizobium* aisladas de nódulos de soja, las cuales solubilizan fósforo con valores de 30 a 241 µg mL⁻¹ (Fernández *et al.*, 2005)

cabe mencionar que AzSTC-5 no presenta formación de nódulos sino que es de vida libre, lo cual lo hace una bacteria altamente solubilizadora de fosforo en condiciones *in vitro*.

Por otro lado, la actividad nitrogenasa por parte de las cepas en estudio fue baja (Cuadro 9), como AzSTC-5 que presentó el menor valor con actividad de 0.12 nmoles de C_2H_4 $h^{-1}mL^{-1}$. También cepas *Azospirillum* aisladas de la rizósfera de pasto guinea presentaron una actividad nitrogenasa menor a 1 nmol C_2H_4 $h^{-1}mL^{-1}$ (Cárdenas *et al.*, 2010). De acuerdo con Carcaño *et al.* (2006) los valores bajos de actividad nitrogenasa en bacterias podría deberse a que la producción de AIA fue elevada, como en el caso de cepas AzGT1, AzTCH3 y AceGN2, las cuales presentaron proporciones altas de AIA con 59.78, 84.14 y 181.76 μg mL^{-1} respectivamente, esto es mayor en comparación con Perrig *et al.* (2007) quienes encontraron valores de AIA con 2,9 μg mL^{-1} en *Azospirillum brasilense* y en el caso de cepas *Acetobacter* se han obtenido valores de 9.25 a 32.14 μg mL^{-1} de AIA (Rojas *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

La biofertilización con la cepa *Azospirillum* (AzSTC-5) aislada de la rizósfera de trigo reduce el uso de fertilizante químico nitrogenado, incrementa la biomasa vegetal y elongación radicular en plantas de chile jalapeño con las dosis de inóculo utilizadas, además es altamente solubilizadora de fósforo lo cual la hace una bacteria interesante para posteriores evaluaciones en el campo de la agronomía.

LITERATURA CITADA

- Abril, A., Biasutti, C., Maich, R., Dubbini, L. y Noe, L. 2006. Inoculación con *Azospirillum* spp. en la región semiárida – central de Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica. *Ciencia del Suelo (Argentina)*. 24: 11 – 19.
- Anand – Kumar, S. P., Sobhakumari, V .P., Loganathan, P. y Vimal – Venkatesh, M. 2004. Improved *in vitro* culture methodology in sugarcane by introducing *Azospirillum* sp and *Gluconoacetobacter* sp. *Sugar Tech*. 6: 69 -72.
- Armenta – Bojorquez, A. D., García – Gutiérrez, C., Camacho – Báez, J. R., Apodaca – Sanchez, M. A., Montoya, L. G. y Nava – Pérez, E. 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*. 6: 51 – 56.
- Bashan, Y., Holguin, G. and Lifshitz, R. 1993. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria. *In: Methods in plant molecular biology and biotechnology*. Glick, B. R. and Thompson, J. E. (Eds). 1º edition. Editorial CRC. (p. 337 – 338).
- Bastida, F., Kandeler, E., Moreno, J. L., Ros, M., García, C. and Hernández, T. 2008. Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*. 40: 318 – 329.
- Camelo. M., Vera. S. P. y Bonilla, R. R. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 12: 159 – 166.
- Canto – Martin, J.C., Medina – Peralta, S. y Morales – Avelino, D. 2004. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de chile habanero (*Capsicum chinese* jacquin). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 4: 21 – 27.
- Carcaño – Montiel, M. G., Ferrera - Cerrato, R., Pérez - Moreno, J., Molina - Galán, J. D. y Bashan, Y. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebisella* aisladas de maíz y teocintle. *Revista Terra Latinoamericana*. 24: 493 – 502.
- Cárdenas, D. M., Garrido, M. F., Bonilla, R. R. and Baldani, V. L. 2010. Isolation and identification of *Azospirillum* sp. in Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) of the Valle del César. *Pastos y Forrajes*. 33: 1 – 1.

- Cojho, E. H., Reis, V. M., Schenberg, C.G. and Döbereiner, J. 1993. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen – free batch culture. FEMS Microbiology letters. 106: 341 – 346.
- Cavalcante, V. A. and Dobereiner, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. Plant and soil. 108: 23 – 31.
- De Grazia, J., Tittonell P. A. y Chiesa, A. 2006. Efecto de sustratos con compost y fertilización nitrogenada sobre la fotosíntesis, precocidad y rendimiento de pimiento (*Capsicum annum*). Ciencia e Investigación Agraria. 34: 195 – 204.
- Dibut, C. B., Martínez, R., Ríos, Y., Plana, L., Rodríguez, J., Ortega, M. and Tejada, G. 2010. Association study *Gluconoacetobacter diazotrophicus* – Vianden. Tropical red soil Ferralitic. I. Effective for selection of strains of sweet potato biofertilization, Cassava and taro. Cultivos tropicales. 31: 00 -00. ISSN 0258 – 5936.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y. and Vanderleyden, J. 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Biology and Fertility of Soils. 36: 284 – 297.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y. 2003. Plant growth – promoting effects of diazotrophs in the Rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences. 22: 107 – 149.
- Döbereiner, J. and Day, J.M. 1976. Associative symbiosis in tropical grasses. Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. *In*: Proceedings of the first international symposium on nitrogen fixation. (Eds) Washington State University Press, Pullman. Pp. 518 – 538.
- Döbereiner, J., Marriel, I. E. and Nery, M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Canadian Journal of Microbiology. 22: 1464 – 1473.
- Fernández, L. E., Zabala, P., Gómez, M. A. y Sagardoy, M. A. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. Ciencia del Suelo (Argentina). 23: 31 – 37.
- Glickmann, E. and Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 61: 793 – 796.

- Hardy, R. W. F., Burns, R. C. and Holsten, R. D. 1973. Applications of the acetylene – ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology & Biochemistry*. 5: 47 – 81.
- Hernández, Y., Sarmiento, M. and García, O. 1996. Influence of the *Azospirillum* inoculation model on grass performance. *Cuban Journal of Agriculture Science*. 30: 219 – 226.
- Luna – Martínez, L., Martínez – Peniche, R. A., Hernández – Iturriaga, M., Arvizu – Medrano, S . M. and Pacheco – Aguilar, J. R. 2013. Characterization of rhizobacteria isolated from tomato and their effect on tomato and bell pepper growth. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36: 63 – 69.
- Madhaiyan, M., Saravanan, V. S., Bhakiya - Silbai, D., Hyoungseok – Lee, R., Thenmozhi K. and Tongmin, Sa. 2004. Occurrence of *Gluconoacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiological Research*. 159: 233 – 243.
- Moreno, L.Y. y Galvis, F. 2013. Potencial biofertilizante de bacterias diazótropas aisladas de muestras de suelo rizósferico. *Pastos y Forrajes*. 36 (1) 33 – 37.
- Obando – Castellanos, D. M., Burgos – Zabala, L. B., Rivera – Botía, D. M., Rubiano – Garrido, M. F., Divan – Balandi, V. L. y Bonilla – Buitrago, R. R. 2010. Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, César (Colombia). *Acta Botánica Colombiana*. 15: 107 – 120.
- Pazos, M., Hernández, A., Paneque, M. y Santander, J. L. 2000. Caracterización de cepas del género *Azospirillum* aisladas de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Bari. *Cultivos Tropicales*. 21: 19 – 23.
- Perrig, D., Boiero, M. L., Masciarelli, O. A., Penna, C., Ruiz, O. A., Cassán, F. D. and Luna, M. V. 2007. Plant – growth – promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implication for inoculants formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75: 1143 – 1150.
- Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*. 17 : 362 – 370.
- Rengel, Z. 1997. Exudados de raíces y la microflora de la rizósfera de genotipo de cultivos que difieren en la tolerancia a la deficiencia de micronutrientes. *Plant Soil*. 196: 255 – 260.

- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M. and Priget – Combaret, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*. 321: 305 – 339.
- Rodríguez, H., González, T., Goire, I. and Bashan, Y. 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth – promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*. 91: 552 – 555.
- Rojas, M. M., Rodríguez, A. J., Trujillo, I. D. and Heydrich, M. 2009. Relationships between nitrogen fixation and auxins production in *Gluconoacetobacter diazotrophicus* strains from different crops. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11: 84 – 93.
- Ross, J. J., O'Neill, D. P., Smith, J.J., Kerckhoffs, L.H. and Elliott, R.C. 2000. Evidence that auxin promotes gibberellins A1 biosynthesis in pea. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*. 21: 547 – 552.
- Shankar – Sing, J., Chandra – Pandey, V. and Singh, D. P. 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 140: 339 – 353.
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A. and Vanderleyden, J. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*. 312: 15 – 23.
- Steiner, A. A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil*. 15: 134 – 154.
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Yu., Cherduntseva, T. A. and Netrusov, A. I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 42: 117 – 126.

V. CONCLUSIONES GENERALES

- El desarrollo de plántula de chile desde su germinación hasta el estado de plántula en condiciones *in vitro* se vio influenciado positivamente con las cepas *Azospirillum* (AzGN3, AzGT1, AzTT2 y (AzTCH3) aisladas de raíces de nopal, tomate y chile, sin embargo estas cepas realizan su función de acuerdo a la concentración de inóculo con que sean aplicadas.
- El desarrollo del cultivo de chile jalapeño en condiciones de invernadero fue promovido significativamente por la cepa *Azospirillum* (AzSTC-5) aislada de trigo (Mendoza, 2009), la cual redujo la cantidad de fertilizante nitrogenado e incrementó el crecimiento y desarrollo del cultivo.
- Con respecto a la caracterización, la cepa *Acetobacter* (AceGN2) aislada de raíces de nopal produce alta cantidad de ácido indolacético y nuevamente la cepa AzSTC-5 de *Azospirillum* se da a conocer como altamente solubilizadora de fósforo.
- Las cepas en estudio demuestran que su comportamiento y función son influenciados por las condiciones ambientales a las que son expuestas.

- Los resultados de la investigación permitieron identificar cepas nativas promotoras del crecimiento vegetal.

VI. LITERATURA CITADA

- Abril, A., Biasutti, C., Maich, R., Dubbini, L. y Noe, L. 2006. Inoculación con *Azospirillum* spp. en la región semiárida – central de Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica. *Ciencia del Suelo (Argentina)*. 24: 11 – 19.
- Alexandre, G. y Zhulin, I. B. 2001. More than one way to sense chemicals. *J. Bacteriol.* 183: 4681-4686.
- Anand – Kumar, S. P., Sobhakumari, V .P., Loganathan, P. y Vimal – Venkatesh, M. 2004. Improved *in vitro* culture methodology in sugarcane by introducing *Azospirillum* sp and *Gluconoacetobacter* sp. *Sugar Tech.* 6: 69 -72.
- Armenta – Bojorquez, A. D., García – Gutiérrez, C., Camacho – Báez, J. R., Apodaca – Sánchez, M. A., Montoya, L. G. y Nava – Pérez, E. 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*. 6: 51 – 56.
- Bashan, Y., Holguin, G. and Lifshitz, R. 1993. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria. *In* *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. Glick, B. R. and Thompson, J. E. (Eds). 1º edition. Editorial CRC. (p. 337 – 338).
- Bastida, F., Kandeler, E., Moreno, J. L., Ros, M., García, C. and Hernández, T. 2008. Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*. 40: 318 – 329.
- Bosland, P. W. and E. J. Votava. 2000. Peppers: vegetable and spice Capsicums. CABI Publishing. New York. 204 p.
- Camelo. M., Vera. S. P. y Bonilla, R. R. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 12: 159 – 166.

- Canto – Martin, J.C., Medina – Peralta, S. y Morales – Avelino, D. 2004. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de chile habanero (*Capsicum chinese* jacquin). Tropical and Subtropical Agroecosystems. 4: 21 – 27.
- Carballo, C.A. 1992. La calidad genética y su importancia en la producción de semillas. *In*: Mendoza OL, Favela CE, Cano RP, Esparza MJH (1992).
- Situación actual de la producción, investigación y comercio de semillas en México. Memoria tercer Simposium, Torreón, Coahuila, México. pp. 80–101.
- Carcaño – Montiel, M. G., Ferrera - Cerrato, R., Pérez - Moreno, J., Molina - Galán, J. D. y Bashan, Y. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. Revista Terra Latinoamericana. 24: 493 – 502.
- Cárdenas, D. M., Garrido, M. F., Bonilla, R. R. and Baldani, V. L. 2010. Isolation and identification of *Azospirillum* sp. in Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) of the Valle del César. Pastos y Forrajes. 33: 1 – 1.
- Cavalcante, V.A. and Döbereiner, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. Plant and soil. 108: 23 – 31.
- Cojho, E. H., Reis, V. M., Schenberg, C.G. and Döbereiner, J. 1993. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen – free batch culture. FEMS Microbiology letters. 106: 341 – 346.
- Dalla - Santa, O.R., Dalla – Santa, H.S., Fernández, R., Michelena, G., Ronzelli - Júnior, P. and Soccol, C.R. 2008. Influence of *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats. *Ambiência*. 4:197 – 207.
- De Grazia, J., Tittonell P. A. y Chiesa, A. 2006. Efecto de sustratos con compost y fertilización nitrogenada sobre la fotosíntesis, precocidad y rendimiento de pimiento (*Capsicum annum*). Ciencia e Investigación Agraria. 34: 195 – 204.
- Di Barbaro, G., Pernasetti, S. and Stegmayer, A. 2005. Effects evaluation of *Azospirillum brasilense* inoculation on pepper (*Capsicum annum* L. Var. Trompa de elefante) seeds germination and plants emergence. Revista del CIZAS. 6: 74 – 85.
- Dibut, C. B., Martínez, R., Ríos, Y., Plana, L., Rodríguez, J., Ortega, M. and Tejada, G. 2010. Association study *Gluconoacetobacter diazotrophicus* – Vianden. Tropical red soil Ferralitic. I. Effective for selection of strains of

sweet potato biofertilization, Cassava and taro. *Cultivos tropicales*. 31: 00-00. ISSN 0258 – 5936.

- Dobbelaere, A. A. Thys, S. Vande. J Vanderleyden. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*. 212, 155-164.
- Dobbelaere, S., A Croonenborghs, Thys D, Ptacek D, Labandera C , Caballero J , Aguirre, J., Burdman, S., Sang, S., Okon, J. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. Journal. plant physiology*. 28: 871-879
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y. and Vanderleyden, J. 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils*. 36: 284 – 297.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y. 2003. Plant growth – promoting effects of diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 22: 107 – 149.
- Döbereiner J. 1992. The genero *Azospirillum* and *Herbaspirillum*, En A. Balows, H. G.Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Springer-Verlag. New York. p. 2236-2253.
- Döbereiner, J. and Day, J.M. 1976. Associative simbiosis in tropical grasses. Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. *In: Proceedings of the first international symposium on nitrogen fixation*. (Eds) Washington State University Press, Pullman. Pp. 518 – 538.
- Döbereiner, J., Marriell, I. E. and Nery, M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*. 22: 1464 – 1473.
- Döbereiner, J. 1978. Influence of environmental factors on the occurrence of *Spirillum lipoferum* in soils and roots. *Ecol. Bull. (Stockholm)* 26:343-352.
- Doria, J. 2010. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. Scielo. I Reserva Científica del departamento de Fitotecnia, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 13: 74 – 85.
- Drummond, M., Walmsley, J. and Kennedy, C. 1995. Expression form the nifB Promoter of *Azotobacter vinelandii* can be activated by NifA, VnfA, or AnfA Transcriptional Activators. *Journal of Bacteriology*. 178: 788 – 792.

- Eckert, B., Weber, O.B., Kirchhof, T., Halbritter, A., Stoffels, M. and Hartmann, A. 2001. Dobereineriae *Azospirillum* sp. noviembre, una bacteria fijadora de nitrógeno asociada con el C4 – grass Miscanthus. Int J Syst Evol Microbiol. 51: 17 – 26.
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C. y Mendoza, G. 2011. Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” en Lambayeque. Scientia Agropecuaria. 2: 39 – 49.
- Fernández, L. E., Zabala, P., Gómez, M. A. y Sagardoy, M. A. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. Ciencia del Suelo (Argentina). 23: 31 – 37.
- Ferrera – Cerrato, R. y Alarcón, A. 2007. Microbiología Agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta – microorganismo. Ed. Trillas. Pp. 162 – 166.
- Fuentes – Ramírez, L.E., Jiménez – Salgado, T., Abarca – Ocampo, I.R. y Caballero – Mellado, J. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, una bacteria productora de ácido indolacético aislado de cultivos de caña de azúcar de México. Plant and Soil. 154: 145 – 150.
- García, F., Muñoz, H., Carreño, C. y Mendoza, G. 2010. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque. Scientia Agropecuaria. 1: 107 – 116.
- Glickmann, E. and Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 61: 793 – 796.
- Hardy, R. W. F., Burns, R. C. and Holsten, R. D. 1973. Applications of the acetylene – ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biology & Biochemistry. 5: 47 – 81.
- Hernández, Y., Sarmiento, M. and García, O. 1996. Influence of the *Azospirillum* inoculation model on grass performance. Cuban Journal of Agriculture Science. 30: 219 – 226.
- Kapulnik, Y. S., Sarig, I., Nur, Y., Okon, and Y. Henis. 1985. The effect of *Azospirillum* on growth and yield of corn. Isr. J. Bot. 31:247-255.
- Kim, C., Kecskés, M. L., Deaker, R. J., Gilchrist, K., Nuevo, P. B. Kennedy, I. R., Kim S. and Sa, T. 2005. Wheat root colonization and nitrogenasa

- activity by *Azospirillum* isolates from crop plants in Korea. *Can J. Microbiol.* 51: 948 – 956.
- Koksunan, S., Vichitphan, S., Laopaiboon, L., Vichitphan, K. and Han, J. 2013. Growth and cyanide degradation of *Azotobacter vinelandii* in cyanide-containing wastewater system. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 23: 572 – 578.
- Krieg, N. and Dobereiner, J. 1984. *Bergey's Manual: Systematic bacteriology*, William and Wilkins, 282 p.
- Lara – Mantilla, C., Oviedo – Zumaqué, L.E. y Betancur – Hurtado, C.A. 2011. Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Revista Zootecnia Tropical.* 29: 187 – 194.
- Lee, S., Reth, A., Meletzus, D., Sevilla, M. and Kennedy, C. 2000. Characterization of a major cluster of *nif*, *fix* and associate genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Bacteriology.* 182: 7088 – 7091.
- López – Riquelme, G.O. 2003. Chilli “la especia del nuevo mundo”. *Ciencia.* 69: 66 – 75.
- Loredo – Osti, C., López – Reyes, L. y Espinosa – Victoria, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Revista Terra Latinoamericana.* 22: 225 – 239.
- Luna – Martínez, L., Martínez – Peniche, R. A., Hernández – Iturriaga, M., Arvizu – Medrano, S.M. and Pacheco – Aguilar, J. R. 2013. Characterization of rhizobacteria isolated from tomato and their effect on tomato and bell pepper growth. *Revista Fitotecnia Mexicana.* 36: 63 – 69.
- Macías – Duarte, R., Grijalva – Contreras, R.L. y Robles – Contreras, F. 2012. Respuesta de la aplicación de estiércol y fertilizantes sobre el rendimiento y cantidad del chile jalapeño. *Biotecnia. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud.* 14: 32 - 38.
- Madhaiyan, M., Saravanan, V. S., Bhakiya - Silba, D., Hyoungseok – Lee, R., Thenmozhi, K. and Tongmin, Sa. 2004. Occurrence of *Gluconoacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiological Research.* 159: 233 – 243.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. 1999. *Biología de los microorganismos*. Ed. Prentice Hall Iberia. 8va edición. Madrid España. P 986.

- Mascarúa – Esparza, M.A., Villa – González, R. and Caballero – Mellado, J. 1988. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from *Cactaceous* plants. *Plant and Soil*. 106: 91 – 95.
- Mendoza – Villarreal, R., Hernández – Florentino, A., Ramírez – Rodríguez, H., Molina – Abadía, G.S. y Quezada – Martín, M.R. 2009. “Efecto de cepas de *Azospirillum* sp. en la productividad del pimiento morrón” en *Agricultura sostenible Vol. 6*. Galdaméz G J, Guevara H F, Soto P L, Vázquez G M, (comp.). Universidad Autónoma de Chiapas. Ed. Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible, A. C. México. p.p.1:17. ISBN 978 – 607 – 8003 – 16 – 7.
- Moens, S., Michiels, K., Keijers, V., Van Leuven, F. and Vanderleyden, J. 1995. Cloning, sequencing, and phenotypic analysis of *laf1*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 177: 5419-5426.
- Molina, S., Mendoza, R., Torres, A., Sifuentes, D. y Rojas, B. 2009. Germinación de semillas de tomate cherry (*Lycopersicon pimpinellifolium*) inoculadas con diferentes cepas de *Azospirillum* sp. XIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas A.C. Torreón, Coahuila, México. P 49.
- Molla, A.H., Shamsuddin, Z.H. and Saud, H.M. 2001. Mechanism of root growth and promotion of nodulation in vegetable soybean by *Azospirillum brasilense*. *Com – mun. Soil Sci. Plant Anal.* 32: 2177 – 2187.
- Moreno, E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas, 1º. Ed. Instituto de Biología. UNAM. México, D.F. Pp. 250 – 252.
- Moreno, L.Y. and Galvis, F. 2013. Potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de muestras de suelo rizósferico. *Pastos y Forrajes*. 36 (1) 33 – 37.
- New, P. B., and Kennedy, I. R. 1989. Regional distribution and pH sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in Eastern Australia. *Microb. Ecol.* 17:299-309.
- Nuez, F., R. Gil – Ortega y J. Costa. 2003. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Ediciones Mundi – Prensa. Madrid, España. 586 p.
- Obando – Castellanos, D. M., Burgos – Zabala, L. B., Rivera – Botía, D. M., Rubiano – Garrido, M. F., Divan – Balandi, V. L. y Bonilla – Buitrago, R. R. 2010. Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, César (Colombia). *Acta Botánica Colombiana*. 15: 107 – 120.

- Orozco – Jaramillo, C. y Martínez – Nieto, P. 2009. Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. BOSQUE (Valdivia). 30: 70 – 77.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid. Can. J. Microbiol. 42: 207-220.
- Pazos, M., Hernández, A., Paneque, M. y Santander, J. L. 2000. Caracterización de cepas del género *Azospirillum* aisladas de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Bari. Cultivos Tropicales. 21: 19 – 23.
- Pedraza, R.O., Ramírez – Mata, A., Xiqui, M.L. and Baca, B.E. 2004. Aromatic amino acid aminotransferase activity and índole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. FEMS Microbiol Lett. 233: 15 – 21.
- Peil, R.M. y J.L. Gálvez. 2005. Reparto de materia seca como factor determinante de la producción de hortalizas de frutos cultivados en invernadero. Revista Brasileña de Agrociencia. 11: 05 – 11.
- Perrig, D., Boiero, M. L., Masciarelli, O. A., Penna, C., Ruiz, O. A., Cassán, F. D. and Luna, M. V. 2007. Plant – growth – promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implication for inoculants formulation. Applied Microbiology and Biotechnology. 75: 1143 – 1150.
- Piccinin, G.C., Braccini, A.L., Dan, L.G.M., Scapim, C.A., Ricci, T.T. and Bazo, G.L. 2013. Efficiency of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* on agronomic characteristics and yield of wheat. Industrial crops products. 43: 393 – 397.
- Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya. 17 : 362 – 370.
- Pogorelova, V.V., Bega, Z.T. and Kurdo, I.K. 2012. Interrelations of infusoria with *Azotobacter* and their influence on plants. Mikrobiol Z. 74: 48 – 54.
- Rangel – Lucio, J.A., Rodríguez – Mendoza, M.N., Ferrera – Cerrato, R., Castellanos – Ramos, J. Z., Ramírez – Gama, R.M. y Alvarado – Bárcenas, E. 2011. Agronomía Mesoamericana. 22: 269 – 279.
- Rengel, Z. 1997. Exudados de raíces y la microflora de la rizósfera de genotipo de cultivos que difieren en la tolerancia a la deficiencia de micronutrientes. Plant Soil. 196: 255 – 260.

- Reyes, I., Álvarez, L., El – Ayoubi, H. y Valery, A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimiento y maíz. *Bioagro*. 20: 37 – 48.
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M. and Priget – Combaret, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*. 321: 305 – 339.
- Rodelas, B., González – López, J., Pozo, C., Salmerón, V. and Martínez – Toledo, M.V. 1999. Response of Faba bean (*Vicia faba* L.) to combined inoculation with *Azotobacter* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *Applied Soil Ecology*. 12: 51 - 59.
- Rodriguez, C. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Environ. Microbiology*. 44: 990-991.
- Rodríguez, H., González, T., Goire, I. and Bashan, Y. 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth – promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*. 91: 552 – 555.
- Rojas, M. M., Rodríguez, A. J., Trujillo, I. D. and Heydrich, M. 2009. Relationships between nitrogen fixation and auxins production in *Gluconoacetobacter diazotrophicus* strains from different crops. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11: 84 – 93.
- Rojas – Sierra, J. y Moreno – Sarmiento, N. 2008. Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10: 50 – 62.
- Rojas – Méndez, B.A., Mendoza – Villarreal, R., Mellado, K., Torres – Tapia, A., Vázquez – Siller, L.M. 2009. Respuesta de trigo duro a la inoculación de *Azospirillum* sp. en la germinación y vigor. *Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible*. A.C. 6 ISBN: 978 – 607 – 8003 – 17 – 4.
- Ross, J. J., O'Neill, D. P., Smith, J.J., Kerckhoffs, L.H. and Elliott, R.C. 2000. Evidence that auxin promotes gibberellins A1 biosynthesis in pea. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*. 21: 547 – 552.
- Sethi, S.K. and Adhikary, S.P. 2009. Efficacy of region specific *Azotobacter* strain on vegetative growth and yield of solanum melongena, *Lycopersicum esculentum* and *Capsicum annum*. *Revista de pura y aplicada microbiología*. 3: 331 – 336.
- Shankar – Sing, J., Chandra – Pandey, V. and Singh, D. P. 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and

- environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 140: 339 – 353.
- Shigueru – Okumura, R., De Cinque – Mariano, D., Dallacort, R., Nogueira – De Albuquerque, A., Da Silva – Lobato, A.K., Silva – Guedes, E.M., De Oliveira – Neto, C.F., Oliveira – Da Conceicao, H.E. and Ruffei – Alves, G.A. 2013. *Azospirillum*: a new and efficient alternative to biological nitrogen fixation in grasses. *Journal of food agriculture and environment*. 11: 142 – 1146.
- SIAP. 2010. Servicio de Informacion Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705monografias-chile.pdf>.
- SIAP – SAGARPA. 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/index.php> (15 Julio 2013).
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A. and Vanderleyden, J. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*. 312: 15 – 23.
- Steiner, A. A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil*. 15: 134 – 154.
- Suman, A., Gaur, A., Shrivastava, A.K. and Yadav, R.L. 2005. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconoacetobacter diazotrophicus*. *Plant Growth Regulation*. 47: 155 – 162.
- Tarrand, J., Krieg, N. and Döbereiner, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of new genus *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. *Canadian Journal of Microbiology*. 24: 967-980.
- Tran – Vam, V., Berge - Ngo – Ke, S., Balandreau, J. and Heulin, T. 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility acids of Vietnam. *Plant and Soil*. 218: 273 – 284.
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Yu., Cherduntseva, T. A. and Netrusov, A. I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 42: 117 – 126.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as fertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571 – 586.

Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions ADN biocontrol in the rizosphere.
Journal of Experimental Botany. 52: 487 – 511.