



INTRODUCCION AL USO Y MANEJO DE LOS BIOFERTILIZANTES EN LA AGRICULTURA

Gerardo Armando Aguado Santacruz
Editor



SAGARPA



Vivir Mejor

Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes --- **en la Agricultura**

INTRODUCCION AL USO Y MANEJO DE LOS BIOFERTILIZANTES EN LA AGRICULTURA

Gerardo Armando Aguado-Santacruz
Editor

**Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Molecular de Plantas y Microorganismos
Campo Experimental Bajío
CIRCE-INIFAP
Celaya, Guanajuato, México**

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS
CAMPO EXPERIMENTAL BAJÍO
CELAYA, GTO. MÉX.
JULIO 2012**

inifap

**SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN**

Lic. Francisco Javier Mayorga Castañeda

Secretario

M.C. Mariano Ruiz-Funes Macedo

Subsecretario de Agricultura

Ing. Ernesto Fernández Arias

Subsecretario de Fomento a los Agronegocios

Ing. Ignacio Rivera Rodríguez

Subsecretario de Desarrollo Rural

Dr. José Arnulfo del Toro Morales

Director General de Vinculación y Desarrollo Tecnológico

Ing. Guillermo del Bosque Macías

Director General Adjunto de Bioeconomía

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES,
AGRÍCOLAS Y PECUARIAS**

Dr. Pedro Brajcich Gallegos

Director General

Dr. Salvador Fernández Rivera

Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

M.C. Arturo Cruz Vázquez

Encargado del Despacho de la Coordinación de Planeación y Desarrollo

Lic. Marcial A. García Morteo

Coordinador de Administración y Sistemas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN REGIONAL CENTRO

Dr. Eduardo Espitia Rangel

Director Regional

Dr. Alfredo Josué Gámez Vázquez

Director de Investigación

CAMPO EXPERIMENTAL BAJIO

M.C. Roberto Paredes Melesio

Jefe de Campo

www.gobiernofederal.gob.mx
www.sagarpa.gob.mx
www.inifap.gob.mx

Derechos Reservados © 2012

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS
CAMPO EXPERIMENTAL BAJÍO

Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende

Celaya, Guanajuato C.P. 38010.

Teléfono: 01 (461) 6115323 ext 135; Fax: 01 (461) 6115431

davalospedro@inifap.gob.mx, davalos@prodigy.net.mx

Ninguna parte de este libro puede ser reproducida, almacenada en cualquier medio de respaldo, o transmitida a través de cualquier medio electrónico, de fotocopiado, mecánico, microfilm, de grabación o cualquier otro tipo, sin el permiso escrito por parte de los propietarios de los derechos de esta obra.

Primera Edición

Cita correcta:

[Autor (es)]. 2012. Título del capítulo. *In*: Aguado-Santacruz, G.A. (ed). Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura. INIFAP/SAGARPA. México, pp. (páginas consultadas).

Impreso en Celaya, Guanajuato, México.

ISBN: 978-607-425-807-3

El Grupo de Investigación sobre Biofertilizantes del INIFAP agradece a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación los apoyos otorgados, a través de su Dirección de Bioeconomía, a nuestro Programa y que han posibilitado la realización de algunas de las investigaciones mencionadas en este libro.

CONTENIDO

	Pág
Introducción	XIII
Prólogo	XV
1. Impacto Económico y Ambiental del Empleo de Fertilizantes Químicos	01
<i>Gerardo Armando Aguado-Santacruz, Quintín Rascón-Cruz y Agustín Luna-Bulbarela</i>	
2. La Rizósfera y las Relaciones entre las Plantas y los Microorganismos	23
<i>Blanca Moreno-Gómez</i>	
3. Uso de Microorganismos como Biofertilizantes	35
<i>Gerardo Armando Aguado-Santacruz</i>	
4. Identificación Molecular de Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal Mediante el Empleo de Secuencias Ribosomales	79
<i>Francisco Luna-Martínez, Mayra Celeste Flores-Balderas y Gerardo Armando Aguado-Santacruz</i>	
5. Manejo y Calidad de los Biofertilizantes	115
<i>Blanca Moreno-Gómez y Gerardo Armando Aguado-Santacruz</i>	
6. Biofertilizantes Bacterianos Desarrollados por el INIFAP	151
<i>Gerardo Armando Aguado-Santacruz y Blanca Moreno-Gómez</i>	
7. Empleo de <i>Azospirillum</i> como Biofertilizante	171
<i>Alberto Mendoza-Herrera y Ma. Antonia Cruz-Hernández</i>	

8. Uso de *Trichoderma* como Agente Promotor del Crecimiento Vegetal 195
Juan Manuel González-Prieto y Victor Hugo Reséndiz-Arvizu
9. Micorriza INIFAP: Biofertilizante para el Campo Mexicano 219
Juan Francisco Aguirre-Medina, Arturo Durán-Prado, Ma. Ángeles Peña del Río, Oscar Grageda-Cabrera y Martha B.G. Irizar-Garza
10. Inoculantes Microbianos como Promotores de la Producción Sostenible de Maíz en Condiciones Semiáridas 241
Arturo Díaz-Franco, Catarina Loredó-Osti, Jesús García-Olivares, Héctor Manuel Cortinas-Escobar y Ma. Ángeles Peña del Río
11. Micorriza INIFAP y el Incremento de la Productividad de Avena y Maíz en el Estado de Chihuahua 269
Jesús Pilar Amado-Álvarez, Mario René Ávila-Marioni y Orlando Ramírez-Valle.

Introducción

La volatilidad de los precios del petróleo y el consecuente encarecimiento de los productos derivados de éste en los últimos años ha sembrado mucha incertidumbre en los agricultores de nuestro país, quienes emplean diversos derivados del petróleo, como los fertilizantes químicos, en sus procesos de producción. Se ha mencionado que la llamada “Revolución Verde”, que permitió un incremento sin precedente en los rendimientos de muchos cultivos, ha tenido como debilidad crear una dependencia del petróleo para la síntesis y fabricación de los fertilizantes químicos que son actualmente básicos para mantener altos rendimientos en la agricultura. La reducción de la oferta de petróleo por el agotamiento de los yacimientos y los mayores costos para su extracción ha traído consigo el incremento de los precios de los energéticos y de los fertilizantes químicos, principalmente los nitrogenados.

En el balance energético de cultivos básicos como las gramíneas el fertilizante representa el mayor monto de energía invertida. Los mayores costos de fertilización química reducen las utilidades del productor, que de por sí ya se ven afectadas por la degradación de la fertilidad natural de los suelos por el excesivo uso de estos insumos. En muchos suelos que han sido cultivados de manera intensiva con aplicaciones altas de fertilizantes químicos se ha observado una disminución constante de la materia orgánica y de la actividad biológica.

El gobierno mexicano ha encomendado a la SAGARPA e INIFAP analizar las alternativas más viables y rentables que permitan solventar esta situación de crisis. En este caso particular, las opciones propuestas para enfrentar la problemática relacionada con los altos costos de los fertilizantes se encaminaron a lograr la optimización de las dosis de fertilización química y la promoción de la utilización de abonos orgánicos y biofertilizantes en los cultivos agrícolas de México. Estos productos, que entre otros beneficios mejoran el estatus nutricional de las plantas, son elementos indispensables en la implementación de programas de agricultura de conservación, como MasAgro para la Modernización Sustentable de la Agricultura Tradicional,

que buscan disminuir la erosión y mejorar la fertilidad del suelo, además de reducir el uso de energía fósil.

Ante la importancia de la autosuficiencia alimentaria y el encarecimiento de los procesos de producción del agro mexicano, el Programa de Investigación sobre Biofertilizantes del INIFAP ha contado con un apoyo prácticamente ininterrumpido por parte de SAGARPA desde 1999 para generar tecnologías propias en cuanto al desarrollo y manejo de biofertilizantes, así como para la implementación de los esquemas que permitan la adopción de estos productos por parte de los productores mexicanos.

Aunque la información aquí presentada revela algunos logros concretos derivados de los apoyos otorgados, no plasma de manera explícita los alcances obtenidos con relación a la confianza que los Programas de Investigación y Transferencia de Tecnología del INIFAP ha generado entre los productores de nuestro país para la adopción del uso de los biofertilizantes como parte integral de sus sistemas de producción. No está por demás mencionar que esta confianza ha sido ganada a través de una intensa labor de investigación y transferencia de tecnología a lo largo y ancho de nuestro país.

Finalmente, las autoridades que de un modo u otro hemos sido facilitadores de esta labor de investigación y difusión deseamos que la presente obra constituya un instrumento útil para la divulgación y transferencia de tecnología en torno al empleo de los biofertilizantes en la agricultura de nuestro país.

Ing. Guillermo del Bosque Macías
Director General Adjunto de Bioeconomía-SAGARPA

Prólogo

Las condiciones ecológicas bajo las cuales se practica la agricultura en nuestro país imponen un reto para los agricultores, particularmente para aquellos que desarrollan su actividad en zonas con baja disponibilidad de agua o que presentan otro tipo de limitaciones como una alta incidencia de enfermedades en el suelo o la presencia de concentraciones perjudiciales de sodio, carbonato o compuestos xenobióticos. Las limitaciones de estas zonas constituyen un área de oportunidad para la utilización de microorganismos que puedan mejorar la disponibilidad de nutrientes y agua, disminuir la carga de agentes contaminantes o controlar la incidencia de enfermedades en los cultivos.

El resurgimiento de la biofertilización como una práctica factible y actualmente necesaria en los sistemas de producción agrícola de nuestro país en respuesta al encarecimiento de los fertilizantes sintéticos y la preocupación de la sociedad por consumir alimentos libres de químicos y producidos con el menor impacto ambiental, hace necesario retomar y actualizar los fundamentos que sustentan esta tecnología, estableciendo las ventajas y alcances, pero también las limitaciones del empleo de microorganismos en la agricultura. Sólo con base en este análisis, los investigadores, técnicos, extensionistas y cualquier persona ligada a la actividad agropecuaria de nuestro país podrán sustentar adecuadamente sus decisiones con relación a la conveniencia de utilizar biofertilizantes como un medio para incrementar la productividad, mejorar la rentabilidad de la agricultura, reducir el impacto de los agroquímicos en el ambiente y disminuir la presencia de contaminantes en los alimentos que consumimos diariamente.

La carencia de una publicación en nuestro país que proveyera una perspectiva global e introductoria al uso de los biofertilizantes en la agricultura impulsó la realización del presente libro. A través de esta obra, distintos investigadores involucrados con el desarrollo, manejo y evaluación de biofertilizantes quisimos compartir no solamente nuestros conocimientos

teóricos, sino también nuestras experiencias de la aplicación de estos productos biológicos en el campo.

A la luz de los extraordinarios avances alcanzados actualmente en diversas áreas del conocimiento ligadas a la microbiología, como la genética, genómica, bioquímica, fisiología y biología molecular, entre otras, la presente contribución busca aportar elementos introductorios, y no pretende en ningún sentido ser un tratado extensivo sobre el uso de los microorganismos en la agricultura.

Bajo las premisas anteriores, los autores de la presente obra esperamos que los lectores encuentren respuesta a algunas de sus interrogantes sobre el uso y manejo de los biofertilizantes en la agricultura.

Finalmente, los investigadores del Programa de Investigación sobre Biofertilizantes del INIFAP deseamos expresar nuestro agradecimiento a todas las autoridades de SAGARPA que de una manera u otra han apoyado las actividades de investigación y transferencia de tecnología de nuestro grupo de investigación.

Cuando el uso de biofertilizantes a gran escala sea una realidad incuestionable de los procesos de producción agrícola de nuestro país, los investigadores que de una manera directa o indirecta hemos sido parte del Programa de Investigación y Transferencia de Tecnología sobre Biofertilizantes del INIFAP sabremos que hemos cumplido una vez más con el sector agrícola, empresarial y ambiental de México.

Dr. Gerardo Armando Aguado Santacruz
Editor

Capítulo 1

Impacto Económico y Ambiental del Empleo de Fertilizantes Químicos

Gerardo Armando Aguado-Santacruz^{1}, Quintín Rascón-Cruz²
y Agustín Luna-Bulbarela¹*

¹*Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Molecular de Plantas y Microorganismos
C.E. Bajío-INIFAP, Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel
de Allende, Celaya, Gto. C.P. 38010*

²*Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma
de Chihuahua, Circuito No.1 Campus Universitario
Chihuahua, Chih. C.P. 31125*

**Autor de correspondencia*

email: aguado.armando@inifap.gob.mx, gaguados@gmail.com

Tel: (461) 6115323 ext. 122

La agricultura juega un papel crucial en la economía de los países en desarrollo y brinda la principal fuente de alimentos, ingresos y empleo a sus poblaciones rurales. La tecnificación de la agricultura y el uso eficiente de las tierras es fundamental para alcanzar la seguridad alimentaria, reducir la pobreza y alcanzar un desarrollo integral sostenible.

Desde el comienzo de la historia humana hasta los años cuarenta los cultivos eran crecidos sin la ayuda de químicos. Posteriormente, se introdujo la agricultura química en gran escala que trajo como resultado un aumento en los rendimientos y calidad de los cultivos. Las tecnologías desarrolladas durante la revolución verde en los años 60's, tales como la síntesis de agroquímicos (fertilizantes y pesticidas) y la utilización de variedades de alto rendimiento y elevada tasa de asimilación de nutrientes, contribuyeron de manera significativa a incrementar la producción mundial de alimentos.

Desde una perspectiva de eficiencia energética, el objetivo central de la producción agrícola es el maximizar la producción y mejorar la calidad de las cosechas. Para lograrlo, se cuenta con una superficie finita de tierras cultivables, por lo que la adición de fertilizantes y pesticidas, así como el uso de maquinaria para optimizar la cosecha, procesamiento y transporte de los productos agrícolas, son algunas de las tecnologías que se han desarrollado para satisfacer las necesidades de alimentación de una población en incesante aumento (Pelletier *et al.*, 2011).

Los fertilizantes químicos reponen los nutrientes removidos del suelo a través de la cosecha de los cultivos, posibilitan el uso de variedades de alto rendimiento y contribuyen de manera significativa a la productividad agrícola en suelos nutrimentalmente pobres. El uso de fertilizantes ha sido un componente crítico para el mejoramiento de la productividad agrícola en este tipo de suelos en los que la fertilización química ha contribuido con alrededor de un 30 a un 50% al incremento en la productividad de los cultivos (Pelletier *et al.*, 2011).

La necesidad por fertilizantes de origen químico se encuentra al alza, debido a un eminente crecimiento poblacional que precisará de la producción de más alimentos para solventar las necesidades alimenticias del mundo (Ahlgren *et al.*, 2008). Por ejemplo, el uso de fertilizantes químicos en países como China es prioritario, ya que de su producción agrícola depende la alimentación del 20% de la población mundial empleando solamente 9% de la superficie cultivable en el mundo, lo que justifica la producción intensiva de los cultivos utilizando estos compuestos químicos (Yan *et al.*, 2008).

El componente básico en la industria actual de fertilizantes nitrogenados es la producción de amoníaco. El amoníaco es formado a partir del proceso Haber-Bosch, en el cual se emplea el hidrógeno del gas natural para combinarse con el nitrógeno atmosférico y dar como resultado amoníaco. Entre los años de 1961 y 1996 se incrementó a nivel mundial la producción de cereales cerca de 4.1 % por año; cerca del 40% de este incremento en la productividad fue posible gracias al empleo de fertilizantes nitrogenados (Crewsa y Peoples, 2004). Asimismo, cerca del 40% de la población actual es virtualmente dependiente del proceso Haber-Bosch ya que esta tecnología aporta la mayor cantidad de nitrógeno para la producción agrícola mundial. Se menciona que desde los años 50's la población mundial ha aumentado en 3.5 billones de personas gracias a este proceso por lo que es importante llevar a cabo un análisis de las repercusiones tanto económicas como ambientales del desarrollo de esta tecnología (Crewsa y Peoples, 2004).

El consumo a nivel global de estos los fertilizantes químicos incrementa año con año. Los registros históricos muestran un aumentó de 27.4 millones en los años 1959/60's a 143 millones de toneladas en los años 1989/90's, cifra

que representa un incremento en la tasa anual de consumo del 5.5% (Cuadro 1); el 59% de los fertilizantes utilizados a nivel mundial son nitrogenados, el 24% fosfatados y el 17% potásicos.

Estadísticas más recientes muestran un incremento de casi 28 millones de toneladas entre el periodo 2002-2009 (Fig. 1), lo que representa un aumento de 20% en el consumo de fertilizantes a nivel mundial en este periodo.

Los principales países productores de fertilizantes son China (22.4%), Estados Unidos (11.9%), India (9.4%), Canadá (8.7%) y Rusia (8.6%). Por otro lado, el mayor consumo mundial de fertilizantes se concentra precisamente en los tres principales países productores de estos agroquímicos: China 27.3%, Estados Unidos 13.5% e India 12%.

Históricamente los países desarrollados, e.g. Estados Unidos, Alemania y Holanda, entre otros, han consumido más fertilizantes que los países en vías de desarrollo, aunque se prevé que para el año 2020 esta situación se revertirá (Cuadro 1).

A pesar de la disminución que se proyecta para el año 2020, el consumo anual de fertilizantes a nivel mundial llegará a 208 millones de toneladas, siendo el nitrógeno el principal elemento a incorporar a los cultivos (115.3 millones de toneladas; Cuadro 1). La urea es el fertilizante de mayor uso a nivel mundial, de tal modo que para satisfacer la demanda de este fertilizante, la producción en 2007 tuvo que incrementarse en 6.6% para alcanzar 144 millones de toneladas.

Desafortunadamente, la producción de fertilizantes nitrogenados es dependiente de la energía obtenida de los combustibles de origen fósil, los cuales requieren del empleo del 1.2 % de la energía primaria global. La energía requerida para la producción de fertilizantes nitrogenados ha disminuido desde 55 GJ/ton de amoníaco producido en los años 50's hasta los 35 GJ/ton en los años 70's. Sin embargo, en la actualidad un gran número de plantas industriales de aquella época siguen en funcionamiento, por lo que el promedio actual se encuentra entre los 40-45 GJ/ton. La producción de los fertilizantes nitrogenados es totalmente dependiente de los combustibles de origen fósil, siendo la base principal de energía el gas natural (Ahlgren *et al.*, 2008).

En 2005 se extrajeron a nivel mundial aproximadamente 17.5 millones de toneladas de fósforo; el 85% provino de tres países, principalmente Marruecos, y cerca de 14 millones de toneladas fueron utilizados para la elaboración de fertilizantes químicos. Lamentablemente, del total de los fertilizantes fosfatados fabricados, casi 8 millones de toneladas se perdieron por lixiviación y erosión. En 2009 la extracción de fósforo aumentó a 23 millones de toneladas, pero las pérdidas no cambiaron con respecto a años pasados (Elser y Bennett, 2011). Estas cifras enfatizan la importancia de adoptar técnicas más eficientes para su dosificación y uso.

En nuestro país la utilización histórica de fertilizantes químicos por unidad de superficie cultivable muestra una tendencia relativamente baja y uniforme en el tiempo, no excediendo 800 kg por hectárea (Fig. 2); México consume el 1.2% de la producción mundial de fertilizantes, lo que lo posiciona en el lugar 15 en la lista de países consumidores (FIRA, 2010).

Aunque en países desarrollados como Alemania e Inglaterra el consumo de fertilizantes fluctúa entre 2 y 4 toneladas por hectárea, los consumos récord se observan en países agrícolamente más tecnificados que basan gran parte de su producción en el establecimiento de invernaderos, como el caso de los países bajos, en los cuales se han llegado a alcanzar consumos pico de hasta 15 toneladas por hectárea de tierra arable (Fig. 2).

En esta figura se puede observar que países que anualmente incrementan la superficie destinada a la producción agrícola en confinamiento, como Chile y Colombia, muestran un alza gradual consecuente en el consumo de fertilizantes químicos por unidad de superficie.

Contrariamente, existen países que por razones económicas o políticas no tienen acceso a los fertilizantes químicos y no los utilizan en sus sistemas de producción agrícola. Por ejemplo, en Sudáfrica lo prohibitivo de su costo ocasiona que prácticamente no se utilicen estos insumos químicos, mientras que en Cuba se presentó una reducción significativa en la productividad de las cosechas, producto de su aislamiento político y la desaparición de la antigua

Unión Soviética que hasta antes de 1991 proporcionaba a este país una gran cantidad de combustibles fósiles y fertilizantes (Crewsa y Peoples, 2004). La notable disminución del consumo de fertilizantes químicos en este país (en al menos 11 veces) entre el periodo comprendido entre los años 1989 a 2003 ha forzado a los agricultores a adoptar alternativas tecnológicas para amortiguar las reducciones en la productividad agrícola ocasionadas por la carencia de estos productos.

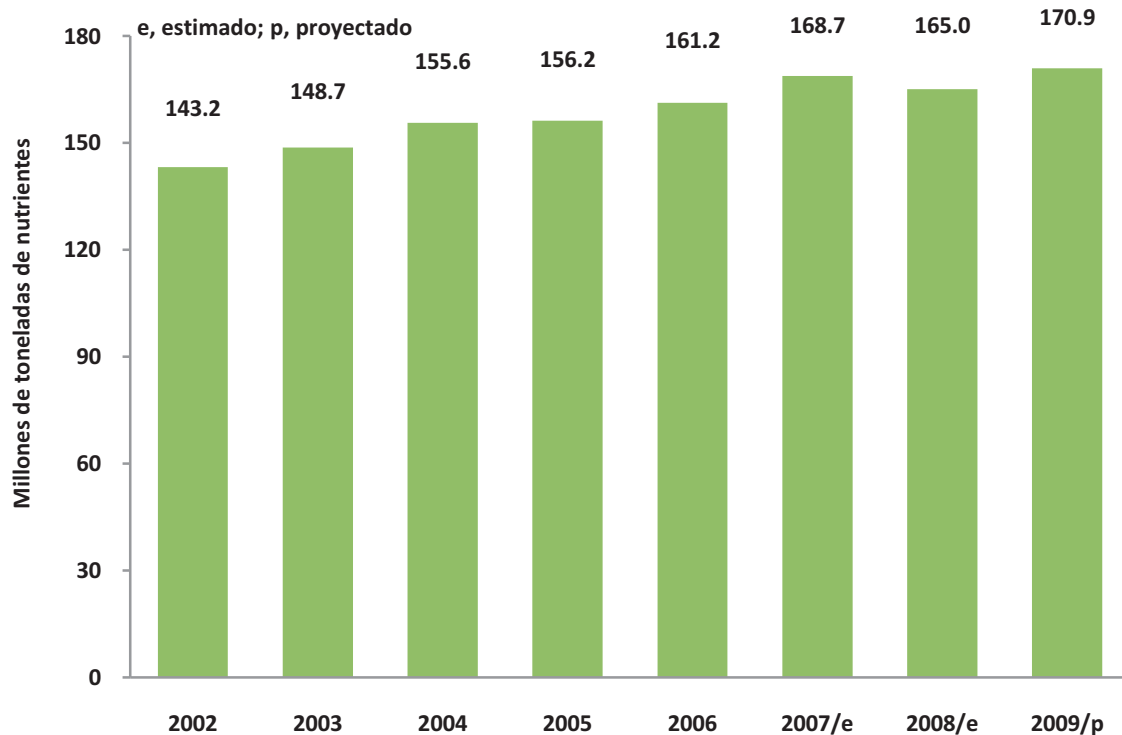


Figura 1. Consumo mundial de fertilizantes 2002-2009 (FIRA, 2010).

Los fertilizantes químicos se obtienen a partir del petróleo por lo que su precio está sujeto a la cotización internacional de este combustible fósil (Fig. 3). La volatilidad de los precios de los fertilizantes y pesticidas químicos derivados del petróleo provoca que en ocasiones la cotización de estos productos los ubique fuera del alcance de los productores, particularmente de aquellos que realizan su actividad bajo condiciones de temporal.

Cuadro 1. Consumo histórico y proyección del uso de fertilizantes químicos para el año 2020 (Bumba y Baanante, 1996).

Región	Uso de fertilizantes (Millones de toneladas de nutrientes)				Aumento anual (%)	
	1959/60	1989/90	2020	1960-90	1990-2020	
<i>Países desarrollados</i>	24.7	81.3	86.4	4.0	0.2	
<i>Países en desarrollo</i>	2.7	62.3	121.6	10.5	2.2	
Este de Asia	1.2	31.4	55.7	10.9	1.9	
Sur de Asia	0.4	14.8	33.8	12.0	2.8	
Oeste de Asia/ Norte de África	0.3	6.7	11.7	10.4	1.9	
Latinoamérica	0.7	8.2	16.2	8.2	2.3	
Sub-Sahara (África)	0.1	1.2	4.2	8.3	3.3	
<i>Total Mundial</i>	27.4	143.6	208.0	5.5	1.2	
Nutriente						
Nitrógeno	9.5	79.2	115.3	7.1	1.3	
Fosfato	9.7	37.5	56.0	4.5	1.3	
Potasio	8.1	26.9	36.7	4.0	1.0	

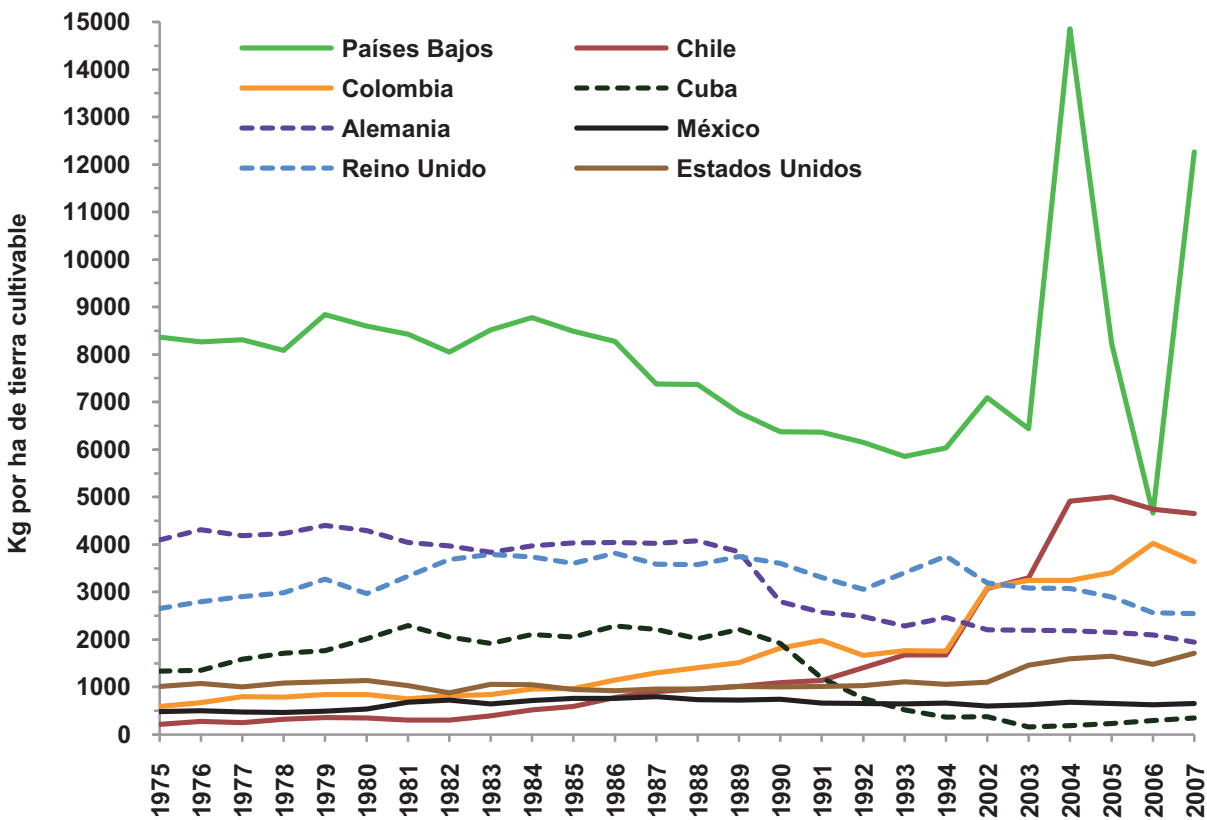


Figura 2. Consumo de fertilizantes químicos en distintos países durante el periodo 1975-2007 (con datos del Banco Mundial, 2010).

En este contexto es importante mencionar que el aumento registrado en el año de 2008 en los precios de los fertilizantes sintéticos marcó un parteaguas muy importante en las tendencias históricas globales en la cotización de estos productos, ya que, por ejemplo, la tonelada de urea se llegó a cotizar en más de 600 dólares (Fig. 3).

Para este mismo periodo, en México, los precios pico por tonelada alcanzados por el fosfato diamónico, superfosfato triple, triple 17, urea, cloruro de potasio y sulfato de amonio fueron de aproximadamente \$14,000, \$11,000, \$10,500, \$10,000, \$9,200 y \$5,800 pesos mexicanos, respectivamente. Parte del origen del alza en los precios de estos productos se relacionó con la imposición de impuestos a las exportaciones de países productores de fertilizantes químicos importantes como China.

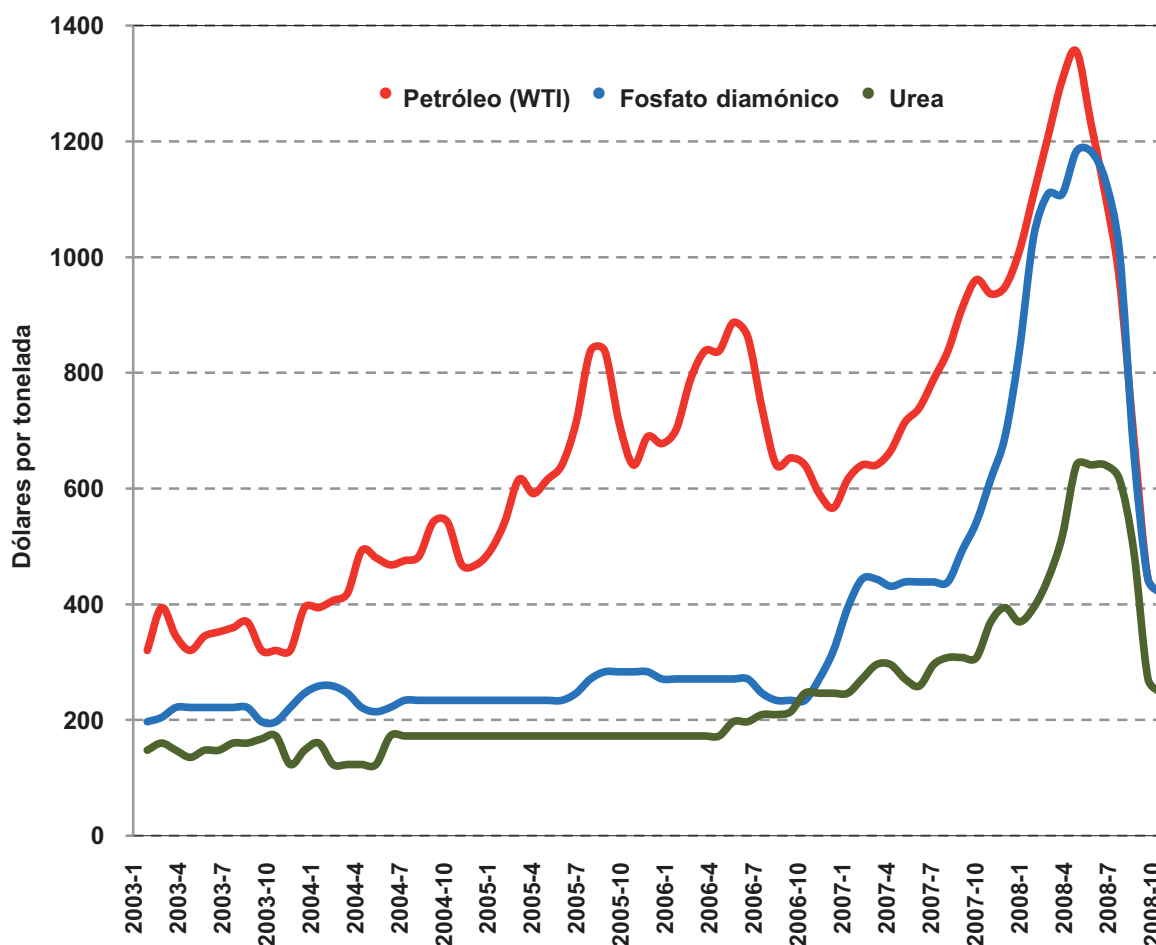


Figura 3. Precios internacionales de urea, fosfato diamónico y petróleo en el periodo 2003-2008 (FIRA, 2010).

El sector agrícola mexicano demanda anualmente cerca de 4 millones de toneladas de fertilizantes (Fig. 4). La desarticulación de la empresa paraestatal mexicana productora de fertilizantes químicos FERTIMEX provocó una dependencia del suministro de estos insumos del exterior. Actualmente, las empresas que conforman la Asociación Nacional de Comercializadores de Fertilizantes, A.C. (ANACOFER) importan más del 85% del volumen de los fertilizantes inorgánicos. La producción nacional de fertilizantes químicos sólo representa el 31% del consumo nacional y de este porcentaje la ANACOFER produce el 65% de la producción nacional. A partir del año de 2003 en México sólo se producen sulfato de amonio, superfosfato de calcio simple, superfosfato

de calcio triple y otros fertilizantes menores (Fig. 5). Por otro lado, desde el año 2001 México importa el 100% de urea y fosfato diamónico (DAP) que consume y siempre ha importado el total del consumo de los fertilizantes potásicos.

Los altos costos de los fertilizantes sintéticos provoca que, por ejemplo para el caso del cultivo de maíz, la aplicación de fertilizantes químicos represente el 30% de los costos de producción en sistemas de riego y hasta el 60% en los sistemas de temporal (Aguado-Santacruz, 2011).

Si bien la problemática en torno a los precios de los fertilizantes químicos representa un tópico de primordial importancia para el desarrollo de la agricultura en México, la contaminación asociada al empleo de estos insumos es un tema que día a día gana más interés en la sociedad a medida que la información relacionada con los efectos nocivos derivados del empleo de estos químicos sobre el ambiente y la salud humana es difundida a través de los medios de comunicación masiva.

Los beneficios inicialmente observados por el empleo de los fertilizantes químicos, y pesticidas en general, sobre la productividad de los cultivos se vieron opacados por estudios posteriores que demostraron los efectos detrimentales de la utilización excesiva de estos productos químicos sobre el ambiente.

A esta situación debemos sumar el ineficiente aprovechamiento de los fertilizantes químicos por las plantas. Por ejemplo, anualmente los sistemas agrícolas basados en cereales aprovechan tan sólo el 50% o menos de las dosis químicas aplicadas, independientemente de la fuente de nitrógeno aplicada. Estas ineficiencias pueden ser atribuidas a la volatilidad de ciertos componentes o al incorrecto estatus del suelo. El nitrógeno puede perderse del suelo por lixiviación de nitratos o a través de emisiones gaseosas hacia la atmósfera en la forma de amoníaco, óxido nítrico o bien nitrógeno molecular, todas las cuales, a excepción de la última, son consideradas como fuentes potenciales de deterioro ambiental (Crews y Peoples, 2004).

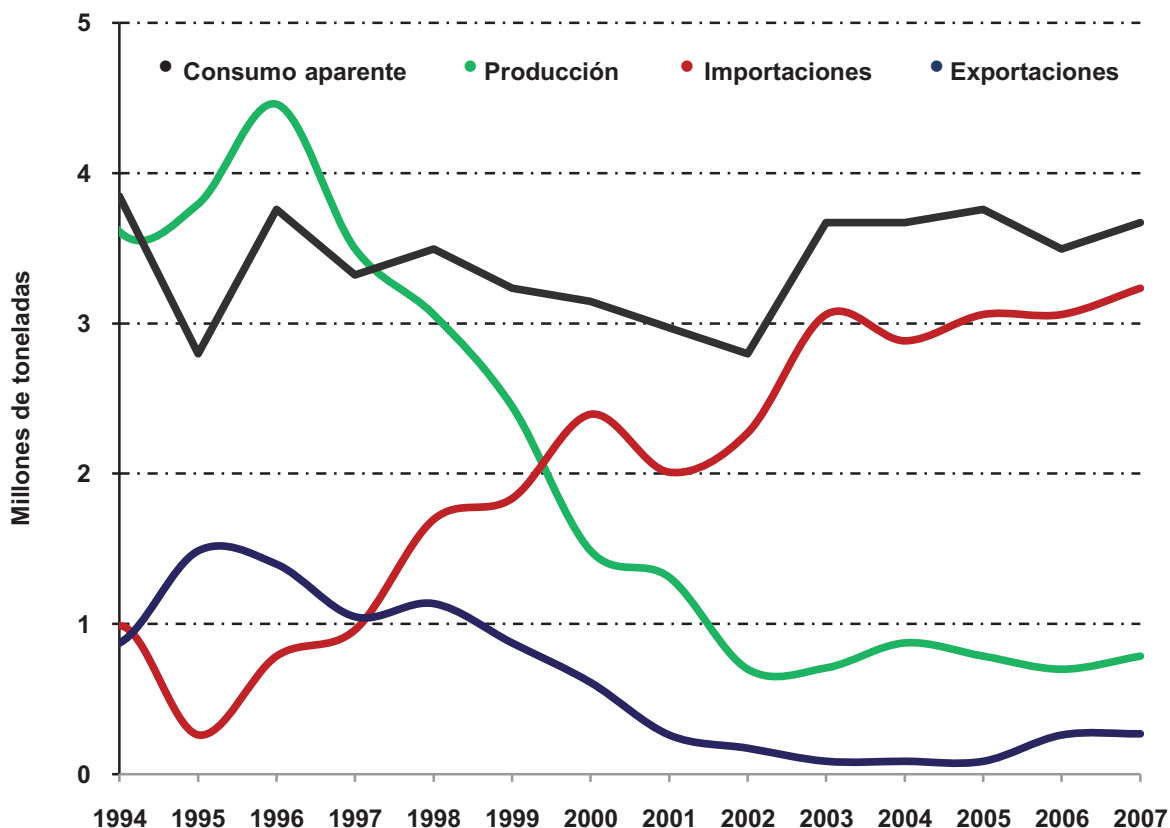


Figura 4. Producción, comercio exterior y consumo aparente de fertilizantes en México durante el periodo 1994-2007 (FIRA, 2010).

Los pesticidas son compuestos químicos que se utilizan en la agricultura para el control de diversos organismos nocivos para los cultivos y comprenden a los herbicidas, insecticidas, fungicidas y rodenticidas. Todos los pesticidas comparten una característica en común, son químicos diseñados para matar y tienen el potencial de ser dañinos para los humanos si se ingieren en cantidades suficientes.

La labranza continua y el uso de fertilizantes, pesticidas y otros químicos, han contribuido al deterioro de la estructura y textura del suelo, a la reducción de las poblaciones de la microflora y la microfauna; y al desbalance del estatus nutricional del suelo. Los agroquímicos son la principal fuente de contaminación en las áreas destinadas a la producción agrícola, particularmente en aquellas donde se ha hecho un uso indiscriminado de estos productos.

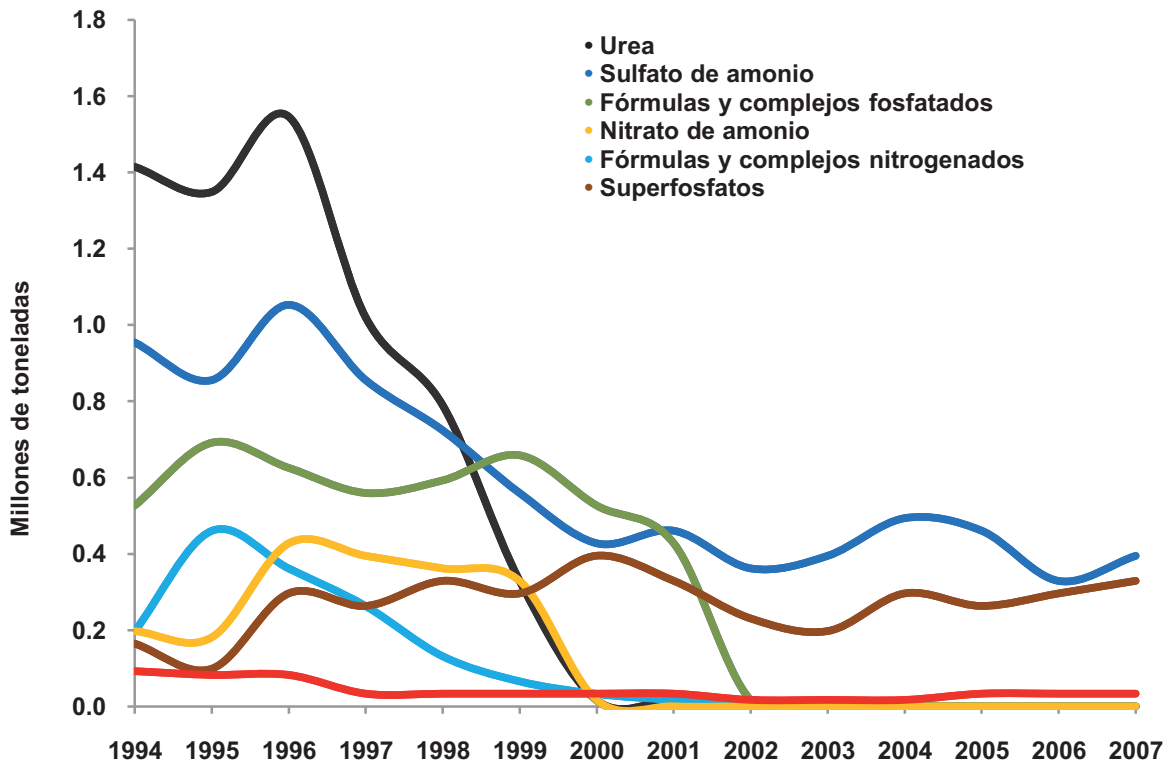


Figura 5. Desarrollo de la producción de fertilizantes químicos en México durante el periodo 1994-2007 (FIRA, 2010).

La aplicación de fertilizantes químicos comúnmente se ha llevado a cabo sin un conocimiento previo del estatus actual del suelo, lo cual ha resultado en una pobre respuesta de los cultivos a la aplicación de estos productos, al dispendio económico y aumento del deterioro de los recursos ambientales. Se menciona, por ejemplo, que en algunos países como la India se han aplicado 250 veces más de fertilizantes químicos y 400 veces más de pesticidas de lo que realmente requerían los cultivos (Kalra y Khanuja, 2007).

Los fertilizantes químicos fosfatados se obtienen a partir de fuentes no renovables, cuya reserva se estima perdurará de 23 a 100 años (Spångberg *et al.*, 2011), por lo que las técnicas de producción agrícola deben encaminarse hacia un uso racional de estos recursos. Cerca del 90% del fósforo extraído es utilizado para la producción de fertilizantes, los cuales, una vez aplicados, pueden sufrir grandes pérdidas por su fijación en suelos minerales con alta

acidez. El término 'fijación de fosfato' hace referencia a la transformación de los fosfatos del suelo a formas no asimilables a través de dos mecanismos principales: la formación de fosfatos de calcio con menor solubilidad y la adsorción de fosfatos a la superficie de las partículas del suelo. La segunda forma es la más importante, ya que incluye la adsorción por óxidos de hierro, hidróxidos, minerales y diversos complejos de aluminio y hierro (Mengel, 1997).

Con relación a los fertilizantes azufrados se menciona que cerca de 150 millones de toneladas de azufre son movilizados anualmente por prácticas antropogénicas. Cerca de la mitad de este azufre es emitido a la atmósfera como dióxido de azufre (SO_2) a través de la quema de combustibles fósiles o durante el refinamiento de este elemento. Otras fuentes de SO_2 son las emisiones de azufre reducido (por ejemplo, el dimetilsulfóxido), derivadas de prácticas agrícolas relacionadas con el uso de fertilizantes químicos nitrogenados o fosfatados o la aplicación de materia orgánica para aumentar la fertilidad del suelo. Las consecuencias de la movilización de azufre y nitrógeno tienen repercusiones a corto y mediano plazo. Los efectos inmediatos pueden observarse por la contaminación y la acidificación del aire. Los efectos a largo plazo ocurren como resultado de la acumulación de especies reactivas de estos elementos en el suelo y su posterior lixiviación que conlleva a la contaminación de los cuerpos de agua. Por otro lado, los desechos industriales que contienen azufre en forma de ácido sulfúrico provocan la acidificación de los cuerpos acuíferos (Galloway, 1996).

Los efectos nocivos del uso de fertilizantes químicos pueden ser resumidos en:

- *Contaminación de agua.* El principal problema asociado con el uso de fertilizantes químicos es la eutrofización del agua superficial. Los fertilizantes aplicados en las zonas agrícolas escurren hacia los cuerpos de agua enriqueciéndolos con nutrientes y provocando la proliferación de algas y otros organismos que reducen la calidad del agua al consumir el oxígeno del agua y ocasionando con esto la muerte de hidrófitas y animales acuáticos. El consumo de agua y vegetales contaminados por altas concentraciones de nitratos provenientes de la lixiviación de los

fertilizantes químicos hacia los mantos freáticos puede dar origen a diferentes enfermedades. Una vez que entran al cuerpo humano, los nitratos pueden ser reducidos a nitritos por bacterias y algunas enzimas presentes en el sistema digestivo. Estos nitritos pueden combinarse con aminos a amidas secundarias para dar origen a compuestos de N-nitroso (nitrosaminas y nitrosamidas), conocidos por sus potentes efectos carcinogénicos (Walker, 1990). Además, al entrar al sistema sanguíneo, los nitritos se combinan con la hemoglobina para oxidar el Fe^{+2} presente a Fe^{+3} , lo cual provoca una disminución de la capacidad de la hemoglobina para acarrear oxígeno y es el origen de la enfermedad conocida como el síndrome de los niños azules (“blue baby syndrome”) o metahemoglobinemia. La deficiencia de oxígeno en diferentes partes del cuerpo provoca la aparición de una coloración azul en la piel de infantes que son más susceptibles a la exposición de nitratos que los adultos (Majumdar, 2003). La Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO) menciona que los niveles de nitratos en el agua para beber no deben exceder la concentración de 10 mg/l. En un estudio realizado en la India se encontró que 68% de las muestras de agua colectadas en 113 poblaciones rurales poseían niveles de nitratos por encima de este límite permisible (Kalra y Khanuja, 2007); en algunos casos concentraciones de hasta 1500 mg/l han sido encontradas en el agua subterránea (Jacks y Sharma, 1983). En México se han llegado a registrar niveles de más de 200 mg/l de nitratos en el agua de algunas partes del norte y por arriba de 10 mg/l en el centro del país (Martínez *et al.*, 2006). Los metales pesados presentes como contaminantes en los fertilizantes de fósforo representan uno de los mayores problemas en torno al uso de los fertilizantes químicos, ya que pueden rebasar la ingesta recomendada tolerable en alimentos. Por ejemplo, en Suecia se encontró que los fertilizantes a base de fósforo contienen cerca de 4.5 mg de Cadmio por kilogramo de fertilizante fosfatado (Spångberg *et al.*, 2011). Por otro lado, en experimentos conducidos en Kenia Central se encontró una correlación positiva entre las concentraciones de sulfato de amonio

utilizado como fertilizante y las poblaciones de larvas del mosquito *Anopheles arabiensis* en los cultivos de arroz (Mutero *et al.*, 2004), lo cual constituye una evidencia de los efectos secundarios del empleo de fertilizantes químicos sobre la salud humana. Finalmente, es importante mencionar que los nitratos pueden causar un desarrollo anormal y enfermedades de la glándula tiroides (Rockman y Granli, 1991).

- *Contaminación atmosférica.* Los fertilizantes químicos también aportan emisiones de dióxido de carbono (CO_2) a la atmósfera contribuyendo al efecto invernadero. La aplicación de urea a los suelos conduce a la pérdida de CO_2 que se ha fijado por el proceso de producción industrial. La urea $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ se convierte en amonio (NH_4^+), el ion hidroxilo (OH^-) y bicarbonato (HCO_3^-) en la presencia de agua y enzimas (Snyder *et al.*, 2009). Por otro lado, los fertilizantes nitrogenados constituyen una fuente importante de emisión de óxidos de nitrógeno tales como óxido nítrico y óxido nitroso, los cuales pueden causar desórdenes a humanos y animales. Los óxidos de nitrógeno son gases que promueven el efecto invernadero, que superan al CO_2 en cuanto a su capacidad de retención de la radiación y que además contribuyen a la destrucción de la capa de ozono. Cuando se aplican fertilizantes químicos nitrogenados, parte de éstos pueden volatilizarse como amoniaco, particularmente en suelos alcalinos, y estas pérdidas pueden alcanzar hasta 50% de las dosis químicas aplicadas en sistemas agrícolas convencionales o hasta 80% en cultivos de anegamiento como arroz (Crewsa y Peoples, 2004); ésta emisión de amoniaco es una de las causas que provoca la lluvia ácida.
- *Daño a cultivos y suelos.* La evidencia demuestra que el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados causa acame en los cultivos, reducen el contenido de carbohidratos en cultivos como caña de azúcar, acidifican el suelo e incrementan la incidencia de malezas y enfermedades. La aplicación de fertilizantes químicos y la práctica del monocultivo se consideran como uno de los orígenes principales de la alteración de la microfauna nativa del suelo (Sarathchandraa *et al.*, 2001). El uso intensivo

de fertilizantes conlleva a una pérdida de la biodiversidad y la alteración de los ciclos biológicos debido a la interferencia en el flujo natural de los nutrientes (Mozumdera y Berrensb, 2007). Por ejemplo; altas cantidades de fertilizantes nitrogenados pueden resultar en la inhibición de la actividad fijadora de nitrógeno de *Rhizobium* y otros microorganismos diazotróficos, así como una reducción en las poblaciones de lombrices de tierra. Asimismo, los fertilizantes fosfatados que se producen a partir de minerales pueden contener una amplia gama de metales pesados como mercurio, cadmio, arsénico, plomo, cobre y níquel; inclusive en algunas partes del mundo también pueden incluir algunas trazas de uranio, torio y polonio (Aoun *et al.*, 2010).

Los perjuicios a largo plazo asociados con el uso de químicos agrícolas (agotamiento de recursos naturales y daños ambientales y a la salud humana, entre otros) requieren el desarrollo y/o implementación de tecnologías limpias que tengan un impacto mínimo en el ambiente y estén diseñadas para conservar y mantener la productividad de los suelos y obtener cosechas con un mayor valor agregado al estar libres de químicos dañinos al hombre.

Aunado a la problemática ambiental se suma la gran volatilidad en los precios del petróleo y los consecuentes aumentos en los precios de los fertilizantes químicos, situación que ha provocado una gran inquietud entre los productores agropecuarios quienes han visto mermados sus márgenes de utilidad.

Para evitar o minimizar el impacto del uso de los fertilizantes químicos en el ambiente es necesario contar con información básica sobre los requerimientos nutricionales específicos de los cultivos, de la eficiencia relativa de las distintas fuentes de fertilizantes para aportar los elementos requeridos para el crecimiento de las plantas y del estatus nutricional actual de las tierras de cultivo, así como buscar alternativas que ayuden a reducir la cantidad de agroquímicos aplicados.

El empleo de fertilizantes nitrogenados puede ser reducido de manera

sustancial por la aplicación de algunas medidas tales como un preciso estudio del estatus actual del suelo, la aplicación de técnicas optimizadas de dosificación de los fertilizantes para disminuir las pérdidas por vaporización y lixiviación y una mayor utilización de especies leguminosas (Pelletier *et al.*, 2011).

Estas alternativas deberán tener en consideración los siguientes puntos:

- a) Reducir el uso de fertilizantes químicos sin afectar los rendimientos de los cultivos.
- b) Aumentar el valor agregado de los productos agrícolas mediante la reducción de la aplicación de estos productos (producción orgánica).
- c) Aumentar la productividad de los cultivos por encima de los rendimientos alcanzados través de los procesos de producción convencional de los agricultores.
- d) Reducir el impacto de los fertilizantes y pesticidas químicos en la salud y el ambiente.

Entre las posibilidades tecnológicas para lograr los propósitos anteriores destacan la utilización de fertilizantes orgánicos (e.g. estiércoles, compostas, tés de composta y vermicompostas), la determinación de las dosis óptimas de fertilización con base en análisis de suelo y la utilización de microorganismos que poseen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y reducir el uso de los fertilizantes sintéticos sin afectar la productividad de los cultivos. Estos microorganismos promotores del crecimiento vegetal son empleados para la fabricación de productos biológicos conocidos como biofertilizantes.

El empleo de biofertilizantes (conocidos también en sentido amplio como bioinoculantes o inoculantes microbianos) para aumentar la productividad de los cultivos está considerado como una de las contribuciones más importantes de la biotecnología y la microbiología a la agricultura moderna. Los biofertilizantes constituyen una alternativa viable para reducir costos de producción y el impacto ambiental asociado a la fertilización química. Esta tecnología permite incrementar el valor agregado y rendimiento de los cultivos de 17% a 50%, mejorando la fertilidad del suelo y reduciendo las poblaciones

de microorganismos nocivos para los cultivos. Dentro del contexto de agricultura sostenible, la inoculación de plantas con microorganismos que reducen la incidencia de enfermedades y disminuyen la dependencia de agroquímicos es una alternativa biotecnológica real y particularmente atractiva para incrementar la productividad de los cultivos.

La noción de emplear microorganismos para mejorar la productividad de los cultivos no es nueva ya que se remonta a siglos atrás cuando los agricultores determinaron de manera empírica que el suelo utilizado para cultivar leguminosas podía ser utilizado para favorecer el desarrollo y crecimiento de otros cultivos.

La historia comercial de los biofertilizantes empezó en 1898 con el establecimiento en Milwaukee, Wisconsin, USA, de la empresa “The Nitragin Company” y la posterior comercialización 32 años después de los biofertilizantes fabricados con base en *Rhizobium*. Posteriormente, otros productos basados primero en *Azotobacter* y bacterias verde-azules, y posteriormente en *Azospirillum* y hongos arbusculares vinieron a complementar el mercado de los biofertilizantes. Durante el periodo de los años 1930-1940 bacterias diazotróficas de vida libre como *Azotobacter*, o la solubilizadora de fosfatos *Bacillus megaterium*, fueron empleadas a gran escala en Rusia y Europa del Este.

La penetración y aceptación que los biofertilizantes han tenido en algunos países es tal que, por ejemplo, en Brasil y Cuba la soya es cultivada con biofertilizantes que contienen microorganismos fijadores de nitrógeno sin la utilización de fertilizantes químicos nitrogenados. Sin embargo, en la mayoría de los países en desarrollo de Asia, África, Centroamérica, Suramérica, y en México, la tecnología de la biofertilización no ha tenido mayor impacto en la agricultura debido a que no se utilizan o los que se usan son de baja calidad (Bashan, 2008). La mayor parte de la investigación que se ha realizado sobre biofertilizantes en México se ha enfocado principalmente en la fijación biológica de nitrógeno en frijol y soya.

La factibilidad de emplear en México microorganismos promotores de crecimiento como una opción tecnológica viable para reducir costos asociados a la fertilización química manteniendo, o aún incrementando, la productividad de los cultivos ha resurgido nuevamente en virtud de la problemática actual en torno a los precios del petróleo, así como también del acrecentado interés de la sociedad por adoptar tecnologías compatibles con la conservación de los recursos naturales y la producción de alimentos libres de pesticidas.

A partir del año de 1999 y apoyado inicialmente por el Programa Nacional de Biofertilizantes del Gobierno Federal, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha realizado diversas evaluaciones en campo del efecto de inoculantes microbianos, basados en *Rhizobium etli*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense* y el hongo micorrizógeno *Glomus intraradices*, sobre la productividad de cultivos básicos de nuestro país. Los resultados obtenidos a través de este programa demostraron la factibilidad de utilizar biofertilizantes como una alternativa para incrementar la productividad de los cultivos en nuestro país (Aguirre-Medina, 2008).

A la fecha el INIFAP ha seguido contribuyendo a la difusión de esta tecnología entre los productores de tal manera que actualmente existe ya una creciente demanda de estos productos biológicos entre los agricultores de nuestro país y diversas empresas se han consolidado para satisfacer las necesidades del mercado de los biofertilizantes.

En forma más reciente, el Laboratorio de Biotecnología Microbiana del INIFAP, establecido en el Campo Experimental Bajío en Celaya, Gto., ha iniciado nuevas líneas de investigación enfocadas a identificar y desarrollar nuevos biofertilizantes basados en la actividad de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. La experiencia del grupo de investigación sobre biofertilizantes bacterianos del INIFAP, adquirida a través de un proyecto de cobertura nacional que tuvo por objetivo generar biofertilizantes y tecnologías propias para reducir el empleo de fertilizantes químicos en diferentes cultivos agrícolas de importancia económica, demostró la posibilidad de reducir en al menos 50% la fertilización química en maíz de temporal y aumentar en al menos un 20% los rendimientos de otros cultivos como chile y jitomate mediante el uso de los biofertilizantes bacterianos desarrollados.

En los siguientes capítulos del presente libro se presentará información básica y práctica sobre la aplicación de biofertilizantes en la agricultura, con énfasis en aquellos que usan como base bacterias promotoras del crecimiento vegetal, y se describirán algunas de las experiencias concretas en campo de investigadores del INIFAP sobre el uso de estos productos en diversos cultivos agrícolas de importancia económica para nuestro país.

Bibliografía Citada

- Aguado-Santacruz, G.A. 2011. Biofertilización de maíz: práctica redituable, factible y necesaria para la agricultura de nuestro país. *Claridades Agropecuarias* 214:42-47.
- Aguirre-Medina, J.F. 2008. Biofertilizantes microbianos: antecedentes del programa y resultados de validación en México. *In: La biofertilización como tecnología sostenible*. Díaz-Franco, A. y Mayek-Pérez, N. (eds). Plaza y Valdéz, México.
- Ahlgren, S., Baky, A., Bernesson, S., Nordberg, Å., Norén, O. and Hansson P. 2008. Ammonium nitrate fertiliser production based on biomass- Environmental effects from a life cycle perspective. *Biores. Technol.* 99:8034-8041.
- Aoun, M., El Samrani, A.G., Lartiges, B.S., Kazpard, V. and Saad, Z. 2010. Releases of phosphate fertilizer industry in the surrounding environment: investigation on heavy metals and polonium-210 in soil. *J. Environ. Sci.* 22:1387-1397.
- Banco Mundial. 2010. Consumo de fertilizantes (kilogramos por hectárea de tierras cultivables). <http://datos.bancomundial.org/indicador/AG.CON.FERT.ZS>.
- Bashan, Y. 2008. El uso de bioinoculantes microbianos como una importante contribución al futuro de la agricultura mexicana. *In: La biofertilización como tecnología sostenible*. Díaz-Franco, A. y Mayek-Pérez, N. (eds). Plaza y Valdéz, México.
- Bumb, B.L. and Baanante, C.A. 1996. World trends in fertilizer use and projections to 2020. 2020 Brief No. 38. International Food Policy Research Institute. Washington, DC, USA.
- Crewsa, T.E. and Peoples, M.B. 2004. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agr. Ecosyst. Environ.* 102:279-297.
- Elser, J. and Bennett, E. 2011. A broken biogeochemical cycle. *Nature* 478:29-31.
- FIRA. 2010. El Mercado de los Fertilizantes en México: Situación Actual y Perspectivas 2009. Nota de Análisis. Dirección de Análisis Económico y Sectorial, México.
- Galloway, N.J. 1996. Anthropogenic mobilization of sulphur and nitrogen: immediate and delayed consequences. *Annu. Rev. Energy Environ.* 21:261-92.

- Jacks, G. and Sharma, V.P. 1983. Nitrogen circulation and nitrate in ground water in an agricultural catchment in southern India. *Environ. Geol.* 5:61-64.
- Kalra, A. and Khanuja, S.P.S. 2007. Research and development priorities for biopesticide and biofertilizer products for sustainable agriculture in India. *In: Business Potential for Agricultural Biotechnology Products.* Teng, P.S. (ed). Asian Productivity Organization, Tokyo, Japan.
- Majumdar, D. 2003. The blue baby syndrome. Nitrate poisoning in humans. *Resonance* 10:20-30.
- Martínez, R.J.G., Castellanos, Z., Rivera, G.M, Núñez, H.G. y Faz, C.R. 2006. Contaminación por nitratos en acuíferos del norte de México y del Estado de Guanajuato. *Agrofaz* 6:379-388.
- Mengel, K. 1997. Agronomic measures for better utilization of soil and fertilizer phosphates. *Eur. J. Agron.* 7:221-233.
- Mozumdera, P. and Berrensb, R.P. 2007. Inorganic fertilizer use and biodiversity risk: an empirical investigation. *Ecol. Econom.* 62:538-543.
- Mutero, C.M., Ng'ang'a, P.N., Wekoyela, P., Githure, J. and Konradsen, F. 2004. Ammonium sulphate fertiliser increases larval populations of *Anopheles arabiensis* and culicine mosquitoes in rice fields. *Acta Trop.* 89:187-192.
- Pelletier, N., Audsley, E., Brodt, S., Garnett, T., Henriksson, P., Kendall, A., Kramer, K.J., Murphy, D., Nemecek, T. and Troell, M. 2011. Energy intensity of agriculture and food systems. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 36:223-246.
- Rockman, O.C. and Granli, T. 1991. Human health aspects of nitrate intake from food and water. *In: Chemistry of Agriculture and Environment.* Richardson, M.L. (ed). The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Sarathchandraa, S.U., Ghanía, A., Yeatesb, G.W., Burcha, G. and Coxa, N.R. 2001. Effect of nitrogen and phosphate fertilisers on microbial and nematode diversity in pasture soils. *Soil Biol. Biochem.* 33:953-964.
- Snyder, C.S., Bruulsema, T.W., Jensen, T.L. and Fixen, P.E. 2009. Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. *Agr. Ecosyst. Environ.* 133:247-266.
- Spångberg, J., Hanssona, P.A., Tidåkerb, P. and Jönsson, H. 2011. Environmental impact of meat meal fertilizer vs. chemical fertilizer. *Res. Conserv. Recyc.* 55:1078-1086.

- Walker, R. 1990. Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Addit. Contam.* 7:717-768.
- Yan, X., Jin, J., He, P. and Liang, M. 2008. Recent advances on the technologies to increase fertilizer use efficiency. *Agricult. Sci. in China* 7:469-479.

Capítulo 2

La Rizósfera y las Relaciones entre las Plantas y los Microorganismos

Blanca Moreno-Gómez

*Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Molecular de Plantas y Microorganismos
C.E. Bajío-INIFAP, Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende
Celaya, Gto. C.P. 38010.*

*email: moreno.blanca@inifap.gob.mx, blancam1980@yahoo.com.mx
Tel: (461) 6115323 ext. 217*

Una relación simbiótica se establece cuando dos organismos (en este caso una planta y una bacteria u hongo) establecen una interacción estrecha que a menudo es de largo plazo. Esta relación puede ser benéfica para ambos organismos (mutualismo), favorecer sólo a uno de ellos dañando al otro (parasitismo), o bien beneficiar a uno de ellos y no tener consecuencias para el otro (comensalismo).

Las interacciones entre las plantas y los microorganismos benéficos ocurren principalmente en la porción del suelo en estrecho contacto con la raíz conocida como rizósfera (Fig. 1). La rizósfera se define como el volumen de suelo asociado e influenciado por las raíces de las plantas o los materiales derivados de éstas (Bringhurst *et al.*, 2001). Esta zona incluye el suelo unido por las raíces de las plantas que a menudo se extiende de uno a cinco milímetros de la superficie de las raíces. Se estima que la concentración de bacterias en la rizósfera es de 10 a 1000 veces mayor que en el suelo alejado de esta zona (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Algunas de las características más importantes de la rizósfera son:

- Constituye un ambiente favorable para el desarrollo de microorganismos, bacterias, hongos y microfauna (nemátodos, ácaros, insectos, entre otros) en cantidades muy superiores a las encontradas en el resto del suelo. Debido a que muchos de los microorganismos presentes en la rizósfera son capaces de promover el crecimiento de las plantas se les considera deseables en los sistemas de producción agrícola. Se estima que de un 2

a 5% de las bacterias presentes en la rizósfera ejercen un efecto benéfico sobre el desarrollo y crecimiento de las plantas (Kloepper y Schroth, 1978).

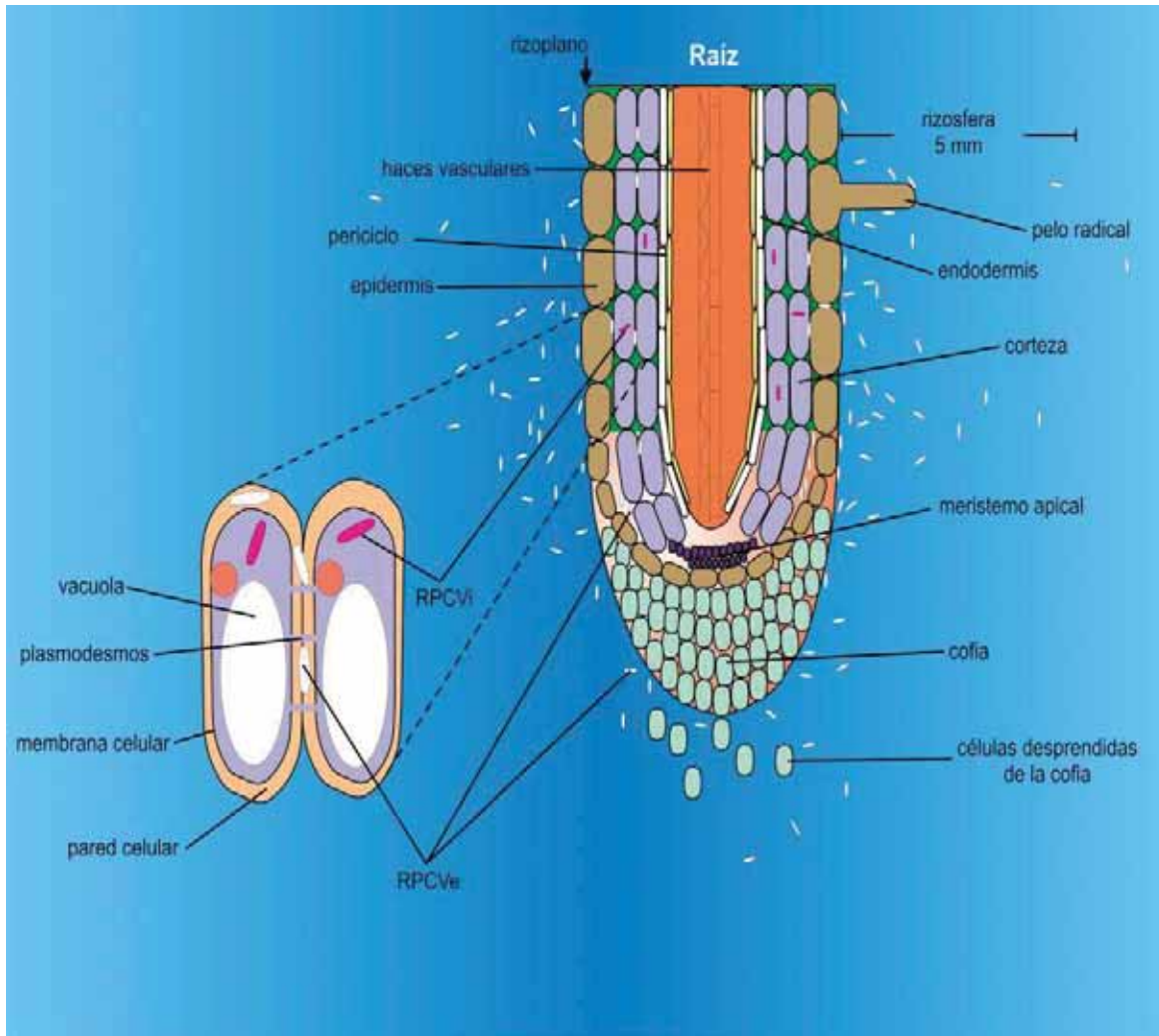


Figura 1. Interacciones entre las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden tener una localización intracelular (RPCVi) cuando invaden el citoplasma de las células vegetales, o extracelular (RPCVe) cuando se ubican en la rizósfera, el rizopiano, los espacios intercelulares o el apoplasto.

- La mayoría de los organismos rizosféricos ocurren dentro de los 50 μm más cercanos a la superficie de las raíces; las poblaciones dentro de los primeros 10 μm pueden alcanzar 1.2×10^8 células cm^{-3} o 10^9 - 10^{12} células

microbianas g^{-1} suelo (Gray y Smith, 2005). Muchas bacterias que viven en el suelo están expuestas a una gran cantidad de compuestos, por lo que han desarrollado la capacidad para degradar diversos compuestos xenobióticos. Actualmente existe una intensa investigación para utilizar estas bacterias con fines de biorremediación (Lucy *et al.*, 2004; Abdul, 2006; Germaine *et al.*, 2006; Porteous-Moore *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2007).

- En la rizósfera existe una gran estabilidad de las partículas de suelo provocada por la acción mecánica de las raíces y la acción aglutinante de los exudados de los diferentes organismos presentes.
- Esta porción del suelo presenta una alta concentración de nutrientes ya que es el lugar de destino de una gran proporción de los carbohidratos producidos por las plantas durante la fotosíntesis y que al ser exudados al ambiente a través de sus raíces proveen una fuente importante de energía a los microorganismos circundantes. Estos a su vez, y en retribución, protegen a las raíces de organismos patógenos y solubilizan minerales haciéndolos más asimilables (Rovira, 1973). Se estima que hasta 40% de los fotosintatos producidos por la planta son exudados al ambiente con este propósito (Lynch y Whipps, 1990).

Los microambientes que se crean a lo largo de la rizósfera provocan que la distribución de microorganismos no sea uniforme, encontrándose que, por ejemplo, *Kluyvera ascorbata* coloniza los 2/3 superiores de la superficie de las raíces de canola, pero no habita en las puntas de las raíces (Ma *et al.*, 2001). Por otro lado, *Azospirillum* prefiere las zonas de elongación y formación de pelos radicales de las plantas (Bashan y Holguin, 1997).

Dado que las plantas proporcionan un ambiente y los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos, y éstos, a su vez, proveen a las plantas de sustancias que promueven su crecimiento, las relaciones que se establecen entre los microorganismos benéficos y las plantas son de tipo mutualista; a este respecto es importante mencionar que algunos autores equiparan el término mutualismo con el de simbiosis.

Cuando las bacterias se localizan en estructuras especializadas, como los nódulos de las leguminosas, se establece una simbiosis mutualista estricta u obligada. Contrariamente, cuando la relación que se establece entre las bacterias y las plantas no involucra la organización de nuevos tejidos se conoce como simbiosis asociativa (Echegaray-Alemán, 1995).

Debido a que las bacterias que establecen simbiosis asociativas con las plantas no dependen estrictamente de esta relación para su proliferación son conocidas como bacterias de vida libre, independientemente de que puedan encontrarse cerca, en o aún dentro de las raíces de las plantas (Kloepper *et al.*, 1988; Frommel *et al.*, 1991).

Las bacterias que habitan en la rizósfera y colonizan agresivamente las raíces de las plantas son conocidas como rizobacterias y aquellas que además poseen la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas son conocidas comúnmente como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV), Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) o bien PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), por sus siglas en inglés. Esta actividad de promoción de crecimiento se refleja en diversas variables agronómicas, como el incremento de la germinación, emergencia, establecimiento o vigor de las plántulas, proliferación del sistema radical, o incremento en la biomasa de las plantas o en los rendimientos finales de los cultivos. Aunque el concepto enfatiza el efecto de las bacterias sobre el crecimiento de las plantas no menos importantes son las actividades que ejercen estos microorganismos sobre el desarrollo de las plantas adelantando los tiempos de floración en plantas ornamentales o bien mejorando la calidad de los frutos en cuanto a su tamaño o propiedades organolépticas. Se menciona, por ejemplo, que es posible mejorar el grado de dulzura (grados Brix) de algunos frutos como melón, utilizando bacterias solubilizadoras de fosfatos (Chien *et al.*, 2009).

De acuerdo a su concepción inicial las RPCV son consideradas como rizobacterias de vida libre (Kloepper *et al.*, 1989) que en ocasiones invaden los tejidos vivos de las plantas sin causar infecciones sintomáticas evidentes y que ejercen un efecto benéfico sobre el crecimiento vegetal (Sturz y Nowak, 2000).

Aunque la definición original de rizobacterias se restringía a bacterias de vida libre para diferenciarlas de los rizobios fijadores de nitrógeno y del género *Frankia*, con el tiempo este término se ha llegado a utilizar en una forma menos restrictiva para designar cualquier bacteria capaz de colonizar las raíces de las plantas.

Asimismo, aunque en su connotación original los rizobios y *Frankia* no deberían ser consideradas como RPCV, recientes investigaciones han demostrado que los rizobios no necesariamente requieren de la formación de estructuras especializadas para promover el crecimiento de algunas plantas consideradas normalmente como no hospederas, como las gramíneas (Matiru y Dakora, 2004), por lo que en este sentido si pueden ser consideradas como RPCV, particularmente cuando su mecanismo de promoción de crecimiento no se relacione necesariamente con la fijación biológica de nitrógeno (Antoun *et al.*, 1998).

En función de la localización de las bacterias en las plantas se pueden establecer relaciones simbióticas endofíticas o rizosféricas (Fig. 1). Los microorganismos que establecen una íntima relación con las raíces de las plantas son conocidos como endófitos.

Por definición, los organismos endófitos deben encontrarse dentro de los tejidos vegetales (*i.e.*, traspasar la barrera epidérmica de las raíces) y no causar un daño aparente a las plantas (Petrini, 1991; Wilson, 1995); algunos de ellos pueden inclusive auxiliar a las plantas a tolerar diferentes tipos de estrés ambiental como sequía o bien ayudarles a evadir el pastoreo por los animales mediante la producción de compuestos antiherbivoría (Scott, 2001; Sullivan *et al.*, 2007).

Contrariamente a los endofíticos, los microorganismos rizosféricos son de vida libre y ejercen sus efectos de estimulación de crecimiento desde afuera de la planta, habitando ya sea sobre la superficie de las raíces o en la rizósfera abierta, si bien Vessey (2003) menciona que bajo ciertas circunstancias también pueden ocupar espacios intercelulares superficiales de las plantas.

Se ha propuesto que una bacteria sea considerada endófito cuando pueda ser aislada a partir de tejidos vegetales superficialmente desinfectados o desde adentro de la planta y no provoque un daño visible a la planta (Hallmann *et al.*, 1997). Desde esta perspectiva, la mayoría de las RPCV son microorganismos endofíticos ya que solamente una parte de ellas habita en la superficie de las raíces o la zona rizosférica abierta (Nowak, 1998).

Las rizobacterias noduladoras y otras bacterias fijadoras de nitrógeno que habitan en órganos de la raíz especialmente desarrollados son consideradas como endofitas con actividad de promoción de crecimiento vegetal e incluyen a los géneros *Rhizobium* y *Frankia*, así como a las cianobacterias fijadoras de nitrógeno de las cícadas.

Existe, por otra parte, una asociación simbiótica especial entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* y la caña de azúcar conocida como endofitismo obligado que se caracteriza por la colonización no invasiva del citoplasma de las células por las bacterias, la ausencia de tejidos especializados y una estricta necesidad del ambiente proporcionado por las raíces de las plantas para poder vivir, *i.e.*, la bacteria no puede sobrevivir en un suelo abierto carente de plantas hospederas (Muthukumarasamy *et al.*, 2002). Este endofito obligado puede proveer hasta el 80% del nitrógeno requerido por la caña de azúcar a través de la fijación biológica de nitrógeno (Boddey *et al.*, 1991).

A fin de establecer más claramente los límites de interacción entre las plantas y las RPCV, Gray y Smith (2005) han propuesto convenientemente el establecimiento de dos categorías de bacterias promotoras de crecimiento: las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal intracelulares (RPCVi) y las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal extracelulares (RPCVe). Las primeras residen dentro de las células vegetales en estructuras especializadas como los nódulos radicales presentes en la asociación *Rhizobium*-leguminosas, mientras que las RPCVe habitan y ejercen sus efectos de estimulación de crecimiento desde afuera de las células vegetales y no inducen la formación de nuevos crecimientos en las plantas (Fig. 1). Por no depender de la formación de tejidos especializados, esta definición de RPCVe correspondería en esencia al concepto de bacterias de vida libre empleado por otros autores.

Con base en su grado de asociación con las raíces de las plantas, las rizobacterias promotoras de crecimiento extracelulares se pueden subdividir en tres subtipos: a) aquellas que habitan cerca y establecen un contacto directo con las raíces, b) aquellas que colonizan la superficie de la raíz, y c) aquellas que residen en los espacios entre las células de la corteza de la raíz (Fig. 1).

De acuerdo con Gray y Smith (2005) la categorización de las RPCV en extracelulares e intracelulares sólo refleja el continuo que existe en las interacciones planta-microorganismos, ya que por ejemplo, el género *Burkholderia* pueden incluir especies que pueden ubicarse dentro de una u otra de estas categorías.

Es importante mencionar que la ubicación espacial de las bacterias tiene un impacto determinante sobre los efectos que las RPCV pueden tener sobre la planta. Sobre esta base las bacterias endófitas podrían tener algunas ventajas competitivas sobre las bacterias rizosféricas debido a que la disponibilidad de nutrientes es mayor en el interior de las plantas y el número de microorganismos endófitos es menor que el de los rizosféricos (James, 2000). Además las bacterias endófitas se encuentran mejor protegidas de condiciones ambientales externas adversas que las rizosféricas (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998).

Considerando que se encuentran en contacto íntimo con las plantas, también se esperaría que las bacterias endófitas brindaran beneficios más directos a su hospedero en comparación con las bacterias rizosféricas, ya sea secretando factores de estimulación de crecimiento (e.g. fitohormonas) al interior de las plantas y/o protegiéndolas más eficientemente contra la acción de los fitopatógenos. Esta protección podría ser a través de efectos antagónicos mediados a través de sustancias que inhiben el crecimiento de los patógenos (Muthukumarasamy *et al.*, 2000) o bien, mediante la inducción de una respuesta de defensa de la planta contra patógenos, mediada a través del microorganismo endófito. Es importante mencionar que el interior de las plantas es un ambiente propicio para la fijación biológica de nitrógeno (FBN), ya que este ambiente es bajo en oxígeno y relativamente alto en fuentes de

carbono (James y Olivares, 1998), por lo que las bacterias diazótroficas endófitas podrían fijar el nitrógeno y liberarlo directamente al interior de las plantas (Döbereiner, 1993).

Bibliografía Citada

- Abdul, G.K. 2006. Mycorrhizoremediation-an enhanced form of phytoremediation. J. Zhejiang Univ. 7:503-514.
- Antoun, H., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R. and Lalande, R. 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). Plant Soil 204:57-67.
- Bashan, Y. and Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Can. J. Microbiol. 43:103-121.
- Boddey, R.M., Urquiaga, S., Reis, V. and Döbereiner, J. 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. Plant Soil 137:111-117.
- Bringhurst, R.M., Cardon, Z.G. and Gage, D.J. 2001. Galactosides in the rhizosphere: utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. Proc. Natl. Acad. Sci. 10:4540-4545.
- Chien, S.Y., Young, C.C. and Wang, C-L. 2009. Current status of bio-fertilizers development, farmer's acceptance and utilization, and future perspective in Taiwan. Extension Bulletin. Food & Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region. Taipei, Taiwan.
- Döbereiner, J. 1993. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. Symbiosis 13:1-13.
- Echegaray-Alemán, A. 1995. Ciclo del nitrógeno y fases que lo constituyen. *In: Agromicrobiología: Elemento Útil en Agricultura Sustentable*. Ferrera-Cerrato, R. y Pérez-Moreno, J. (eds). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Frommel, M.I., Nowak, J. and Lazarovits, G. 1991. Growth enhancement and development modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. Plant Physiol. 96:928-936.
- Germaine, K.J., Liu, X., Cabellos, G.G., Hogan, J.P., Ryan, D., Dowling, D.N. 2006. Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. FEMS Microbiol. Ecol. 57:302-310.
- Gray, E.J. and Smith, D.L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR. Soil Biol. Biochem. 37:395-412.

- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43:895-914.
- James, E.K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Res.* 65:197-209.
- James, E.K. and Olivares, F.L. 1998. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17:77-119.
- Kloepper, J.W., Hume, D.J., Schner, F.M., Singleton, C., Tipping, B., Laliberte, M., Frauley, K., Kutshaw, T., Simonson, C., Lifshitz, R., Zaleska, I. and Lee, L. 1988. Plant growth promoting rhizobacteria on canola. *Plant Dis.* 72:42-46.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R. and Zablutowicz, R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7:39-44.
- Kloepper, J.W. and Schroth, M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria in radish. *In: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria.* Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA, Angers, France.
- Lucy, M., Reed, E. and Glick, R.B. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:1-25.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:541-556.
- Lynch, J.M. and Whipps, J.M. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129:1-10.
- Ma, W., Zalec, K. and Glick, B.R. 2001. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35:137-144.
- Matiru, V.N. and Dakora, F.D. 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African J. Biotechnol.* 3:1-7.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G. and Loganathan, P. 2002. Effect of inorganic N on the population, *in vitro* colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus* (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*). *Plant Soil* 243:91-102.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G. and Vadivelu, M. 2000. Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal of red-rot of sugarcane. *Curr. Sci.* 78:1063-1065.

- Nowak, J. 1998. Benefits of *in vitro* bacterization of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 34:122-130.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. *In: Microbial Ecology of Leaves.* Andrews, J.A. and Hirano, S.S. (eds). Springer-Verlag, New York.
- Porteous-Moore, F., Barac, T., Borremans, B., Oeyen, L., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., Campbell, D. and Moore, E.R.B. 2006. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Syst. Appl. Microbiol.* 29:539-556.
- Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* 6:139-144.
- Rovira, A.D. 1973. Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of microorganisms in the rhizosphere. *Pestic. Sci.* 4:361-366.
- Ryan, R.P., Ryan, D. and Dowling, D.N. 2007. Plant protection by the recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* F113rifPCB strain expressing arsenic resistance: improving rhizoremediation. *Lett. Appl. Microbiol.* 45:668-674.
- Scott, B. 2001. *Epichloë* endophytes: fungal symbionts of grasses. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:393-398.
- Sturz, A.V and Nowak, J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing association with crops. *Appl. Soil Ecol.* 15:183-190.
- Sullivan, T.J., Rodstrom, J., Vandop, J., Librizzi, J., Graham, C., Schardl, C.L. and Bultman, T.L. 2007. Symbiont-mediated change in *Lolium arundinaceum* inducible defenses: evidence from changes in gene expression and leaf composition. *New Phytol.* 176:673-679.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571-586.
- Wilson, D. 1995. Endophytes: the evolution of a term, a clarification of their use and definition. *Oikos* 73:274-276.

Capítulo 3

Uso de Microorganismos como Biofertilizantes

Gerardo Armando Aguado-Santacruz

Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Molecular de Plantas y Microorganismos
C.E. Bajío-INIFAP, Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel
de Allende, Celaya, Gto. C.P. 38010.
email: aguado.armando@inifap.gob.mx, gaguados@gmail.com
Tel: (461) 6115323 ext. 122

Los biofertilizantes, también conocidos como bioinoculantes, inoculantes microbianos o inoculantes del suelo, son productos agrobiotecnológicos que contienen microorganismos vivos o latentes (bacterias u hongos, solos o combinados) y que son agregados a los cultivos agrícolas para estimular su crecimiento y productividad.

Las raíces del término biofertilizante provienen de las palabras biológico y fertilizante, por lo que este vocablo hace referencia a un fertilizante biológico. En este contexto, un biofertilizante contiene microorganismos vivos que mejoran el estatus nutricional de las plantas, mientras que productos orgánicos como estiércol, residuos de cosechas, composta y vermicomposta que también son agregados al suelo para favorecer su nutrición no son considerados como biofertilizantes sino como *fertilizantes orgánicos*. Debido a la novedad de esta tecnología en nuestro país y al gran impulso que desde el año 2000 el gobierno mexicano ha otorgado para la utilización y difusión de los biofertilizantes muchas compañías intentan actualmente que sus productos sean catalogados como tales cuando no reúnen el requisito de poseer microorganismos vivos (latentes). Aunque debido a su naturaleza, estos productos orgánicos poseen microorganismos vivos, éstos no son cultivados de manera controlada y axénica para la formulación del producto y por lo tanto la composición exacta de los microorganismos presentes es desconocida y variable. Igualmente, estos productos pueden contener, en el peor de los casos, microorganismos patogénicos no solamente para las plantas sino para los animales y los propios humanos.

Aunque el término biofertilizante se empleó inicialmente para facilitar el registro de cepas con fines comerciales, algunos autores mencionan que el término debería ser eliminado ya que sólo algunos microorganismos cumplen estrictamente con la función de incorporar nuevos nutrientes a los ecosistemas, básicamente los microorganismos fijadores de nitrógeno (Bashan, 1998).

Los microorganismos poseen una gran diversidad de mecanismos a través de los cuales promueven el crecimiento de las plantas. En función de estos mecanismos se reconocen cuatro grandes grupos de microorganismos promotores del crecimiento vegetal:

a) *Microorganismos que incorporan nitrógeno al sistema planta-suelo mediante la fijación biológica de nitrógeno.*

Los fijadores de nitrógeno más eficientes son bacterias que pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium* (Bloemberg y Lugtenberg, 2001).

b) *Microorganismos que incrementan la captación de nutrientes y agua.*

En esta categoría se pueden mencionar a las micorrizas que juegan un importante papel en absorción de agua, fósforo, zinc, azufre y cobre (Saif y Khan, 1977; Hayman, 1982), y bacterias como *Azospirillum* spp., que incrementan la capacidad de absorción de agua y nutrientes por las plantas mediante la estimulación de su crecimiento radical a través de la producción de hormonas.

c) *Microorganismos que aumentan la disponibilidad de nutrientes que se encuentran en el suelo en formas no asimilables.*

En esta categoría se incluyen microorganismos que solubilizan fósforo mediante la producción de fosfatasas o ácidos orgánicos (e.g. *Bacillus megaterium* o *Pseudomonas fluorescens*), bacterias oxidadoras de azufre que convierten azufre elemental o cualquier forma reducida de este elemento a sulfatos que son la forma aprovechable por las plantas, y microorganismos productores de sideróforos, como algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Flavobacterium* que incrementan la disponibilidad de hierro a las plantas.

d) *Microorganismos que poseen actividades antagónicas contra agentes fitopatógenos.*

Este mecanismo se sustenta en el hecho de que una planta sana se alimentará y funcionará mejor, además de que será capaz de amortiguar más eficientemente el efecto de deficiencias nutricionales o el impacto de condiciones ambientales adversas. En este grupo se reconocen las propiedades de biocontrol de diferentes especies de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Flavomonas*, *Curtobacterium* y *Trichoderma*, entre otros.

Adicionalmente se han propuesto otras categorías para referenciar los mecanismos a través de los cuales los microorganismos promueven el crecimiento de las plantas:

a) *Biopesticidas o bioplaguicidas.*

Incluyen microorganismos que estimulan el crecimiento de las plantas mediante el control de agentes fitopatógenos. Por ejemplo, *Pseudomonas aurantiaca* es una bacteria promotora de crecimiento de color naranja, Gram negativa, aislada originalmente de la rizósfera de papa que produce el compuesto di-2,4 diacetilfloroglucilmetano que es un antibiótico activo contra diversos organismos fitopatógenos del suelo (Esipov *et al.*, 1975; Felker *et al.*, 2005). Adicionalmente algunos otros microorganismos endófitos, e.g. *Cladosporium sphaerosperum*, *Neotyphodium* sp., *Phomopsis oblonga*, *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas fluorescens* poseen actividades de biocontrol contra insectos (Azevedo *et al.*, 2000) o nemátodos (Hallmann *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 2009) nocivos para las plantas.

b) *Bioestimuladores o fitoestimuladores.*

En esta categoría se agrupan microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas usualmente a través de la producción de hormonas. Se ha logrado dilucidar que el principal mecanismo de promoción de crecimiento de *Azospirillum brasilense* se relaciona con su capacidad para estimular el crecimiento radical a través de la producción de ácido indol acético (AIA).

Vessey (2003) menciona que aunque los biopesticidas estimulan el

crecimiento de las plantas a través del control de organismos patogénicos no ejercen un efecto directo sobre el estatus nutricional de las plantas y, por lo tanto, no deberían ser considerados como biofertilizantes. Con base en esta premisa se ha propuesto diferenciar las bacterias promotoras de crecimiento en biocontrol-PGPB's y PGPB's en función de si exhiben o no antagonismo contra organismos patogénicos (Bashan y Holguin, 1997).

De acuerdo con Vessey (2003) dentro de los biofertilizantes debe incluirse cualquier microorganismo que promueva el crecimiento de las plantas incrementando el suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios a la planta hospedera, ya sea favoreciendo el reabasteciendo de los nutrientes del suelo (por ejemplo, a través de la fijación biológica de nitrógeno), aumentando la disponibilidad de estos nutrientes (por ejemplo mediante la solubilización de fosfatos) o bien ampliando el acceso físico de las plantas a estos nutrientes (por ejemplo, incrementando el volumen o modificando la estructura de las raíces).

Conforme a esta definición los biofertilizantes incluirían tanto a los microorganismos que incorporan nuevos nutrientes al sistema planta-suelo como aquellos que incrementan la captación o disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, esta circunscripción plantea una problemática ya que muchos microorganismos poseen más de un mecanismo de promoción de crecimiento e incluso algunos otros poseen actividades adicionales de biocontrol (Raupauch y Kloepper, 2000; Manjula y Podile, 2001; Guo *et al.*, 2004). Con base en estas premisas algunos autores proponen utilizar el término en un sentido más amplio para incluir cualquier producto biológico o microorganismo capaz de promover el crecimiento de las plantas independientemente de los mecanismos utilizados para este fin; ésta es la acepción para el término biofertilizante que se adopta en este libro.

Los beneficios del uso de los biofertilizantes en la agricultura incluyen:

- Aumento de la capacidad de las plantas para absorber agua y nutrientes del suelo.
- Reducción de los requerimientos de irrigación y fertilización en los cultivos.

- Aumento del crecimiento y establecimiento de las plántulas.
- Incremento del enraizamiento de esquejes.
- Aumento del vigor de las plántulas y plantas adultas.
- Biocontrol de fitopatógenos.
- Reducción de los tiempos de cosecha (en algunos casos entre 7 y 9 días; Dibut y Martínez, 2004) y extensión de los tiempos de producción.
- Incremento del rendimiento de los cultivos, tanto en campo como en invernadero.
- Aumento de la calidad de los frutos.
- Compatibilidad con la producción orgánica de los cultivos agrícolas.
- Reducción de la contaminación ambiental a través de la disminución del uso de pesticidas y fertilizantes químicos (Kennedy, 2001).
- Bioremediación de suelos contaminados por derivados del petróleo y metales pesados. Diferentes experimentos han demostrado el gran potencial de las BPCV y micorrizas para la destoxificación de contaminantes orgánicos (Lucy *et al.*, 2004; Abdul, 2006). En particular, la capacidad de *Burkholderia xenovorans* (antes *Pseudomonas cepacia*, *Burkholderia cepacia* o *Burkholderia fungorum*) para degradar pesticidas cloroorgánicos y bifenilos policlorinados (PCBs) está bien documentada. Existe además la tecnología desarrollada por Kuiper y colaboradores (Kuiper *et al.*, 2001), denominada rizoremediación, en la cual se seleccionan rizobacterias degradadoras de contaminantes que viven sobre, o están cercanas a la raíz, de tal modo que no dependen de su capacidad para asimilar los productos de la degradación de estos químicos sino de los exudados secretados por la planta a través del sistema radical.

Algunos microorganismos poseen una gran diversidad de valores agregados. Por ejemplo, se sabe que algunas cepas de *Pseudomonas* poseen actividades de biocontrol contra fitonemátodos (Haas y Kell, 2003; Ali *et al.*, 2002) y algunos moluscos que representan un problema en reservorios de agua (Molloy y Mayer, 2007). Asimismo, algunas especies del hongo de biocontrol

Trichoderma son productoras eficientes de muchas enzimas extracelulares empleadas en la industria alimentaria y textil. Debido a sus capacidades para degradar polisacáridos complejos poseen además un gran potencial en la producción de biocombustibles lignocelulósicos (Kovacs *et al.*, 2009).

Finalmente, otra ventaja del empleo de microorganismos como un medio para controlar enfermedades en las plantas es que (a diferencia de lo que sucede con los pesticidas químicos) es menos probable que los patógenos desarrollen resistencia ante los microorganismos debido a que muchos de ellos poseen múltiples mecanismos de biocontrol.

Mecanismos de acción de los biofertilizantes

Los mecanismos que explican las respuestas a la inoculación con microorganismos en el desarrollo y la productividad de los cultivos pueden ser directos o indirectos.

Mecanismos directos

Mediante estos mecanismos los biofertilizantes mejoran el crecimiento de las plantas favoreciendo su nutrición, ya sea aumentando la disponibilidad o absorción de nutrientes y agua, liberando hormonas estimuladoras del crecimiento vegetal o bien alterando la estructura y la superficie de absorción de las raíces.

Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

Consiste en la reducción enzimática de nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4). En algunas plantas este proceso reductivo se lleva a cabo en estructuras especializadas (como los nódulos radicales de las leguminosas) y es catalizado por el complejo enzimático de la nitrogenasa que consta de dos proteínas distintas llamadas dinitrogenasa (proteína de hierro molibdeno) y dinitrogenasa reductasa (proteína de hierro) (Bulen y LeComte, 1966; Hageman y Burris, 1978).

Síntesis de hormonas

Las hormonas son compuestos naturales que en bajas concentraciones son capaces de afectar procesos morfológicos y fisiológicos fundamentales de las plantas. La producción de sustancias promotoras del crecimiento (auxinas, giberelinas y citocininas) ha sido uno de los principales mecanismos de acción directa empleados por los investigadores para explicar la estimulación de crecimiento por la aplicación de los biofertilizantes (Brown, 1974; Patten y Glick, 1996; García de Salamone *et al.*, 2005). La producción de ácido indol acético (AIA) es uno de los sistemas de promoción de crecimiento más extendido dentro de las bacterias, particularmente Gram negativas. El precursor de esta hormona, el aminoácido triptófano, es uno de los compuestos mayormente abundantes en los exudados radicales (Kamilova *et al.*, 2006) y la hormona AIA puede ser encontrada hasta en un 80% de las bacterias aisladas de la rizósfera de algunas plantas (Loper y Schroth, 1986).

Síntesis de vitaminas

Se ha propuesto que la producción de ciertas vitaminas contribuye de manera significativa a la actividad promotora de crecimiento de ciertos microorganismos. Por ejemplo, se ha demostrado que la cepa 267 de *Pseudomonas fluorescens* produce vitaminas hidrosolubles del grupo B que estimulan el crecimiento de trébol rojo, *Trifolium pratense* (Marek-Kozaczuk y Skorupska, 2001). Asimismo, algunas cepas de *Azotobacter* y *Azospirillum* producen vitaminas del grupo B que promueven la capacidad de enraizamiento y afectan las poblaciones microbianas (Rodelas *et al.*, 1993; Revillas *et al.*, 2000).

Regulación de los niveles de etileno

El etileno es una hormona vegetal que puede inhibir el desarrollo de la raíz y por tanto limitar la capacidad de las plantas para absorber nutrientes y agua. En las plantas superiores, la enzima S-adenosil-L-metionina (SAM) sintasa cataliza la conversión de metionina a SAM (Giovanelli *et al.*, 1980). En

respuesta a distintos tipos de estrés que incluyen lesiones, estrés por agua (anegamiento y sequía), salinidad, herbicidas, entre otros, la enzima ACC sintasa cataliza la conversión de SAM en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) precursor inmediato del etileno. Posteriormente, la enzima ACC oxidasa cataliza la conversión de ACC a etileno, dióxido de carbono y cianuro de hidrógeno (John, 1991). Este aumento en los niveles de etileno en la raíz provoca un retraso en crecimiento de la raíz. Algunos microorganismos, por ejemplo algunas especies de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, poseen una enzima llamada ACC desaminasa que hidroliza el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, precursor inmediato del etileno, para formar amoníaco y α -cetobutirato (Mayak *et al.*, 1999; Shaharoon *et al.*, 2006; Glick *et al.*, 2007) y con esto impedir la formación de etileno. Consecuentemente, cuando la actividad de la ACC desaminasa incrementa, los niveles de etileno en la planta disminuyen y el desarrollo de la raíz aumenta visiblemente (Muhammad *et al.*, 2007).

Producción de sideróforos

Los sideróforos son moléculas (principalmente péptidos no ribosomales) con una alta afinidad por el hierro que son producidos por diversos microorganismos y gramíneas (Neilands, 1952; Neilands, 1995) para aumentar la biodisponibilidad de este elemento. A pH neutro, la disponibilidad de hierro en el suelo es muy limitada para las plantas debido a la baja solubilidad de las fases minerales (como los óxidos de hierro) con las que se asocia este elemento. Los sideróforos disuelven estas fases minerales formando complejos solubles de hierro que pueden ser introducidos en las células vegetales mediante mecanismos de transporte activo. Bajo condiciones anóxicas (con poco oxígeno), el hierro se encuentra por lo general en un estado de oxidación Fe^{+2} (ión ferroso) que es soluble. Sin embargo, bajo condiciones óxicas (con una alta concentración de oxígeno), el hierro se encuentra como ión férrico (Fe^{+3}) que es capaz de formar diversos minerales insolubles. Para obtener el hierro de estos minerales las células producen sideróforos que se unen al hierro con una alta afinidad y lo transportan hacia el interior de las mismas.

Algunos sideróforos producidos por diferentes bacterias y hongos incluyen ferricromo (*Ustilago sphaerogena*), micobactina (*Mycobacterium* sp), enterobactina y bacillibactina (*Bacillus subtilis*), ferrioxamina B (*Streptomyces pilosus*), azotobactina (*Azotobacter vinelandii*), pseudobactina (*Pseudomonas* B10) y ornibactina (*Burkholderia cepacia*). Las pseudomonadas fluorescentes producen un sideróforo peptídico de alta afinidad por hierro llamado pioverdina (Madigan y Martinko, 2005).

Solubilización de fosfatos

El fósforo (P) es, después del nitrógeno, el macronutriente más importante para la nutrición de las plantas y un elemento crítico en ecosistemas agrícolas y naturales de todo el mundo. El fósforo es un componente primordial de moléculas fundamentales para los seres vivos tales como ARN, ADN, AMP, ADP, ATP y fosfolípidos.

La productividad de las regiones áridas es particularmente pobre debido a la baja y errática precipitación, pero también por la baja disponibilidad de fósforo que presentan. El fósforo del suelo es fácilmente convertido en complejos insolubles tales como óxidos hidrosos (óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos) de hierro y aluminio, silicato de aluminio amorfo y cristalino y carbonato de calcio (Sample *et al.*, 1980).

Aunque los suelos de las zonas áridas contienen una alta concentración de fósforo, *i.e.* 557-729 kg/ha, en función del uso del suelo solamente del 2.4 al 3.9% se encuentra en formas disponibles para las plantas. Generalmente, del 15 al 20% (97 a 110 kg/ha) del fósforo total está presente en formas inorgánicas tales como fitina, lecitina, fosfolípidos y otros compuestos; el restante 77-82% está disponible en formas inorgánicas como fosfato tricálcico y en una menor cantidad como fosfatos de hierro y aluminio (Rao y Tarafdar, 2002). Las formas insolubles del fósforo incluyen los fosfatos de aluminio en suelos ácidos y fosfatos de calcio en suelos alcalinos. Las reacciones de fijación en el suelo ocasionan que solamente una parte (10 al 15%) del fósforo de los fertilizantes químicos o estiércoles aplicados pueda ser utilizado por las plantas en el mismo año de su aplicación.

La deficiencia de fósforo ocasiona una reducción del crecimiento de las plantas, alteración del color de las hojas a un verde azulado y la producción de frutos pequeños y ácidos. Las estrategias para corregir la baja disponibilidad de fósforo incluyen el uso de fuentes orgánicas de este elemento (como roca fosfórica o fertilizantes fosforados de pescado) y la utilización de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF, o PSB por sus siglas en inglés), capaces de aumentar la disponibilidad de este elemento para las plantas. Las BSF constituyen un grupo benéfico de bacterias capaces de hidrolizar tanto fósforo orgánico como inorgánico a partir de compuestos insolubles (Goldstein *et al.*, 2003). Las BSF secretan tanto ácidos orgánicos y fosfatasas para convertir los fosfatos insolubles en iones solubles de fosfato monobásico (H_2PO_4^-) y dibásico (HPO_4^-), a través del proceso conocido como solubilización de fosfato mineral.

Se acepta generalmente que el principal mecanismo de solubilización de fosfato mineral se asocia con la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, los cuales quelan los cationes unidos al fosfato a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo y favoreciendo de esta forma su conversión en formas solubles. En adición, algunas BSF producen fosfatasas, como la fitasa, que hidrolizan las formas orgánicas de los compuestos de fosfato eficientemente. Las BSF poseen la capacidad de solubilizar compuestos como el fosfato tricálcico, el fosfato dicálcico, la hidroxiapatita y la roca fosfórica y los ácidos glucónico y 2-cetoglucónico son los compuestos más frecuentemente referidos como solubilizadores de fosfato.

La capacidad de los ácidos orgánicos para aumentar la disponibilidad de P, no sólo se debe a la acidificación en la rizósfera de la planta, sino también a su capacidad de formar complejos estables con el Al y Fe. Los ácidos orgánicos incrementan la disponibilidad de micronutrientes, como Fe, Zn y Mn, en el suelo al disminuir el pH en la rizósfera, o por la quelación de estos micronutrientes.

La solubilización de fosfatos del suelo conlleva a un incremento en la disponibilidad de fósforo y consecuentemente a un aumento de la absorción de este elemento por las plantas (Gyaneshwar *et al.*, 2002). De igual manera, los ácidos orgánicos participan en el suelo en fenómenos como la quimiotaxis microbiana y la detoxificación de metales.

Algunos de los ácidos con capacidad solubilizadora de fosfatos secretados por las BSF incluyen al ácido oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicónico, fumárico, adípico, indolacético y 2-cetoglucónico. Por otro lado, las bacterias que solubilizan fosfato mediante la producción de ácidos orgánicos incluyen a los géneros *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Rhizobium*, *Streptosporangium* y *Yarrowia* (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010).

Solubilización de azufre

El azufre es el cuarto elemento más importante para el crecimiento de las plantas después del nitrógeno, fósforo y potasio. La importancia del azufre es igual a la del nitrógeno en términos de síntesis de proteínas, mientras que en términos de asimilación por los cultivos es mayor a la del fósforo (Vidyalakshmi y Sridar, 2007). La fuente original de azufre en la tierra se encontraba en rocas ígneas, principalmente como piritita ígnea (FeS_2). Desde entonces la cantidad de azufre en el ambiente ha incrementado a través de la actividad volcánica y la intemperización de la corteza en una atmósfera oxigenada (Hoffman *et al.*, 1998). Las fuentes actuales de azufre provienen de la intemperización de los minerales del suelo, de la atmósfera y del azufre ya fijado en la biomasa de los organismos.

Los procesos esenciales del ciclo del azufre en la naturaleza son (Fig. 1):

- 1) *Mineralización de azufre orgánico a la forma inorgánica, sulfuro de hidrógeno (H_2S).*
- 2) *Oxidación del sulfuro de hidrógeno y azufre elemental y compuestos relacionados con el sulfato (SO_4^{-2}).*
- 3) *Reducción del sulfato a sulfuro.*
- 4) *Inmovilización microbiana de los compuestos de sulfuro y subsecuente incorporación en compuestos orgánicos de azufre.*

La transferencia de azufre entre las fuentes orgánica e inorgánica dentro del ciclo del azufre es causada enteramente por la actividad de la biota del suelo, particularmente por la biomasa microbiana, la cual posee el potencial más grande para la mineralización y la subsecuente transformación del estado de oxidación del azufre.

El sulfato es la principal forma de azufre asimilada por las plantas, por lo que se requiere que este elemento sea convertido en esta sal para que los cultivos lo puedan asimilar (Mahendra, 1988). La oxidación del azufre que conlleva a la formación de sulfato es el proceso más importante del ciclo del azufre que incrementa la fertilidad del suelo. Adicionalmente, la acidificación del suelo resultante de este proceso de oxidación ayuda a solubilizar los nutrientes y mejorar la fertilidad de los suelos con problemas de alcalinidad (Wainwright, 1984). Los compuestos de azufre inorgánico reducido son oxidados exclusivamente por procariotes, si bien existen algunos hongos capaces de oxidar azufre elemental y tiosulfato tales como *Alternaria tenuis*, *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum nigrum*, *Scolecobasidium constrictum*, *Myrothecium cinctum*, *Aspergillus* y una serie de especies del género *Penicillium* (Vidyalakshmi *et al.*, 2009). Por otro lado, la oxidación de azufre en miembros del género *Eukarya* es llevada a cabo por endosimbiontes bacteriales litoautotróficos (Nelson y Fisher, 1995).

Los procariotes poseen la capacidad de oxidar sulfuro de hidrógeno, azufre, sulfito, tiosulfato y varios politionatos bajo condiciones alcalinas, neutras o ácidas (Harrison, 1984; Sorokin *et al.*, 2001). Los procariotes aeróbicos oxidantes de azufre pertenecen a los géneros *Acidianus*, *Acidithiobacillus*, *Aquaspirillum*, *Aquifex*, *Bacillus*, *Beggiatoa*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Starkeya*, *Sulfolobus*, *Thermithiobacillus*, *Thiobacillus* y *Xanthobacter* y son principalmente mesofílicos. Las bacterias fotoautotróficas anaeróbicas oxidantes de azufre son principalmente neutrofilicas y mesofílicas y pertenecen a géneros tales como *Allochromatium* (anteriormente *Chromatium*), *Chlorobium*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodovulum* y *Thiocapsa* (Friedrich *et al.*, 2001).

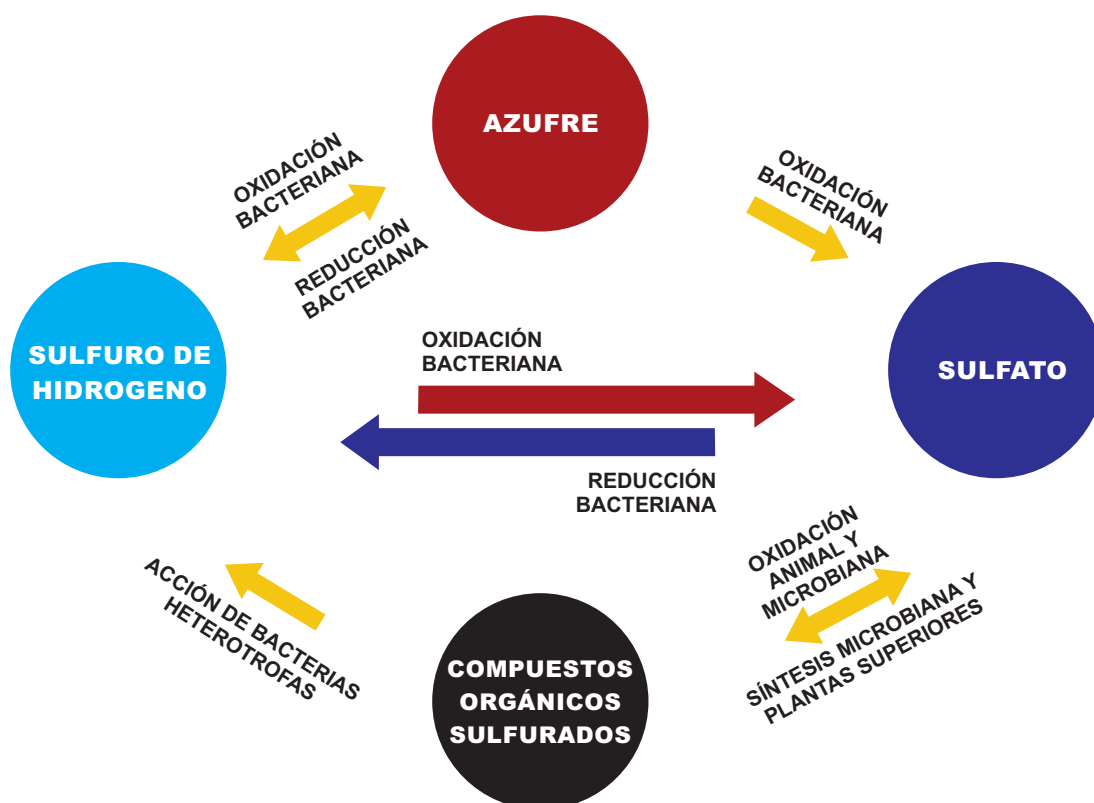


Figura 1. Participación de los microorganismos en el ciclo del azufre.

Los microorganismos oxidantes del azufre son primordialmente bacterias Gram negativas de los géneros *Thiobacillus*, *Thiomicrospira* y *Thiosphaera*, aunque algunas bacterias heterótrofas como *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas* también pueden exhibir crecimiento quimiolitotrófico en compuestos de azufre inorgánico (Vidyalakshmi *et al.*, 2009).

Producción de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles conforman un grupo de compuestos que se evaporan rápidamente a temperatura y presión normales. Algunas cepas de rizobacterias pertenecientes a *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Enterobacter cloacae* promueven el crecimiento de las plantas liberando compuestos volátiles (Ryu *et al.*, 2003). La promoción de crecimiento por compuestos volátiles es uno de los mecanismos más recientemente estudiados. La acetoína (3-hidroxi-2 butanona) y el 2,3 butanodiol son compuestos volátiles producidos

por *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* que promueven el crecimiento *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*. Algunos de estos compuestos actúan regulando la síntesis de auxinas y expansión celular (Zhang *et al.*, 2007), aunque también se ha propuesto un papel en la inducción de resistencia sistémica (Farag *et al.*, 2006) y antibiosis (Mitchell *et al.*, 2010). Ciertamente esta área del conocimiento requiere más investigación a fin de identificar nuevos compuestos y dilucidar nuevas vías de señalización involucradas en las interacciones de las plantas con los microorganismos promotores de crecimiento. Por ejemplo, dos nuevos compuestos volátiles, el ácido 2-metil propanoico y el 3-metil butanol, que se sintetizan de *novo* durante la interacción de *Arabidopsis thaliana* con las bacterias *Bacillus megaterium* y *Stenotrophomonas maltophilia* han sido recientemente identificados (Kai *et al.*, 2007; García-Juárez *et al.*, 2010).

Por otro lado, en hongos de biocontrol como *Trichoderma* spp., se ha encontrado que algunos compuestos volátiles como acetona, 2-metil-1-butanol, heptanal y octanal ayudan a incrementar su actividad antagónica inhibiendo la síntesis de proteínas de otros hongos (Humphris *et al.*, 2001).

Mecanismos indirectos

La promoción indirecta del crecimiento de plantas ocurre cuando los biofertilizantes previenen, disminuyen o eliminan uno o más organismos fitopatógenos a través de su control biológico (Hernández y Charlloux, 2001; Glick *et al.*, 1999) a través de los siguientes mecanismos:

Competencia por espacio y nutrientes

Para poder ejercer su efecto benéfico sobre las plantas los microorganismos promotores de crecimiento deben ser rizósfera-competentes, *i.e.*, deben ser capaces de competir con otros microorganismos presentes en la rizósfera por los nutrientes secretados por la raíz y por los espacios físicos disponibles en la raíz. Solamente una pequeña parte de la superficie radical está cubierta por bacterias. Los sitios predilectos para el crecimiento bacteriano son las uniones de entre las células epidérmicas y los puntos del origen de las raíces laterales.

Una vez que los microorganismos del suelo colonizan las raíces de las plantas ocupan espacios y consumen nutrientes que de otra manera podrían ser aprovechados por agentes fitopatógenos (Kloepper *et al.*, 1988; O'Sullivan y O'Gara, 1992).

Producción de sideróforos

La producción de sideróforos constituye un mecanismo dual de promoción de crecimiento vegetal, ya que además de aumentar la disponibilidad de hierro a las plantas, coadyuva en el control biológico de agentes fitopatógenos. Al secuestrar el hierro del suelo y hacerlo aprovechable para sí mismos y para las células vegetales que son capaces de asimilar el complejo bacteriano sideróforo-hierro, los microorganismos estimuladores de crecimiento limitan de este modo la cantidad disponible de este elemento en el suelo para otros microorganismos (Castignetti y Smarrelli, 1986; O'Sullivan y O'Gara, 1992; Dowling *et al.*, 1996).

Síntesis de antibióticos

La síntesis de antibióticos ha sido referida en diversos microorganismos promotores del crecimiento vegetal (O'Sullivan y O'Gara 1992; Haansuu *et al.*, 1999) y es el mecanismo más comúnmente asociado con la capacidad de un biofertilizante para inhibir fitopatógenos (Keel *et al.*, 1992; Chet y Inbar, 1994; Whipps, 1997). La habilidad de algunas bacterias de suprimir hongos patógenos depende de su habilidad de producir antibióticos como pioluteorina, pirronitrina, ácido fenacin-1-carboxílico y 2,4-diacetilfloroglucinol (Picard, 2000). Otros compuestos liberados por las bacterias a través de los cuales son capaces de inhibir el crecimiento de fitopatógenos es la producción de cianuro de hidrógeno (HCN) y/o enzimas líticas, que incluyen quitinasa, β -1,3 glucanasa, proteasas y lipasas (Friedlender *et al.*, 1993; Chet y Inbar, 1994). Aún y cuando las actividades pectinolíticas se asocian comúnmente con bacterias patogénicas, algunas especies de bacterias no patogénicas como *Rhizobium* (Angle, 1986), *Azospirillum* (Umali-Garcia *et al.*, 1980; Tien *et al.*, 1981), *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia* (Chatterjee *et al.*, 1978) y *Frankia*

(Séguin y Lalonde, 1989) son también capaces de degradar pectinas. En términos generales las enzimas pectinolíticas juegan un papel fundamental en la invasión de las raíces por las bacterias.

Inducción de resistencia a patógenos

La investigación sobre los beneficios de los inoculantes microbianos se extiende más allá de sus capacidades para mejorar la nutrición vegetal, ya que los inoculantes microbianos pueden ser inductores de los procesos de resistencia sistémica adquirida (RSA o SAR, por sus siglas en inglés) de las plantas a diferentes agentes fitopatógenos como *Blumeria graminis*, *Gaeumannomyces graminis*, *Pseudomonas syringae* y *Fusarium culmorum* (Heitefuss, 2001; Waller *et al.*, 2005; Khaosaad *et al.*, 2007; Ramos-Solano *et al.*, 2008). En las plantas, la RSA es una respuesta de resistencia globalizada de la planta que ocurre después de que una planta es expuesta al contacto con un patógeno o un producto derivado de éste. En un sentido amplio, la resistencia sistémica adquirida de las plantas es equivalente a las respuestas del sistema inmune de los animales al ataque de patógenos. Después de una exposición temprana y localizada a ciertos organismos infecciosos, la RSA activa los mecanismos de resistencia a nivel de planta completa contra una amplia variedad de patógenos, además de aquellos que la indujeron, razón por la cual se le refiere como una respuesta de amplio espectro. Se ha demostrado que la colonización endofítica de plántulas de cacao por *Trichoderma* activa las cascadas de señalización de defensa vegetales (Bailey *et al.*, 2006). La RSA se asocia con la inducción de una gran variedad de genes (genes PR's o relacionados con la patogénesis) y requiere la acumulación de ácido salicílico endógeno. A fin de potenciar la RSA de las plantas, la formulación de los biofertilizantes ha considerado la inclusión de productos tales como quitina o quitosán (o quitosano). Este último compuesto es obtenido a partir de algunas fuentes como el exosqueleto de crustáceos (camarón, cangrejo, entre otros). Un método común para la síntesis de quitosán es mediante la desacetilación de la quitina usando hidróxido de sodio. El quitosano es usado además en distintas aplicaciones biomédicas (por ejemplo, para eficientizar el transporte de drogas polares a través de las superficies epiteliales) y existen presentaciones purificadas para estos fines.

Clasificación de los biofertilizantes

Los biofertilizantes pueden ser clasificados de acuerdo al mecanismo(s) empleado por la bacteria para promover el crecimiento de las plantas (fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos o desintegradores de materia orgánica) o bien conforme al tipo de microorganismos empleados en su formulación, bacterias, hongos o una combinación de ambos (Fig. 2). En el Cuadro 1 se citan algunos de los microorganismos más comúnmente empleados como biofertilizantes y su(s) modo(s) de acción.

Inoculantes bacterianos

Las rizobacterias más comúnmente aplicadas como inoculantes en la agricultura incluyen a las bacterias fijadoras de nitrógeno (diazotróficas) y las bacterias solubilizadoras de fosfatos.

Los organismos diazotróficos emplean el complejo enzimático de la nitrogenasa para convertir nitrógeno atmosférico en amonio, un compuesto asimilable por las plantas y pueden ser de vida libre (*Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* y las cianobacterias *Anabaena* y *Nostoc*) o pueden formar simbiosis estrictas como en los casos de *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Krotzky y Werner, 1987; Cavalcante y Döbereiner, 1988; Bloemberg y Lugtenberg, 2001; Maunuksela, 2001).

Las rizobacterias más comúnmente empleadas en la agricultura están estrechamente relacionadas al género *Rhizobium*. Las bacterias del género *Rhizobium* son fijadoras de nitrógeno y establecen relaciones mutualistas dentro de los nódulos de las raíces de las leguminosas.

En el caso de especies no leguminosas las bacterias del género *Azospirillum* han demostrado ampliamente su capacidad para incrementar la fijación de nitrógeno atmosférico (Bashan y Holguin, 1997).

Para mejorar la nutrición de fósforo, el uso de bacterias solubilizadoras de

fosfatos (BSF) como *Agrobacterium radiobacter* y diversas especies de *Pseudomonas*, e.g. *Pseudomonas lutea*, han demostrado su gran potencial como biofertilizantes (Singh y Kapoor, 1999; Peix *et al.*, 2004). Como su nombre lo indica, las bacterias solubilizadoras de fosfatos son bacterias (de vida libre) que convierten fosfatos inorgánicos del suelo en formas más asimilables para las plantas.

Estos microorganismos crecen en medios con fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares como única fuente de fosfato y no sólo asimilan el elemento sino que solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales, de modo tal que aumentan la disponibilidad de este elemento para las plantas.

Aunque el principal mecanismo por el cual los compuestos fosfatados del suelo son movilizados hacia la planta es mediado a través de la liberación de ácidos orgánicos que reducen el pH (Alexander, 1980), se han descrito otros modos de acción probables que incluyen la exclusión de protones hacia fuera de la célula y su intercambio con cationes unidos al fósforo o la producción de ácidos inorgánicos como el ácido sulfhídrico, el ácido nítrico o el ácido carbónico (Rodríguez y Fraga, 1999)

En adición a su efecto benéfico sobre la asimilación de nutrientes, algunas bacterias promotoras de crecimiento pueden funcionar además como agentes de biocontrol eficientes contra diversos organismos patogénicos. Por ejemplo, además de su reconocida capacidad de producción de sideróforos, *Pseudomonas fluorescens* sintetiza un potente antibiótico llamado 2,4-diacetilfloroglucinol que contribuye a mejorar su actividad antagónica contra el agente causal de la pudrición blanda de la papa, *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* (Cronin *et al.*, 1997).

Las actinobacterias, organismos clasificados previamente como hongos actinomicetos, constituyen otro grupo de organismos incluido dentro de los inoculantes bacterianos. Este grupo de bacterias filamentosas, Gram positivas incluyen algunos géneros con actividad de promoción de crecimiento como

Actinomyces, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Streptomyces*, entre otros (Lippi *et al.*, 1992; Axelrood *et al.*, 1996; El-Mehalawy *et al.*, 2004; Giri y Pati, 2004; Arkhipchenko *et al.*, 2005; Martínez-Salgado *et al.*, 2007).

Adicionalmente a la bien reconocida capacidad de fijación biológica de nitrógeno de algunas actinobacterias del género *Frankia* en asociación con plantas actinorrizales (la mayoría, plantas leñosas o semileñosas pertenecientes a los órdenes Fagales, Cucurbitales y Rosales de las angiospermas), las principales actividades de promoción de crecimiento de estos organismos se relacionan con propiedades antagónicas contra diversos organismos fitopatógenos (Broadbent *et al.*, 1971; Crawford *et al.*, 1993; Coombs *et al.*, 2004).

Debido a su capacidad para degradar celulosa y solubilizar lignina, estas bacterias también constituyen importantes agentes de descomposición de lignocelulosa en el suelo (Ball *et al.*, 1990; Tuomela *et al.*, 2000) y un importante agente para la elaboración de compostas.

Finalmente, dentro de los inoculantes bacterianos encontramos a las cianobacterias, también conocidas como algas o bacterias verde-azules o cianofitas, que establecen relaciones mutualistas con hongos, hepáticas, helechos acuáticos y cícadras. Las cianobacterias, tanto de vida libre como simbióticas, constituyen un importante componente de los sistemas agrícolas de producción de arroz (Subba-Rao, 2002).

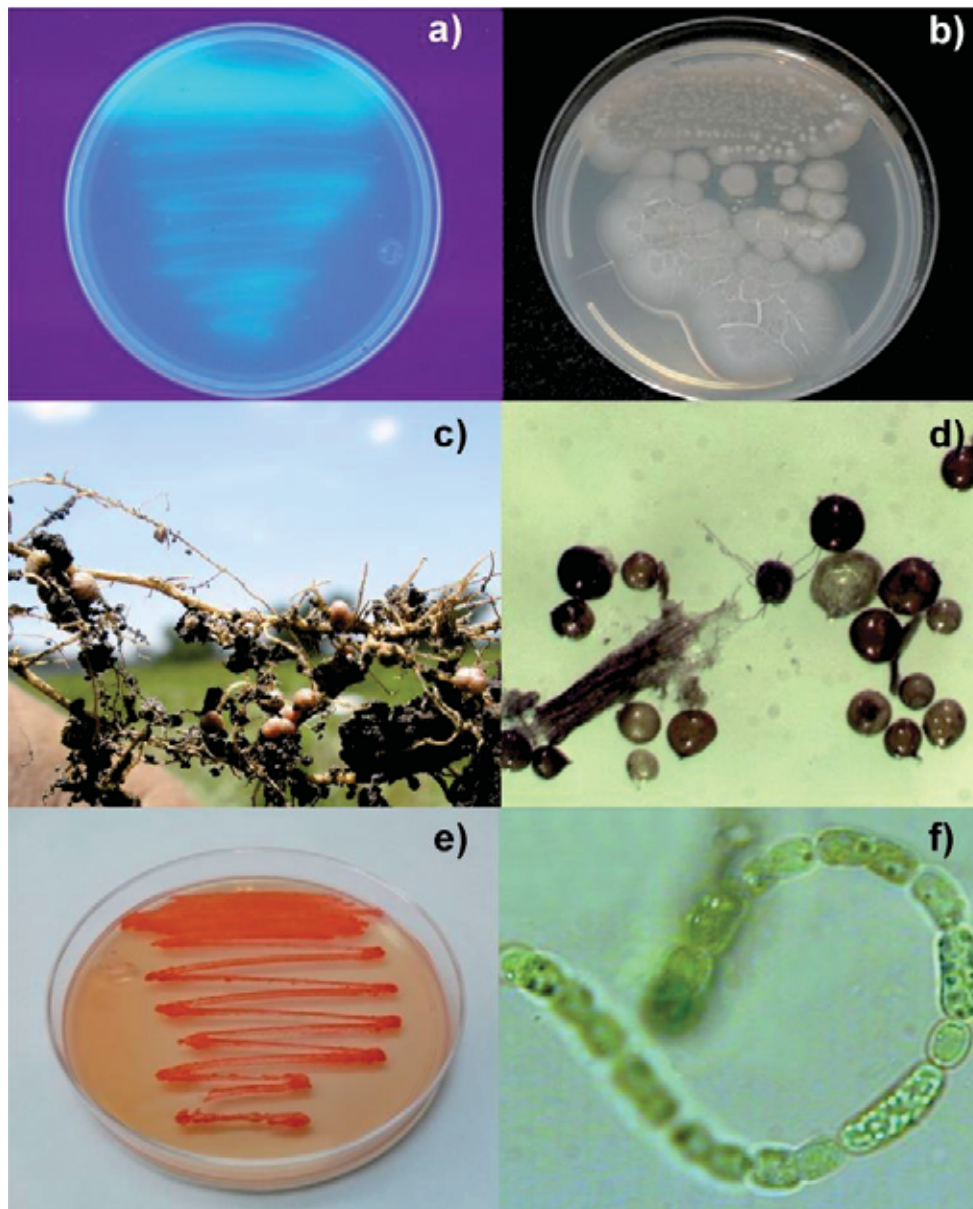


Figura 2. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal. a) *Bacillus subtilis* cultivado en medio YPG, b) Emisión de fluorescencia por *Pseudomonas fluorescens* al colocarla bajo luz ultravioleta, c) Nódulos radicales formados en la simbiosis *Rhizobium*-Frijol, d) Esporas del hongo micorrícico arbuscular *Glomus* spp., utilizado extensivamente en la formulación de biofertilizantes, e) Crecimiento de *Azospirillum brasilense* en medio Rojo-Congo y f) *Anabaena* sp., una cianobacteria fotosintética que establece simbiosis con helechos acuáticos del género *Azolla*.

Particularmente, la asociación de la cianobacteria *Anabaena azollae* con el helecho acuático *Azolla* spp. es muy importante en la producción de arroz. Este helecho posee cavidades en sus hojas donde *A. azollae* se reproduce y fija el nitrógeno atmosférico requerido para satisfacer sus propias necesidades y las de la planta hospedera. Aunque parte de este nitrógeno fijado es también aprovechado por el arroz, el mayor aporte de nitrógeno por parte de este helecho a este cultivo proviene de su aprovechamiento como abono verde al incorporarlo al suelo durante la preparación de los terrenos para la siembra del arroz.

Inoculantes fúngicos

Los hongos que se han investigado más intensivamente como inoculantes fúngicos por sus beneficios en la nutrición de las plantas son las micorrizas.

En función de la intimidad de la relación entre la planta y los hongos, las micorrizas se dividen en ectomicorrizas y endomicorrizas. Las hifas de las primeras no penetran células individuales de las raíces de las plantas, mientras que en los hongos tipo AM las hifas penetran la pared celular y el interior de las células corticales sin llegar a colonizar el endodermo, dando origen a una invaginación de la membrana celular. Las hifas de las micorrizas arbusculares se extienden ampliamente en el suelo y funcionan como una extensión de las raíces incrementando la capacidad de absorción de agua y nutrientes del suelo por las plantas. Las endomicorrizas no son detectadas visiblemente y forman una red externa de hifas menos profusa que la encontrada en las ectomicorrizas. Las endomicorrizas conforman el grupo de micorrizas más difundido en el planeta y está dividido en varios subtipos, de los cuales el más representativo e importante es el arbuscular (Espinosa-Victoria, 2000).

Prácticamente todas las plantas forman asociaciones simbióticas con las micorrizas, si bien existen cuatro familias de plantas que usualmente no lo hacen (Peters, 2002): Amaranthaceae (familia del amaranto), Brassicaceae (familia de la coliflor y del brócoli), Chenopodiaceae (familia del betabel y de la espinaca) y Zygophyllaceae (familia de la gobernadora y del palo santo o guayacán).

Cuadro 1. Microorganismos con actividad promotora de crecimiento y algunos de sus mecanismos de acción.

Grupo y especie	Mecanismo(s)	Fuente
Actinobacterias		
<i>Micrococcus</i> sp.	Solubilización de fosfatos	Nahas (1996) Martínez-Salgado <i>et al.</i> (2007)
<i>Frankia</i> sp.	Fijación biológica de nitrógeno y control de patógenos	Lippi <i>et al.</i> (1992) Arkhipchenko <i>et al.</i> (2005) Crawford <i>et al.</i> (1993) Coombs <i>et al.</i> (2004)
Bacteroidetes		
<i>Flavobacterium</i> sp.	Solubilización de fosfatos y fijación biológica de nitrógeno	Nahas (1996), Giri y Pati (2004)
Proteobacterias		
<i>Achromobacter</i> sp.	Solubilización de fosfatos	Nahas (1996)
<i>Azospirillum</i> sp.	Fijación biológica de nitrógeno	Krotzky y Werner (1987), Bashan y Holguin (1997)
<i>Azotobacter vinlandii</i>	Fijación biológica de nitrógeno	Dixon y Kahn (2004)
<i>Burkholderia</i> sp.	Solubilización de fosfatos y bioremediación de suelos	Nahas (1996), Lucy <i>et al.</i> (2004), Abdul (2006)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Fijación biológica de nitrógeno	Boddey <i>et al.</i> (1991)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Control patógenos y fijación biológica de nitrógeno	Chatterjee <i>et al.</i> (1978) Riggs <i>et al.</i> (2001)

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Solubilización de fosfatos, producción de sideróforos y control de patógenos	Nahas (1996), Cronin <i>et al.</i> (1997)
<i>Rhizobium</i> sp.	Fijación biológica de nitrógeno y control de patógenos	Angle (1986), Bashan y Holguin (1997), Bashan (1998), Yanni <i>et al.</i> (2001)
Cianobacterias		
<i>Nostoc</i> sp.	Fijación biológica de nitrógeno	Krotzky y Werner (1987), Maunuksela (2001)
<i>Anabaena</i> sp.	Fijación biológica de nitrógeno	Krotzky y Werner (1987), Maunuksela (2001)
Firmicutes		
<i>Bacillus megaterium</i>	Solubilización de fosfatos	Bashan (1998)
<i>Bacillus subtilis</i>	Producción de sideróforos	Madigan y Martinko (2005)
Glomerycota		
Hongos arbusculares como <i>Glomus</i> sp, <i>Gigaspora</i> sp. y <i>Scutellospora</i> sp.	Aumento en la absorción de agua, fósforo y minerales traza	Abbott y Robson (1984), Bethlenfalvai (1993)
Ascomycota		
<i>Aspergillus niger</i>	Solubilización de fosfatos y control de patógenos	Tarafdar y Claassen (1988), Khan y Anwer (2007)
<i>Penicillium bilaii</i>	Solubilización de fosfatos	Vessey y Heisinger (2001), Leggett <i>et al.</i> (2002)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Control de patógenos	Harman (2006)

Algunos de los beneficios de las micorrizas en las plantas incluyen un aumento en la absorción de agua, fósforo y minerales traza (especialmente cuando estos nutrientes se encuentran en formas moderadamente solubles en el suelo; Abbott y Robson, 1984), control de patógenos del suelo (Whipps, 2001) y estabilización de la estructura del suelo mediante un incremento en su agregación (Miller y Jastrow, 2000).

Otros mecanismos de acción de las micorrizas se relacionan con la inducción de resistencia sistémica y la alteración de la morfología de las raíces.

Estudios como los de Nicolotti y Egli (1998) demuestran, por otro lado, el potencial de estos hongos para la bioremediación de suelos contaminados a través de diversos mecanismos como la producción de la glicoproteína denominada glomalina (Abdul, 2006).

Ectomicorrizas

Estas asociaciones simbióticas típicamente se forman entre las raíces de plantas leñosas y hongos pertenecientes a los Phyla Basidiomycota, Ascomycota y Zygomycota.

Las ectomicorrizas colonizan aproximadamente un 10% de las familias de plantas que incluyen pinos, abedules, eucaliptos, encinos y hayas, entre otros. Las ectomicorrizas se pueden visualizar macroscópicamente pues el hongo rodea a la raíz y forma una capa o manto fúngico. A partir de esta estructura, las hifas se introducen entre las células de la corteza, sin llegar a penetrarlas y forman de esta manera la red de 'Harting', ocasionando diversos cambios anatómicos. En algunos casos las hifas penetran las células vegetales y forman una ectendomicorriza. Por fuera de las raíces el micelio del hongo forma una extensa trama dentro del suelo y material vegetal en descomposición que ayuda a estabilizar el suelo y ampliar el acceso de las plantas a fuentes de agua y nutrientes que de otra manera serían inaccesibles a las plantas. De este modo, las ectendomicorrizas forman un manto externo, al igual que las ectomicorrizas, pero también penetran en el interior de las células, como las endomicorrizas, y no forman vesículas o arbusculos.

Es importante mencionar que si bien algunos microorganismos tales como las ectomicorrizas y del género *Frankia* se asocian comúnmente con especies forestales, también algunas bacterias promotoras del crecimiento vegetal ejercen un efecto significativo sobre el crecimiento de estas plantas (Shishido *et al.*, 1999; Elo *et al.*, 2000).

Endomicorrizas

Las endomicorrizas conforman un grupo muy variable de hongos que se clasifican en arbusculares, ericoides, arbutoides, monotropoides y orquidioides (Peterson *et al.*, 2004).

Las asociaciones de micorrizas arbusculares o AM (previamente conocidas como vesículo-arbusculares o VAM) son formadas únicamente por hongos pertenecientes al *Phylum* Glomeromycota. Las hifas de las micorrizas arbusculares penetran en las células de las raíces produciendo estructuras ovales (vesículas) o invaginaciones conocidas como arbuscúlos que se ramifican dicotómicamente dentro de la célula para aumentar la superficie de interacción del hongo con la planta hospedera.

Debido a que colonizan casi 2/3 de las plantas terrestres y se encuentran en casi todos los ecosistemas del mundo, las micorrizas arbusculares constituyen el grupo de hongos simbióticos más importante desde un punto de vista agrícola y ecológico. Actualmente son el grupo de hongos más empleado en la formulación de biofertilizantes y son fuertes candidatos para el biocontrol de fitopatógenos a través de sus capacidades competitivas por los espacios disponibles en las raíces. El funcionamiento de estos hongos se ve afectado en suelos con altos contenidos de fósforo (Weissenhorn *et al.*, 1995; Linderman y Davis, 2004; Arnold y Kapustka, 1987) o metales pesados (Leyval *et al.*, 1997), por lo que se recomienda utilizar dosis bajas de fertilizantes fosfatados al utilizar hongos AM en el campo.

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares son simbioses obligados que deben multiplicarse necesariamente en asociación con las raíces de una planta hospedera. Todas las estructuras propias de los hongos AM son

fuentes de inóculo potenciales, aunque en la práctica sólo tres tipos de inóculo han demostrado ser efectivos: las esporas, las raíces de plantas infectadas y las hifas de los hongos.

Las fuentes de inóculo original de las micorrizas provienen del conjunto de hongos que están asociados a las raíces o que se encuentran en la rizósfera de las plantas, ya sea en ecosistemas y agroecosistemas. Debido a su simbiosis obligada, la producción masiva de estos microorganismos requiere que los hongos sean cultivados en asociación con las plantas en contenedores con sustratos estériles y bajo condiciones controladas de riego y nutrición. El principal acarreador que se ha empleado para la multiplicación de los hongos es comúnmente suelo estéril. El biofertilizante ya formulado consiste básicamente en suelo impregnado con propágulos de una especie o ecotipo determinado de hongo (esporas, micelio, raíces con vesículas y arbusculos) y se caracteriza por su alto grado de infectividad y fácil manipulación, lo que le confiere un considerable interés de aplicabilidad, particularmente en aplicaciones masivas. Comúnmente, la calidad de un biofertilizante micorrícico se determina por su contenido de esporas, las cuales también sirven para realizar estudios taxonómicos de los hongos. Para realizar el aislamiento de las esporas se emplea la técnica de Gerdemann y Nicolson (1963).

Si bien los hongos micorrícicos son comúnmente producidos en invernaderos especiales, existe la posibilidad de multiplicar estos microorganismos en laboratorio bajo condiciones estériles. Este método fue desarrollado por Mosse y Hepper en 1975 y consiste en usar raíces transformadas con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* (conocidas como "hairy roots" o raíces peludas), las cuales al poder ser propagadas de manera indefinida en contenedores estériles son consideradas "inmortales". Las raíces peludas son infectadas con esporas estériles de hongos AM para el establecimiento de cultivos monoaxénicos que típicamente pueden producir más de 5000 esporas y micelio en una caja de Petri de 9 cm de diámetro (Becard y Fortin 1988; Diop *et al.*, 1992).

Otros hongos empleados en la formulación de biofertilizantes

Uno de los hongos más utilizados en la formulación de biofertilizantes es *Trichoderma* sp. La fase sexual (o teleomorfo) de este hongo se ubica en el género *Hypocrea* spp. del *Phylum* Ascomycota de los hongos. Este hongo filamentoso está ampliamente distribuido en casi todos los tipos de suelos, habitando sobre material vegetal en descomposición y comúnmente es el hongo cultivable encontrado más frecuentemente en el suelo.

Aunque el género es básicamente saprofítico, existen también algunas cepas de *Trichoderma* que son endofíticas y colonizan los sistemas vasculares de ciertas plantas (Harman, 2006). Algunas especies de este hongo son productoras eficientes de muchas enzimas extracelulares, por lo que son muy empleadas por ejemplo en la industria alimentaria y textil para la producción comercial de celulasas y otras enzimas que degradan polisacáridos complejos.

Entre las especies de este hongo utilizadas en el sector industrial destacan *Trichoderma reesii*, *T. longibratum* y *T. harzianum*, las cuales son empleadas para la obtención de celulasas y hemicelulasas (Harman *et al.*, 2004), xilanasas (Azin *et al.*, 2007) y quitinasas (Felse y Panda, 1999), respectivamente. Las celulasas y hemicelulasas producidas por estos hongos se emplean, por ejemplo, para proporcionar el acabado de desgaste de las prendas de mezclilla, mientras que en la industria avícola se usan para incrementar la digestibilidad de la cebada y otros cultivos.

Se han aislado diferentes cepas de *Trichoderma* como agentes de biocontrol contra diversas enfermedades de las plantas que incluyen aquellas causadas por hongos (*Rhizoctonia* sp., *Botrytis* sp. y *Fusarium* sp.), oomycetos, bacterias y un virus (Harman *et al.*, 2004). Los mecanismos de control de *Trichoderma* incluyen antibiosis, parasitismo, inducción de resistencia en las plantas hospederas y competencia por espacio. La mayoría de las cepas utilizadas para el control de patógenos provienen de las especies de *T. harzianum* y *T. hamatum*, y pueden funcionar tanto para el control de enfermedades foliares como de raíz.

Existe, por otro lado, una cepa dañina de este hongo (*Trichoderma aggressivum*, identificada previamente como *T. harzianum* biotipo 4) que representa un grave problema en la producción comercial de champiñones (Samuels *et al.*, 2002).

Además de su bien documentada capacidad para control de una amplia variedad de fitopatógenos, investigaciones más recientes han demostrado que *Trichoderma* posee diversos mecanismos para promover el crecimiento de las plantas (Harman, 2006), entre los que sobresalen:

- Control de patógenos de raíz y hoja. Este control ocurre de manera indirecta a través de la activación de las respuestas de resistencia inducida, o directamente a través del ataque de las hifas de los hongos patogénicos por *Trichoderma*.
- Alteración de la composición de la microflora adyacente a las raíces.
- Mejoramiento del estatus nutricional de las plantas (especialmente nitrógeno).
- Aumento de la solubilización de nutrientes del suelo.
- Incremento del desarrollo radical.
- Incremento del número de pelos radicales.
- Favorecimiento de un enraizamiento más profundo.

Otros hongos con actividad promotora de crecimiento que han recibido cierta atención incluyen al hongo endofítico *Piriformis indica* (Waller *et al.*, 2005), y los ascomicetos *Penicillium bilaii*, *P. radicum* y *Aspergillus niger*, los cuales han demostrado influir positivamente en el crecimiento de las plantas a través de la solubilización de fosfatos (Whitelaw *et al.*, 1999; Vessey y Heisinger, 2001; Leggett *et al.*, 2002). Los hongos *Gliocladium virens* y *G. roseum* reconocidos principalmente como agentes de biocontrol, también poseen actividades de promoción de crecimiento en las plantas través de mecanismos no bien establecidos (Sivapalan *et al.*, 1994; De Silva *et al.*, 2000).

Finalmente es importante mencionar el empleo de ciertas cepas binucleadas de *Rhizoctonia* o variantes no patogénicas de *Fusarium*, para el

biocontrol de diversos hongos patogénicos a través de la inducción de los mecanismos de resistencia adquirida de las plantas (Benhamou *et al.*, 2002; Hwang y Benson, 2003).

Inoculantes compuestos

De acuerdo a evidencia aportada por experimentos de campo existe un sinergismo en la promoción del crecimiento de las plantas cuando se emplean dos o más microorganismos estimuladores. Sin embargo, la formulación de biofertilizantes compuestos que sean efectivos en campo requiere la realización de minuciosos estudios para conocer y entender los requerimientos nutricionales y ambientales de cada uno de los microorganismos a emplear en las formulaciones y los resultados de su interacción en términos fisiológicos y ecológicos para poder formular biofertilizantes que sean compatibles y sinérgicos en cuanto a sus efectos sobre las variables agrónomicamente importantes de los cultivos, en campo o invernadero.

Desde hace varios años el empleo de bacterias y hongos solubilizadores de fósforo ha sido una práctica agrícola común en Rusia que ha dado buenos resultados. Asimismo, se ha demostrado que la combinación de distintas cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento produce un efecto benéfico en arroz (Nguyen *et al.*, 2002) y en cebada (Belimov *et al.*, 1995).

También se ha demostrado que inoculantes de cepas múltiples fueron capaces de aumentar la actividad de la nitrogenasa total comparado con inoculantes simples, aún y cuando la formulación del inoculante dual incluía solamente una cepa diazotrófica (Lippi *et al.*, 1992; Khammas y Kaiser, 1992; Belimov *et al.*, 1995).

Debido a las capacidades mencionadas anteriormente de estos microorganismos, se esperaría que un inoculante dual basado en BSF y endomicorrizas ayude a aumentar la disponibilidad química del fósforo en el suelo y mejorar la absorción de este elemento por las plantas.

Asimismo se ha encontrado que la combinación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal y micorrizas arbusculares puede ser útil

para incrementar el crecimiento en trigo en suelos de baja fertilidad (Galal *et al.*, 2003). En esta misma conexión, se menciona que la co-inoculación de leguminosas con hongos arbusculares y *Rhizobium* resulta en un mejor crecimiento de las plantas que el que se obtiene utilizando cada uno de estos microorganismos por separado (Barea y Azcon-Aguilar, 1983; Bagyaraj, 1984)

En suelos salinos, Rabie y Almadini (2005) encontraron que la inoculación de *Azospirillum brasilense* en plantas de *Vicia faba* previamente infectadas con micorrizas arbusculares potenció los efectos benéficos de estos hongos. Aunque el principal beneficio de los inoculantes duales es incrementar la absorción de nutrientes provenientes de los fertilizantes y del propio suelo (Bashan *et al.*, 2004; Belimov *et al.*, 1995), otros sinergismos pueden ser el resultado, por ejemplo, de un aumento en la captación de nutrientes y el control de agentes fitopatógenos.

No obstante, los beneficios mencionados previamente en cuanto al empleo de biofertilizantes mixtos, duales o múltiples, es importante, como se mencionó previamente, realizar estudios a fin de determinar la compatibilidad de los microorganismos a aplicar ya que se han encontrado antagonismos entre algunos microorganismos promotores de crecimiento. Por ejemplo Meyer y Linderman (1986) encontraron una disminución en las poblaciones de pseudomonadas fluorescentes en la rizósfera de plantas micorrizadas de *Trifolium* en comparación con plantas no micorrizadas. En estudios similares, Paulitz y Linderman (1990) refieren una inhibición del crecimiento de *Pseudomonas putida* por hongos arbusculares en calabaza; además, la germinación de las esporas de este hongo se retrasó en presencia de pseudomonadas fluorescentes.

Bibliografía Citada

- Abbott, L. and Robson, A. 1984. The effect of VA mycorrhizae on plant growth. *In: VA Mycorrhizae*. Powell, C. and Bagyaraj, D. (eds). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Abdul, G.K. 2006. Mycorrhizoremediation-an enhanced form of phytoremediation. *J. Zhejiang Univ.* 7:503-514.
- Alexander, M. 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. *In: Introducción a la Microbiología del Suelo*. AGT editor, México.
- Ali, N.I., Siddiqui, I.A., Shahid J., Shaukat, S. and Zaki, M.J. 2002. Nematicidal activity of some strains of *Pseudomonas* spp. *Soil Biol. Biochem.* 34:1051-1058.
- Angle, J.S. 1986. Pectic and proteolytic enzymes produced by fast- and slow-growing soybean rhizobia. *Soil Biol. Biochem.* 18:115-116.
- Arkhipchenko, I.A., Salkinoja-Salonen, M.S., Karyakina, J.N. and Tsitko, I. 2005. Study of three fertilizers produced from farm waste. *Appl. Soil Ecol.* 30:126-132.
- Arnold, P.T. and Kapustka, L.A. 1987. VA mycorrhizal colonization and spore populations in an abandoned agricultural field after five years of sludge application. *Ohio J. Sci.* 87:112-114.
- Axelrood, P.E., Clarke, A.M., Radley, R. and Zemcov, S.J.V. 1996. Douglas-fir root associated microorganisms with inhibitory activity towards fungal plant pathogens and human bacterial pathogens. *Can. J. Microbiol.* 42:690-700.
- Azevedo, J.L., Maccheroni, J.eJr., Pereira, O. and Ara, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electr. J. Biotech.* 3:40-65.
- Azin, M., Moravej, R. and Zareh, D. 2007. Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. *Process Biochem.* 34:563-566.
- Bagyaraj, D.J. 1984. Biological interaction with VA mycorrhizal fungi. *In: VA Mycorrhizae*. Powell, C. and Bagyaraj, D. (eds). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Roberts, D.P., Thomas, S.E., Crozier, J., Samuel, G.J., Choi, I. and Holmes, K.A. 2006. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedling by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* 224:1449-1464.

- Ball, A.S., Godden, B., Helvenstein, P., Penninckx, M.J. and McCarthy, A.J. 1990. Lignocarbhydrate solubilization from straw by actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3017-3022.
- Barea, J.M. and Azcón-Aguilar, C. 1983. Mycorrhiza and their significance on nodulating nitrogen fixing plants. *Adv. Agron.* 36:1-54.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16:729-770.
- Bashan, Y. and Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43:103-121.
- Bashan, Y., Holguin, G. and de-Bashan, L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50:521-577.
- Becard, G. and Fortin, J.A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhizal formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108:211-218.
- Belimov, A.A., Kojemiakov, A.P. and Chuvarliyeva, C.V. 1995. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilising bacteria. *Plant Soil* 173:29-37.
- Benhamou, N., Garand, C. and Goulet, A. 2002. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4044-4060.
- Bethlenfalvay, G.J. 1993. The mycorrhizal plant-soil system in sustainable agriculture. *In: Agroecología, Sostenibilidad y Educación.* Ferrera-Cerrato, R. y Quintero, L.R. (eds). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:343-350.
- Boddey, R.M., Urquiaga, S., Reis, V. and Döbereiner, J. 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant Soil* 137:111-117.
- Broadbent, P., Baker, K.F. and Waterworth, Y. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Aust. J. Biol. Sci.* 24:925-944.
- Brown, M.E. 1974. Seed and root bacterization. *Ann. Rev. Phytopathol.* 12:181-197.

- Bulen, W.A. and LeComte, J.R. 1966. The nitrogenase system from *Azotobacter*: Two-enzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution, and ATP hydrolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56:979-986.
- Castignetti, D. and Smarrelli, J. Jr. 1986. Siderophores, the iron nutrition of plants, and nitrate reductase. FEBS Lett. 209:147-151.
- Cavalcante, V. and Döbereiner, J. 1988. A new-acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. Plant Soil 108:23-31.
- Chatterjee, A.K., Buchanan, G.E., Behrens, M.K. and Starr, M.P. 1978. Synthesis and excretion of polygalacturonic and transeliminase in *Erwinia*, *Yersinia*, and *Klebsiella* species. Can. J. Microbiol. 25:94-102.
- Chet, I. and Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. Appl. Biochem. Biotechnol. 47:37-43.
- Coombs, J.T., Michelsen, P.P. and Franco, C.M.M. 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. Biol. Control 29:359-366.
- Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M. and Ousley, M.A. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. Appl. Environ. Microbiol. 59:3899-3905.
- Cronin, D., Moënne-Loccoz, Y., Fenton, A., Dunne, C., Dowling, D.N. and O'Gara, F. 1997. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. FEMS Microbiol. Ecol. 23:95-106.
- De Silva, A., Patterson, K., Rothrock, C. and Moore, J. 2000. Growth promotion of highbush blueberry by fungal and bacterial inoculants. Hortscience 35:1228-1230.
- Dibut, A.B. y Martínez, VR. 2004. Biofertilizantes y Bioestimuladores. Métodos de inoculación. In: Manual sobre Agricultura Orgánica Sostenible. FAO.
- Diop, T.A., Becard, G. and Piche, Y. 1992. Long term *in vitro* culture of an endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri-T-DNA transformed root of carrot. Symbiosis 12:249-259.
- Dixon, R. and Kahn, D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. Nat. Rev. Microbiol. 2:621-31.
- Dowling, D.N., Sexton, R., Fenton, A., Delany, I., Fedi, S., McHugh, B., Callanan, M., Moënne-Loccoz, Y. and O'Gara, F. 1996. Iron regulation in

- plant associated *Pseudomonas fluorescens* M114: implications for biological control. *In: Molecular Biology of Pseudomonads*. Nakazawa, T., Furukawa, K., Haas, D. and Silver, S. (eds). American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
- El-Mehalawy, A.E., Naziha, H.M., Hend, K.M., El-Zahraa, K.A. and Youssef, Y.A. 2004. Influence of maize root colonization by the rhizosphere actinomycetes and yeast fungi on plant growth and on the biological control of late wilt disease. *Int. J. Agric. Biol.* 6:599-605.
- Elo, S., Maunuksela, L., Salkinoja-Salonen, M., Smolander, A. and Haahtela, K. 2000. Humus bacteria of Norway spruce stands: plant growth promoting properties and birch, red fescue and alder colonizing capacity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:143-152.
- Esipov, S.E., Adanin, V.M., Baskunov, B.P., Kiprianova, E.A. and Garagulia, A.D. 1975. New antibioticly active fluoroglucide from *Pseudomonas aurantiaca*. *Antibiotiki* 20:1077-1081.
- Espinosa-Victoria, D. 2000. Diálogo molecular: hongo micorrízico arbuscular-raíz. *In: Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular*. Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. (eds). Mundi Prensa, Montecillo, México.
- Farag, M., Ryu, C., Summer, L. and Paré, P. 2006. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry* 67:2262-2268.
- Felker, P., Medina, D., Soulier, C., Belice, G., Velarde, M. and Gonzalez, C. 2005. A survey of environmental and biological factors (*Azospirillum* spp., *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas aurantiaca*) for their influence in rooting cuttings of *Prosopis alba* clones. *J. Arid Environ.* 61:227-247.
- Felse, P.A. and Panda, T. 1999. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: optimization of culture condition by Taguchi method. *Enz. Microb. Technol.* 40:801-805.
- Friedlender, M., Inbar, J. and Chet, I. 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* 25:1211-1221.
- Friedrich, C.G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A. and Fischer, J. 2001. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2873-2882.

- Galal, Y.G.M., El-Ghandour, I.A., Osman, M.E. and Abdel Raouf, A.M.N. 2003. The effect of inoculation by mycorrhizae and rhizobium on the growth and yield of wheat in relation to nitrogen and phosphorus fertilization as assessed by ^{15}N techniques. *Symbiosis* 34:171-183.
- García de Salamone, I.E., Hynes, R.K. and Nelson, L.M. 2005. Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. *In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Siddiqui, Z.A. (ed). Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- García-Juárez, P., Altamirano-Hernández, J., López-Bucio, J., Valencia-Cantero, E. y Macías-Rodríguez, L. 2010. Efecto del perfil de compuestos volátiles de distintas rizobacterias en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Experimental* 12:20-27.
- Gerdemann, J.W. and Nicolson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46:235-244.
- Giovanelli J., Mudd S.H. and Datko, A.H. 1980. Sulfur amino acids in plants. *In: The Biochemistry of Plants*. Mifflin, B.J. (ed). Academic Press, New York.
- Giri, S. and Pati, B.R. 2004. A comparative study on phyllosphere nitrogen fixation by newly isolated *Corynebacterium* sp. and *Flavobacterium* sp. and their potentialities as biofertilizer. *Acta Microbial. Immunol Hung.* 51:47-56.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, O. and Penrose, D.M. 1999. Biochemical and genetic mechanism used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London.
- Glick, B.R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J. and McConkey, B. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26:227-242.
- Goldstein, A., Lester, T. and Brown, J. 2003. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta proteins and Proteomics* 1647:266-271.
- Guo, J.H., Qi, H.Y., Guo, Y.H., Ge, H.I., Gong, I.Y., Zhang, I.X. and Sun, P.H. 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 29:66-72.

- Gyaneshwar, P.G., Naresh Kumar, L. and Poole, P. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245:83-93.
- Haansuu, P., Vuorela, P. and Haahtela, K. 1999. Detection of antimicrobial and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -transport blocking activity in *Frankia* culture broth extracts. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 9:1-4.
- Haas, D. and Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 41:117-153.
- Hageman, R.V. and Burris, R.H. 1978. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle (nitrogen fixation/hydrogen evolution lag phase/ATP hydrolysis). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2699-2702.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43:895-914.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43-56.
- Harrison, A.P. Jr. 1984. The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Annu. Rev. Microbiol.* 38:265-292.
- Hayman, D.S. 1982. Practical aspects of vesicular arbuscular mycorrhiza. *In: Advances in Agricultural Microbiology.* Subba-Rao, N.S. (ed). Oxford and IBH Pub. Co. Ltd., Mumbai, New Delhi.
- Heitefuss, R. 2001. Defence reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example. *Naturwissenschaften* 88:273-283.
- Hernández, D.M. y Charlloux, M.L. 2001. La nutrición mineral y biofertilización en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Temas Ciencia Technol.* 5:11-27.
- Hoffman, P.F., Kaufman, A.J., Halverson, G.P. and Schrag, D.P. 1998. A neoproterozoic snowball earth. *Science* 281:1342-1346.
- Humphris, S.N., Wheatley, R.E. and Bruce, A. 2001. The effects of specific volatile organic compounds produced by *Trichoderma* spp. on the growth of wood decay basidiomycetes. *Holzforschung* 55:233-237.

- Hwang, J. and Benson, D.M. 2003. Expression of induced resistance in poinsettia cuttings against *Rhizoctonia* stem rot by treatment of stock plants with binucleate *Rhizoctonia*. *Biol. Control* 27:73-80.
- John, P. 1991. How plant molecular biologists revealed a surprising relationship between two enzymes, which took an enzyme out of a membrane where it was not located, and put it into the soluble phase where it could be studied. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:192-194.
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G. and Piechulla, B. 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol.* 187:351-360.
- Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Azarova T., Makarova, N. and Lugtenberg, B. 2006. Organic acids, sugars and L-tryptophan in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:250-256.
- Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D. and De'fago, G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant Microbe Interact.* 5:4-13.
- Kennedy, I.R. 2001. Biofertilisers in action. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:825-827.
- Khammas, K.M. and Kaiser, P. 1992. Pectin decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species. *Can. J. Microbiol.* 38:794-797.
- Khan, M.R. and Anwer, M.A. 2007. Molecular and biochemical characterization of soil isolated of *Aspergillus niger* aggregate and an assessment of their antagonism against *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol. Mediterr.* 46:304-315.
- Khaosaad, T., Garcia-Garrido, J.M., Steinkellner, S. and Vierheilig, H. 2007. Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biol. Biochem.* 39:727-734.
- Kloepper, J.W., Hume, D.J., Schnier, F.M., Singleton, C., Tipping, B., Laliberte, M., Frauley, K., Kutchaw, T., Simonson, C., Lifshitz, R., Zaleska, I. and Lee, L. 1988. Plant growth promoting rhizobacteria on canola. *Plant Dis.* 72:42-46.
- Kovacs, K., Macrelli, S., Szakacs, G. and Zacchi, G. 2009. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnol. Biofuels* 2:14-25.

- Krotzky, A. and Werner, D. 1987. Nitrogen fixation in *Pseudomonas stutzeri*. Arch. Microbiol. 147:48-57.
- Kuiper, I., Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J. 2001. Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. Mol. Plant Microbe Interact. 14:1197-1205.
- Leggett, M., Cross, J., Hnatowich, G. and Holloway, G. 2002. Challenges in commercializing a phosphate-solubilizing microorganism: *Penicillium bilaiae*, a case history. In: Developments in Plant and Soil Sciences. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velázquez, E. and Rodríguez-Barrueco, C. (eds). Springer, Salamanca, Spain.
- Leyval, C., Turnau, K. and Haselwandter, K. 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological, and applied aspects. Mycorrhiza 7:139-153.
- Linderman, R.G. and Davis, E.A. 2004. Evaluation of commercial inorganic and organic fertilizer effects on arbuscular mycorrhizae formed by *Glomus intraradices*. HortTechnology 14:196-202.
- Lippi, D., Cacciari, I., Pietrosanti, T. and Pietrosanti, W. 1992. Interactions between *Azospirillum* and *Arthrobacter* in diazotrophic mixed culture. Symbiosis 13:107-114.
- Loper, J.E. and Schroth, M.N. 1986. Influence of bacterial sources of indole-2-acetic acid on root elongation of sugar beet. Phytopathology 76:386-389.
- Lucy, M., Reed, E. and Glick, R.B. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie van Leeuwenhoek 86:1-25.
- Madigan, M. and Martinko, J. 2005. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Mahendra, S. 1988. Sulphur management in coarse textured alluvial soils. Proc. TSI-FAI Symp. Sulphur in Agriculture. New Delhi.
- Manjula, K. and Podile, A.R. 2001. Chitin-supplemented formulations improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF 1. Can. J. Microbiol. 47:618-625.
- Marek-Kozaczuk, M. and Skorupska, A. 2001. Production of B-group vitamins by plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 and the importance of vitamins in the colonization and nodulation of red clover. Biol. Fertil. Soils 33:146-151.

- Martínez-Salgado, M.M., Franco, M., Orjuela, O. y Sandón, A. 2007. *Nocardia* sp. y *Trichoderma* sp. aislados de suelos de cultivos de arroz (*Oryza sativa*) para el control de *Rhizoctonia solani*. In: Sexto Simposio Latinoamericano de Biodeterioro y Biodegradación. Bogotá, Colombia.
- Maunuksela, L. 2001. Molecular and physiological characterization of rhizosphere bacteria and *Frankia* in forest soils devoid of actinorhizal plants. P.h. Thesis, Faculty of Science, University of Helsinki.
- Mayak, S., Tivosh, T. and Glick, B.R. 1999. Effect of wild type and mutant plant growth promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. *J. Plant Growth Regul.* 18:49-53.
- Meyer, J.R. and Linderman, R.G. 1986. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol. Biochem.* 18:185-190.
- Miller, R.M. and Jastrow, J.D. 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. In: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kapulnik, Y. and Douds, D. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Mitchell, A.M., Strobel, G.A., Moore, E., Robinson, R. and Sears, J. 2010. Volatile antimicrobials from *Muscodora crispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 156:270-277.
- Molloy, D.P. and Mayer, D.A. 2007. Overview of a novel green technology: biological control of zebra and quagga mussels with *Pseudomonas fluorescens*. Bacterial Project Overview. New York State Museum. <http://www.aquaticnuisance.org/wordpress/wp-content/uploads/2009/01/Dreissena-Novel-Green-Technology-for-Dreissena-Control-4-Malloy.pdf>
- Mosse, B. and Hepper, C.M. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiol. Plant Path.* 5:215-223.
- Muhammad, S.M., Arshad, S.H. and Ahmad, S.B. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34:635-648.
- Nahas, E. 1996. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World J. Microbiol. Biotech.* 12:567-572.
- Neilands, J.B. 1952. A crystalline organo-iron pigment from a rust fungus (*Ustilago sphaerogena*). *J. Am. Chem. Soc.* 74:4846-4847.
- Neilands, J.B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270:26723-26726.

- Nelson, D.C. and Fisher, C.R. 1995. Chemoautotrophic and methanotrophic endosymbiotic bacteria at deep-sea vents and seeps. *In: The Microbiology of Deep-sea Hydrothermal Vents*. Karl, D.M (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Nguyen, T.H., Kennedy, I.R. and Roughley, R.J. 2002. The response of field-grown rice to inoculation with a multi-strain biofertiliser in the Hanoi district, Vietnam. *In: Biofertilisers in action*. Kennedy, I.R. and Choudhury, A.T.M.A. (eds). Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, ACT.
- Nicolotti, G. and Egli, S. 1998. Soil contamination by crude oil: impact on the mycorrhizosphere and on the revegetation potential of forest trees. *Environ Pollut.* 99:37-43.
- O'Sullivan, D.J. and O'Gara, F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas spp.* involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Rev.* 56:662-676.
- Paredes-Mendoza, M. y Espinosa-Victoria, D. 2010. Organic acids produced by phosphate solubilizing rhizobacteria: A critical review. *Terra Latinoam.* 28:61-70.
- Patten, C. and Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42:207-220.
- Paulitz, T.C. and Linderman, R.G. 1990. Interactions between fluorescent pseudomonads and VA mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 113:37-45.
- Peix, A., Rivas, R., Santa-Regina, I., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C. and Velázquez, E. 2004. *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:847-850.
- Peters, S. 2002. Mycorrhiza 101. Reforestation Technologies International, Salinas, CA.
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B. and Melville, L.H. 2004. Mycorrhizas: anatomy and cell biology. National Research Council Research Press, Ottawa.
- Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. and Guckert, A. 2000. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:948-955.
- Rabie, G.H. and Almadini, A.M. 2005. Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of *Vicia faba* plants under salinity stress. *African J. Biotechnol.* 4:210-222.

- Ramos-Solano, R., Barriuso-Maicas, J., Pereyra de la Iglesia, M.T., Domenech, J. and Gutiérrez-Mañero, F.J. 2008. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology* 98:451-457.
- Rao, A.V. and Tarafdar, J.C. 2002. Microbial mobilization of phosphorus for higher crop production in arid soils. *In: Biotechnology of Biofertilizers*. Kannaiyan, S. (ed). Narosa Publishing House, New Delhi, India.
- Raupach, G.S. and Kloepper, J.W. 2000. Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant Dis.* 84:1073-1075.
- Revillas, J.J., Rodelas, B., Pozo, C., Martínez-Toledo, M.V. and González-López, J. 2000. Production of B-group vitamins by two *Azotobacter* strains with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. *J. Applied Microbiol.* 89:486-493.
- Riggs, P.J., Chelius, M.K., Iniguez, A.L., Kaeppler, S.M. and Triplett, E.W. 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:829-836.
- Rodelas, B., Salmeron, B., Martínez-Toledo, V. and González-López, M. 1993. Production of vitamins by *Azospirillum brasilense* in chemically-defined media. *Plant Soil* 153:97-101.
- Rodríguez, H. and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* 17:319-339.
- Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Berg, G., van der Lelie, D. and Dow, J.M. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature* 7:514-525.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Paré, P.W. and Kloepper, J.W. 2003 Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4927-4932.
- Saif, S.R. and Khan, A.G.. 1977. The effect of VAM association on growth of cereals. *Plant Soil* 47:17-20.
- Sample, E.C., Soper, R.J. and Racz, G.J. 1980. Reactions of phosphate fertilizers in soils. *In: The role of phosphorus in agriculture*. Khasawneh, F.E., Sample, E.C. and Kamprath, E.J. (eds). American Society of Agronomy, Madison, WI.

- Samuels, G.J., Dodd, S.L., Gams, W., Castlebury, L.A. and Petrini, O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94:146-170.
- Séguin, A. and Lalonde, M. 1989. Detection of pectolytic activity and pel homologous sequences in *Frankia*. *Plant Soil* 118:221-229.
- Shaharoon, B., Arshad M. and Zahir, Z.A. 2006. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Lett. Appl. Microbiol.* 42:155-159.
- Shishido, M., Breuil, C. and Chanway, C.P. 1999. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29:191-196.
- Singh, S. and Kapoor, K.K. 1999. Inoculation with phosphate-solubilising microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in sandy soil. *Biol. Fertil. Soils* 28:139-144.
- Sivapalan, A., Morgan, W.C. and Franz, P.R. 1994. Effect of inoculating fungi into compost on growth of tomato and compost microflora. *Aust. J. Expt. Agr.* 34:541-548.
- Sorokin, D., Lysenko, A.M., Mityushina, L.L., Tourova, T.P., Jones, B.E., Rainey, F.A., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. 2001. *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov., and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov., and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:565-580.
- Subba-Rao, N.S. 2002. An appraisal of biofertilizer in India. *In: Biotechnology of Biofertilizers*. Kannaiyan, S. (ed). Narosa Publishing House, New Delhi, India.
- Tarafdar, J.C. and Claassen, N. 1988. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatase produced by plant roots and microorganisms. *Biol. Fertil. Soils* 5:308-312.
- Tien, T.M., Diem, H.G., Gaskins, M.H. and Hubbell, D.H. 1981. Polygaracturonic acid transeliminase production by *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* 27:426-431.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itavaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technol.* 72:169-83.

- Umali-Garcia, M., Hubbell, D.H., Gaskins, M.H. and Dazzo, F.B. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:219-226.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571-586.
- Vessey, J.K. and Heisinger, K.G. 2001. Effect of *Penicillium bilaii* inoculation and phosphorus fertilisation on root and shoot parameters of field-grown pea. *Can. J. Plant Sci.* 81:361-366.
- Vidyalakshmi, R. and Sridar, R. 2007. Isolation and characterization of sulphur oxidizing bacteria. *J. Culture Collec.* 5:73-77.
- Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R. and Indhumathi, J. 2009. Amylase production on submerged fermentation by *Bacillus* spp. *World. J. Chem.* 4:89-91.
- Wainwright, M. 1984. Sulphur oxidation in soils. *Adv. Agron.* 37:350-392.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., Von Wettstein, D., Franken, P. and Kogel, K.-H. 2005. The endophytic fungus *Piriformis indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:13386-13391.
- Weissenhorn, I., Mench, M. and Leyval, C. 1995. Bioavailability of heavy metals and arbuscular mycorrhizal in a sewage-sludge amended sandy soil. *Soil Biol. Biochem.* 27:287-296.
- Whipps, J.M. 1997. Developments in biological control of soil-borne plant pathogens. *Adv. Bot. Res.* 26:1-134.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487-511.
- Whitelaw, M.A., Harden, T.J. and Helyar, K.R. 1999. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol. Biochem.* 31:655-665.
- Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Abd El-Fattah, F.K., Squartini, A., Corich, V., Giacomini, A., de Bruijn, F., Rademaker, J., Maya-Flores, J., Ostrom, P., Vega-Hernandez, M., Hollingsworth, R.I., Martinez-Molina, E., Mateos, P., Velazques, E., Wopereis, J., Triplett, E., Umali-Garcia, M., Anarna, J.A., Rolfe, B.G., Ladha, J.K., Hill, J., Mujoo, R., Ng, P.K. and Dazzo, F.B. 2001. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Aust. J. Plant. Physiol.* 28:845-870.

Zhang, H., Kim, M.S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M.A., Ryu, C.M., Allen, R., Melo, I.S. and Pare, P.W. 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226:839-851.

Capítulo 4

Identificación Molecular de Microorganismos Promotores del Crecimiento de Plantas Mediante el Empleo de Secuencias Ribosomales

Francisco Luna-Martínez¹, Mayra Celeste Flores, Balderas² y Gerardo Armando Aguado-Santacruz^{2*}

¹Laboratorio de Cromatina y Epigenética, CINVESTAV-Unidad Irapuato

²Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Molecular de Plantas y Microorganismos
C.E. Bajío-INIFAP, Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende,
Celaya, Gto. C.P. 38010.

**Autor de correspondencia*

email: aguado.armando@inifap.gob.mx,

gaguados@gmail.com, Tel: (461)6115323 ext. 122

Con fines funcionales, los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM, del inglés, Plant Growth Promoting Microorganisms) han sido clasificados dentro de dos grandes ramas: 1) Las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB, por sus siglas en inglés) y 2) Los Hongos Promotores del Crecimiento Vegetal o Plant Growth Promoting Fungi (PGPF, por sus siglas en inglés). Debido a que gran parte de las PGPB son bacterias que viven en la rizósfera de las plantas también se les conoce como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

El universo de bacterias y hongos con potencial como PGPM es muy amplio, por lo que se han implementado diversas metodologías para su identificación. Este capítulo del libro se enfocará en la identificación de PGPM con base en la secuencia de sus genes ribosomales.

Técnicas empleadas en la identificación de PGPM's

Los métodos de tipificación pueden clasificarse dentro de dos grandes categorías: métodos fenotípicos y métodos genotípicos.

Los métodos fenotípicos son aquellos que caracterizan los productos de la expresión genética con el fin de diferenciar los microorganismos. Los perfiles bioquímicos, fisiológicos y de ácidos grasos presentes en la membrana celular

son ejemplos de propiedades fenotípicas que pueden determinarse en el laboratorio. Las propiedades fenotípicas tienen una tendencia a variar de acuerdo a las condiciones de crecimiento, fase de crecimiento y la aparición de mutaciones espontáneas. Las pruebas bioquímicas y medios de cultivo necesarios para identificar microorganismos pueden encontrarse en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (<http://www.springer-ny.com/bergeysoutline/main.htm>) y The Prokaryotes (<http://www.prokaryotes.com>).

Los métodos genotípicos son aquellos que están basados en el análisis de la estructura genética de un organismo e incluyen a los polimorfismos en los patrones de restricción del ADN por enzimas de restricción. Los métodos genotípicos no están sujetos a la variación ocasionada por las condiciones ambientales de crecimiento, pero si pueden ser afectados por deleciones o inserciones de ADN en el cromosoma, la pérdida o ganancia de ADN extracromosomal o por mutaciones que pueden crear o eliminar sitios de restricción.

Aunque en los últimos años ha habido un auge en el uso de los métodos genotípicos para la identificación de PGPM, en varios casos ha sido necesario apoyarlos con datos provenientes de métodos fenotípicos.

Métodos genotípicos

Existen diversas técnicas de marcadores moleculares que han sido empleadas como un primer intento para agrupar y establecer similitudes entre diferentes aislados colectados a partir de una planta o de una muestra de suelo en búsqueda de PGPM. La huella genética obtenida con marcadores moleculares proporciona la pauta para la secuenciación de algunos de los ejemplares de cada agrupación obtenida con base en los patrones de bandeo. En algunas ocasiones, las huellas genéticas *per se* han sido útiles para identificar a los aislados, sin embargo, la principal limitación de estos métodos es el fundamental requerimiento de cepas de referencia provenientes de colecciones microbianas para realizar la comparación con los nuevos aislados. Entre las diversas técnicas de marcadores moleculares empleadas en PGPM se

encuentran los RFLP (restriction fragment length polymorphism), T-RFLP (terminal-RFLP), RAPD (random amplified polymorphic DNA), SSR (simple sequence repeat), ISSR (inter-SSR), AFLP (amplified fragment length polymorphism), DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) y SSCP (single-stranded conformation polymorphism). Puede encontrarse una amplia explicación de estas técnicas moleculares en Xu (2010), Borman *et al.* (2008), Gil-Lamaignere *et al.* (2003), Liew *et al.* (1998), Viaud (2000) y Schütte *et al.* (2008).

La identificación bacteriana puede realizarse empleando el análisis de secuencias de ADN consideradas como cronómetros moleculares, tales como el gen de la subunidad pequeña ribosomal (ADNr 16S), la subunidad grande ribosomal (23S) y los espaciadores internos transcritos (ITS; Fig. 1), aunque existen genes del metabolismo básico de la célula como *rpoB*, *tuf*, *recA*, *gyrA*, *gyrB*, *sodA*, *groEL* y *cpn60* que también son útiles. Es importante indicar que la utilidad de estos genes para proporcionar resolución a nivel género o especie es variable y que más de un gen podría requerirse para un mayor poder de resolución y lograr la discriminación a nivel especie (James, 2010). La identificación de PGPF puede basarse en el análisis de la subunidad pequeña del ADN ribosomal 18S, pero también pueden emplearse las regiones ITS1, ITS2, 5.8 y 28S del operón ribosomal.

Secuencias del operón ribosomal empleadas para la identificación de bacterias

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana ya que se encuentra altamente conservada, es raramente sujeta a transferencia genética horizontal y dado que se encuentra en múltiples copias se mejora la sensibilidad a su detección. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a mediados de la década de 1970 (Woese y Fox, 1977). En la actualidad, gran parte de las bacterias de interés como promotores de crecimiento vegetal pueden identificarse mediante técnicas microbiológicas convencionales que se basan en características fenotípicas y requieren el aislamiento previo del

PGPM. Sin embargo, existen situaciones en las cuales la identificación fenotípica es costosa, requiere de mucho tiempo y en ocasiones resulta difícil o incluso imposible como en el caso de algunos microorganismos endofíticos. En estas circunstancias, la identificación molecular basada en el análisis del gen que codifica al ARNr 16S (el 16S ADNr) puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión.

El 16S ADNr es suficientemente largo (alrededor de 1550 pb) y puede secuenciarse todo o solo una parte para fines de identificación bacteriana a nivel de especie. Aunque existen posiciones filogenéticamente informativas a lo largo de todo el gen, la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 bases, correspondientes al extremo 5'. Generalmente, esta secuencia de 500 bases será suficiente para la correcta identificación de un aislado, con menos del 1% de ambigüedad. En cualquier caso, la secuenciación de las dos cadenas del ADNr 16S completo será necesaria cuando se trate de identificar nuevas especies no reportadas previamente (Han, 2006; Petti *et al.*, 2011).

En general, una identidad en la secuencia del 16S ADNr $\geq 98.7\%$ es adecuada para la identificación a nivel especie, una identidad de $\geq 97\%$ se requiere para una identificación a nivel de género y una identidad del $\geq 95\%$ no puede proporcionar una identificación definitiva usando el 16S ADNr. Cuando existan diferencias menores a 0.5% entre especies próximas, se debe considerar el usar otras herramientas moleculares u otras pruebas fenotípicas para decidir la identificación del aislado. El análisis del 16S ADNr generalmente proporciona la identificación a nivel de género. Existen ejemplos de géneros donde ha habido problemas en la resolución de los 16S ADNr tales como *Bacillus* spp., *Burkholderia* spp. y la familia *Enterobacteriaceae* (Han, 2006; Stackebrandt y Ebers, 2006; Petti *et al.*, 2011).

En los Cuadros 1 y 2 se indican algunos de los cebadores (primers) empleados para la amplificación de genes ribosomales de bacterias con fines de identificación.

Cuadro 1. Cebadores utilizados para amplificar diferentes regiones del operón ribosomal de bacterias.

Cebador	Región	Secuencia (5'-3')	Referencia
63F 1387R	16S	CAGGCCTAACACATGCAAGTC GGCGGWGTGTACAAGGC	Marchesi <i>et al.</i> (1998)
27F 1492R	16S	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TACGGHTACCTTGTACGACTT	Gurtler y Stanisich (1996)
338F 518R	Bacteria V3 Región (338-358) Universal V3 región (534-518)	ACTCCTAGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	Lane (1991) Muyzer <i>et al.</i> (1993)
U968F 1406R	Bacteria V6 región (968-983) Bacteria V9 región (1406-1392)	AACGCGAAGAACCCTTAC ACGGCGGGGTGTAC	Nübel <i>et al.</i> (1996) Lane <i>et al.</i> (1988)
518F 800R	16S	CCAGCAGCCGCGGTAATACG TACCAGGGTATCTAATCC	Bhromsiri y Bhromsiri (2010)
UNI R	16S	GTGTGACGGCGGTGTGTAC	Behbahani y Behbahani (2009)
FGPS5-255 FGPS1509b- 153	16S	TGGAAGCTTGATCCTGGCT AAGGAGGGGATCCAGCCGCA	Bertrand <i>et al.</i> (2001)
fD1 rD1	16S	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTGATTCCTGGCTCAG CCCGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC	Fischer <i>et al.</i> (2007)
Pf Pr	16S	CGGACCAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG CGGATCCAAGGAGGTGATCCAGCC	Han <i>et al.</i> (2005)
1f 1r	ITS	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	Fürnkranz <i>et al.</i> (2009)
Eubac1-F L1401	16S 16S	GAGTTTGATCCTGGCTCAG CGGTGTGTACAAGACCC	Fürnkranz <i>et al.</i> (2009) Giongo <i>et al.</i> (2010)
Y1 F Y3 R	16S	TGGCTCAGAACGAAACGCTGGCGGC TACCCCTTGTTACGACTTCACCCAGTGC	Magalhaes <i>et al.</i> (2001)
1F 3R	16S	AGTTTGATCCTGGCTC AAGGAGGTGATCCAGCC	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
519F 338R EubA(1522R)	16S	CAGMCGCCGGGTAAATWC GCTCCCTCCCGTAGGAGT AAGGAGGTGATCCANCCRCA	Susuki y Giovannoni (1996)
pHr P23SR01	16S-23S rRNA IGS	TGCGGCTGGATCACCTCCTT GGCTGCTTCTAAGCCAAAC	Rasche <i>et al.</i> (2006)
R-1346 R-1401	16S	TAGCGATTCCGACTTCA CGGTGTGTACAAGACCC	Sabir <i>et al.</i> (2009)

Cuadro 2. Cebadores utilizados para la amplificación del gen 16S (Edwards *et al.*, 2007).

Primer	Secuencia (5' - 3')
E8F	AGAGTTGATCCTGGCTCAG
Fd1, S-D-Bact-0008-a-S-20	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
E9F, 8FLP	GAGTTTGATCCTGGCTCAG
P1	GCGGCGTGCCTAATACATGC
109R	ACGTGTTACTCACCCGT
P2	TTCCCCACGCGTTACTCACC
E334F	CCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
357 F	CCTACGGGAGGCAGCAG
P3	GGAATCTTCCACAATGGGCG
533F	GTCCCAGCAGCCGCGGTAA
HDA2	GTATTACCGCGGCTGGCAC
56 4R	CCTGCGTGCGCTTTACGCCC
58 4R	ACATCTGACTTAACAAACCG
P4	ATCTACGCATTTACCGCTAC
E786F	GATTAGATACCCTGGTAG
80 6R	GGACTACCAGGGTATCTAAT
80 5R	TCGACATCGTTTACGGCGTG
90 7R	CCGTCAATTCCTTTGACTTT
E939 R	CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
954F	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
U968, F-968	AACGCGGAAGAACCTTAC
Ec1055, 1070F	ATGGCTGTCGTCAGCT
E111 5R	AGGGTTGCGCTCGTTG
1369 R	GCCCCGGAACGTATTCACCG
Ec 1392, 1392 R	ACGGGCGGTGTGAC
P1394	TGGTGTGACGGGCGGTGTGT
rP2	AAGTCGTAACAAGGTAGCCGT
PC5	GCGGCCGCTACCTTGTTACGACTT

Una vez obtenida la secuencia del microorganismo es necesario realizar la comparación con las secuencias 16S ADNr depositadas en bases de datos (Cuadro 3). La RDP es la principal base de datos de secuencias de ADNr (no sólo 16S, sino también 23S de procariotas, y 18S y 28S de eucariotas), y permite la comparación de secuencias aunque también ofrece otras posibilidades como la construcción de árboles filogenéticos, los cuales indican el grado de parentesco genético entre los microorganismos bajo estudio.

Cuadro 3. Bases de datos usados para la comparación de secuencias ribosomales.

Base de datos	Dirección
RDP. Ribosomal Database Project	http://rdp.cme.msu.edu
National Center for Biotechnology Information (GenBank)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
EMBL. European Molecular Biology Laboratory	http://www.ebi.ac.uk/embl
DDBJ. DNA Data Bank of Japan	http://www.ddbj.nig.ac.jp
Green Genes	http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi
SILVA rRNA database Project	http://www.arb-silva.de
RIDOM. Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms	http://r.ridom.de

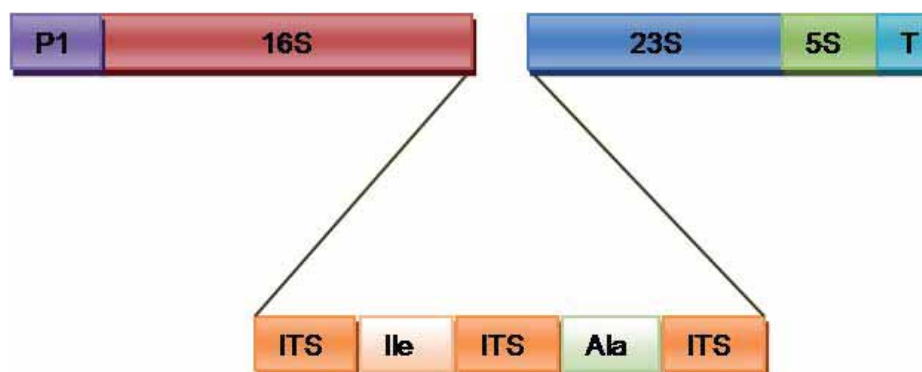


Figura 1. Operón de *Escherichia coli*. P1: Promotor del gen 16S. 16S, 23S, 5S: genes; T: señal de terminación. Se muestran regiones ITS (espaciador interno transcrito) y genes que codifican para ARNt^{-Ile} y ARNt^{-Ala}.

Secuencias del operón ribosomal empleadas para la identificación de hongos

Las regiones de ADN mitocondrial y nuclear que tienen un mayor interés tanto en estudios de filogenia como de taxonomía de hongos son las que codifican para el ARN ribosómico (ADNr). El ADNr puede encontrarse en mitocondrias y núcleo, y contiene la información para el ARN que conforma los ribosomas por lo que es información que se transcribe pero no se traduce. La principal razón para el estudio de ADNr es que se trata de un gen multicopia que contiene regiones que no codifican para proteínas. Estas copias están repetidas en tándem, lo que facilita su amplificación y cada operón de ADNr se encuentra separado por los IGS (intergenic spacers/espaciadores intergénicos; Figs. 2 y 3) integrados por los ETS (external transcribed spacer/espaciador externo transcrito) y NTS (non-transcribed spacer/espaciador no transcrito).

En el ADN ribosomal existen fragmentos con distinto grado de conservación de una longitud cercana a 6 Kb que permiten realizar estudios a diferentes niveles. Las regiones que se encuentran altamente conservadas nos permiten realizar la identificación de hongos y la realización de estudios evolutivos a nivel de género y familia mediante el empleo de cebadores universales. Por otro lado, la heterogeneidad presente en otras secuencias nucleotídicas del operón ribosomal ha sido utilizada para clasificar filogenéticamente a los microorganismos (Ochoa y Suárez, 2008) y resolver diferencias entre los microorganismos a nivel de cepa o aislado.

Entre las secuencias altamente conservadas de los genes del operón ribosomal se encuentran regiones variables denominadas ITS (internal transcribed spacers) cuya función es desconocida. La tasa de variabilidad en estas regiones espaciadoras es más elevada que la que se presenta en los genes ribosomales, aunque sus secuencias se pueden alinear con confianza entre taxones estrechamente relacionados (Ochoa y Suárez, 2008). Las secuencias del espaciador interno transcrito del ADNr han sido usadas exhaustivamente por taxónomos moleculares para identificar, por ejemplo, diferentes especies de *Penicillium* (La Guerche *et al.*, 2004) y *Trichoderma* (Hermosa *et al.*, 2000; Chakraborty *et al.*, 2010).

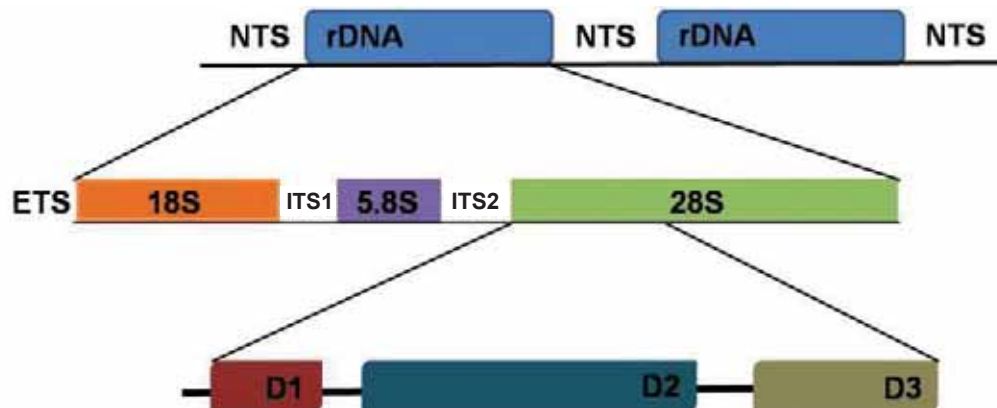


Figura 2. Esquema del operón del ADNr en eucariotes (ETS, espaciador externo transcrito; ITS, espaciador interno transcrito; Genes 18S, 5.8S y 28S; D1, D2 y D3: Dominios de la subunidad grande; NTS, espaciador no transcrito).

La región del ADNr incluye el gen 18S (esta región también se denomina subunidad pequeña o SSU-small subunit), el espaciador interno transcrito 1 o ITS1, el gen 5.8S, el espaciador interno transcrito 2 o ITS2 y el gen 28S (también denominado como subunidad grande o LSU-large subunit; Figs. 2 y 3).

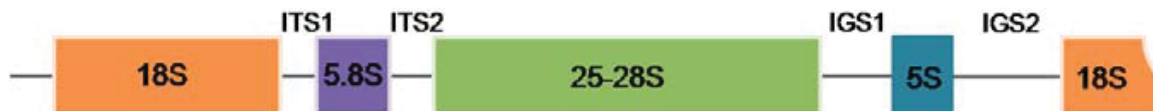


Figura 3. Acomodo de los genes del operón ADNr en Basidiomicetos y Levaduras (Vilgalys, 2004).

Las regiones 18S, 5.8S, 28S están relativamente conservadas entre los hongos, lo que facilita el análisis molecular para establecer relaciones filogenéticas a diferentes niveles (Ochoa y Suárez, 2008).

El gen 18S de la subunidad ribosomal pequeña ARNr (SSU) es la secuencia normalmente elegida en estudios filogenéticos y un importante marcador para estudios de biodiversidad ambiental, debido a que presentan regiones flanqueadoras conservadas lo que permite su rápida secuenciación ya sea a partir del ARNr o la amplificación por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores universales (Simon *et al.*, 1992).

La resolución taxonómica del 18S ADNr puede no siempre ser suficiente para identificar especies de hongos y cepas, aunque la amplificación del 18S ADNr provee información de la diversidad fúngica y de la dinámica en el suelo de especies relacionadas de hongos (Smit *et al.*, 1999). Existen diversos cebadores para amplificar secuencias parciales del gen 18S del ARNr de hongos (Cuadro 4), sin embargo un factor crítico en el diseño de cebadores para la amplificación del gen 18S del ARNr es la poca especificidad hacia el ADN de hongos, ya que algunas regiones de la secuencia del 18S ARNr comparten alta similitud con otros eucariotes (Anderson *et al.*, 2003).

Cuadro 4. Cebadores para amplificar el gen de la subunidad pequeña ribosomal (18S).

Cebador	Secuencia (5'-3')	Referencias
Basid 1	TTGCTACATGGATAACTGTG	Vilgalys (2004)
Basid 2	CTGTAAAGACTACAACGG	Vilgalys (2004)
Basid 3	AGAGTGTTCAAAGCAGGC	Vilgalys (2004)
Basid 4	CTCACTAAGCCATTCAATCGG	Vilgalys (2004)
BMB-'A'	GRATTACCGCGGCWGCTG	Lane <i>et al.</i> (1985)
BMB-'B'	CCGTCAATTCVTTTTPAGTTT	Lane <i>et al.</i> (1985)
BMB-BR	CTTAAAGGAATTGACGGAA	Lane <i>et al.</i> (1985)
BMB-'C'	ACGGGCGGTGTGTPC	Lane <i>et al.</i> (1985)
BMB-CR	GTACACACCGCCCGTCG	Lane <i>et al.</i> (1985)
CMB1	CAGCCTTGCGACCATACTCC	Vilgalys (2004)
CNS1	GAGACAAGCATATGACTACTG	Vilgalys (2004)
CNS2.8R	AATTTGCGCGCCTGCTGCAA	Vilgalys (2004)
CNS25	ATGTATTAGCTCTAGAATTACCAC	Vilgalys (2004)
CNS26	TCGAAAGTTGATAGGGCAG	Vilgalys (2004)
CNS3.3R	GACTACGAGCTTTTTAACGT	Vilgalys (2004)
CNS3.5R	TTTCGCAGTAGTTTGTCTTA	Vilgalys (2004)
CNS3.6R	AATGAAGTCATCCTTGGCAG	Vilgalys (2004)
CTW12	AAACCTTGTTACGACTT	Vilgalys (2004)
MB1	GGAGTATGGTCGCAAGGCTG	Vilgalys (2004)
MB2	GTGAGTTTCCCCGTGTTGAG	Vilgalys (2004)
NS	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	White <i>et al.</i> (1990)
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	White <i>et al.</i> (1990)
NS1.5R	TCTAGAGCTAATACATGC(T/C)G	White <i>et al.</i> (1990)

Cuadro 4. Cont.

NS17	CATGTCTAAGTTTAAGCAA	White et al. (1990)
NS18	CTCATTCCAATTACAAGACC	White et al. (1990)
NS19	CCGGAGAAGGAGCCTGAGAAAC	White et al. (1990)
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	White et al. (1990)
NS2.8R	GGCCCTCAAATCTAAGGATT	White et al. (1990)
NS20	CGTCCCTATTAATCATTACG	White et al. (1990)
NS21-ag	GAATAATAGAATAGGACG	White et al. (1990)
NS21-Is	AATATACGCTATTGGAGCTGG	White et al. (1990)
NS22	AATTAAGCAGACAAATCACT	White et al. (1990)
NS23	GACTCAACACGGGAAACTC	White et al. (1990)
NS24	AAACCTTGTTACGACTTTTA	White et al. (1990)
NS25	GTGGTAATTCTAGAGCTAATACT	White et al. (1990)
NS26	CTGCCCTATCAACTTTTGA	White et al. (1990)
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	White et al. (1990)
NS3.2R	CGTATATTAATAATTGTTGAC	White et al. (1990)
NS3.6R	CAAACACTGCGAAAGCATC	White et al. (1990)
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	White et al. (1990)
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	White et al. (1990)
NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC	White et al. (1990)
NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	White et al. (1990)
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	White et al. (1990)
SR1	ATTACCGCGGCTGCT	Vilgalys (2004)
SR10R	TTTGACTCAACACGGG	Vilgalys (2004)
SR1R	TACCTGGTTGATQCTGCCAGT	Vilgalys (2004)
SR2	CGGCCATGCACCACC	Vilgalys (2004)
SR3	GAAAGTTGATAGGGCT	Vilgalys (2004)
SR4	AAACCAACAAAATAGAA	Vilgalys (2004)
SR5	GTGCCCTTCCGTCAATT	Vilgalys (2004)
SR6	TGTTACGACTTTTACTT	Vilgalys (2004)
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG	Vilgalys (2004)
SR7	GTTCAACTACGAGCTTTTTAA	Vilgalys (2004)
SR7R	AGTAAAAAGCTCGTAGTTG	Vilgalys (2004)
SR8R	GAACCAGGACTTTTACCTT	Vilgalys (2004)
SR9R	QAGAGGTGAAATTCT	Vilgalys (2004)
TW11	GGAGTGGAGCCTGCGGCT	Vilgalys (2004)
TW12	AAGTCGTAACAAGGTTT	Vilgalys (2004)
TW9	TAAGCCATGCATGTCT	Vilgalys (2004)
VANS1	GTCTAGTATAATCGTTATACAGG	Vilgalys (2004)
TW11	GGAGTGGAGCCTGCGGCT	Vilgalys (2004)

Al igual que los genes 18S y 28S, el gen 5.8S está conservado evolutivamente, pero su pequeño tamaño (164-165 pb) limita su utilidad en comparaciones filogenéticas.

El gen más pequeño 5S ARNr puede o no estar incluido en la unidad de ADNr dependiendo del grupo taxonómico que se esté analizando (Ochoa y Suárez, 2008); usualmente se encuentra en los Basidiomicetos y algunos Ascomicetos como las levaduras, entre cada unidad de repetición (Fig. 3).

Se encuentran también regiones espaciadoras no codificantes, denominadas IGS, que incluyen cada una de ellas dos regiones espaciadoras externas (ETS1 y ETS2-External Transcribed Spacer) que no codifican proteínas, pero que sí son transcritas y otras que no se transcriben llamadas NTS (Non-Transcribed Spacer).

Cuadro 5. Cebadores utilizados para amplificar el gen de la subunidad grande ribosomal (28S).

Cebador	Secuencia (5'-3')	Referencia
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG	Vilgalys (2004)
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG	Vilgalys (2004)
CNL12	CTGAACGCCTCTAAGTCAG	Bruns (2002)
CNL14	GTTCAACCCTTGTTCTAAAG	Bruns (2002)
CNL2f	GTTTCCCTTTTAACAATTTTAC	Bruns (2002)
CTB11	GCAGCAGGTCTCCAAGGTG	Bruns (2002)
CTB6	GCATATCAATAAGCGGAGG	Bruns (2002)
CTW13	CGTCTTGAAACACGGACC	Bruns (2002)
CTW14	GAAGTTTCCCTCAGGATAGC	Bruns (2002)
CTW15	CCGCAGCAGGTCTCCAAG	Bruns (2002)
Kim-Q	ACGCCTCTAAGTCAGAAT	Bruns (2002)
Kim-Y	TCGCAGAGCGAACGAGAT	Bruns (2002)
KJ1	GGCGGTAAATTCCGTCC	Bruns (2002)
KJ2	GCTTGAAATTGTCTGGGAGGG	Bruns (2002)
LR0R	ACCCGCTGAACTTAAGC	Vilgalys (2004)
LR1	GGTTGGTTTCTTTTCT	Vilgalys (2004)
LR10	AGTCAAGCTCAACAGGG	Vilgalys (2004)
LR10R	GACCTGTTGAGCTTGA	Vilgalys (2004)
LR11	GCCAGTTATCCCTGTGGTAA	Vilgalys (2004)
LR12	GACTTAGAGGCGTTTACG	Vilgalys (2004)

Cuadro 5. Cont.

LR12R	CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA	Vilgalys (2004)
LR14	AGCCAAACTCCCCACCTG	Vilgalys (2004)
LR15	TAAATTACAACCTCGGAC	Vilgalys (2004)
LR16	TTCCACCCAAACACTCG	Vilgalys (2004)
LR17R	TAACCTATTCTCAAACCTT	Vilgalys (2004)
LR2	TTTTCAAAGTTCTTTTC	Vilgalys (2004)
LR20R	GTGAGACAGGTTAGTTTTACCCT	Vilgalys (2004)
LR21	ACTTCAAGCGTTTCCCTTT	Vilgalys (2004)
LR22	CCTCACGGTACTTGTTTCGCT	Vilgalys (2004)
LR2R	AAGAACTTTGAAAAGAG	Vilgalys (2004)
LR3	CCGTGTTTCAAGACGGG	Vilgalys (2004)
LR3R	GTCTTGAAACACGGACC	Vilgalys (2004)
LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	Vilgalys (2004)
LR6	CGCCAGTTCTGCTTACC	Vilgalys (2004)
LR7	TACTACCACCAAGATCT	Vilgalys (2004)
LR7R	GCAGATCTTGGTGGTAG	Vilgalys (2004)
LR8	CACCTTGGAGACCTGCT	Vilgalys (2004)
LR8R	AGCAGGTCTCCAAGGTG	Vilgalys (2004)
LR9	AGAGCACTGGGCAGAAA	Vilgalys (2004)
NL13	CAAGCGAACTTTCATCATGCACG	Bruns (2002)
NL14	CTTTAGAACAAGGGTTGAAC	Bruns (2002)
NL1f	TGGGTGGTAAATTCCATCTA	Bruns (2002)
NL2f	GTGAAATTGTTAAAAGGGAAAC	Bruns (2002)
TB11	CACCTTGGAGACCTGCTGC	Bruns (2002)
TW13	GGTCCGTGTTTCAAGACG	Bruns (2002)
TW14	GCTATCCTGAGGGAAACTTC	Bruns (2002)
TW15	CTTGGAGACCTGCTGCGG	Bruns (2002)

Cuadro 6. Cebadores utilizados para amplificar el gen 5.8S.

Cebador	Secuencia	Referencia
5S-Anderson	CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT	Bruns (2002)
5S-Bruns	GCATCCCGTCCGATCTGCGCAG	Bruns (2002)
Kim-Y	TCGCAGAGCGAACGAGAT	Bruns (2002)
5S-rhizoc	GTACTAACTAGGCGGCACTC	Bruns (2002)

Cuadro 7. Cebadores utilizados para amplificar las regiones ITS.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Referencia
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG	Vilgalys (2004)
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG	Vilgalys (2004)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> (1990)
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes y Bruns (1993)
ITS1-P	TTATCATTTAGAGGAAGGAG	Bruns (2002)
ITS1-P2	CTTTATCATTTAGAGGAAGGAG	Bruns (2002)
ITS1-R	(t/a)TGGT(c/t)(a/g/t)(t/c)AGAGGAAGTAA	Bruns (2002)
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White <i>et al.</i> (1990)
ITS2-Melampsora	CACTGTGTTCTTCATCGACG	Bruns (2002)
ITS2-R	TGTGTTCTTCATCGATG	Bruns (2002)
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White <i>et al.</i> (1990)
ITS3-R	ATCGATGAAGAACACAG	Bruns (2002)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> (1990)
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Gardes y Bruns (1993)
ITS4-R	CAGACTT(G/A)TA(C/T)ATGGTCCAG	Bruns (2002)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> (1990)
ITS6R	GACTCAAAACAGGTGTACC	Bruns (2002)
ITS6R2	TCATGACTCAAAACAGGTG	Bruns (2002)
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG	Vilgalys (2004)

La secuenciación de los dominios del gen de la subunidad grande D1/D2 (Fig. 2), consideradas regiones variables, se utilizan en estudios genéticos de levaduras y también se han empleado en estudios de biodiversidad y sistemática de levaduras (Ochoa y Suárez, 2008).

La región ITS completa que mide de 600 a 800 pb puede amplificarse fácilmente con iniciadores universales (Cuadro 7); la naturaleza multicopia de las repeticiones del ADN_r hace de esta región una secuencia fácil de amplificar aún cuando se utilicen muestras de ADN pequeñas, muy diluidas, o altamente degradadas (ADN obtenido de material viejo o especímenes de herbarios; Ochoa y Suárez, 2008).

La gran diversidad de secuencias en las regiones ITS1 e ITS2 facilita la identificación de hongos a nivel de especie mediante su secuenciación. Debido a que estas regiones son altamente informativas son deseables para la amplificación basada en PCR o pruebas de hibridación especie-específicas (Boyanton *et al.*, 2008). Distintos estudios han mostrado que la diversidad genética del espaciador interno transcrito (ITS) existe aún entre simples esporas (Hijri *et al.*, 2002). Aún así, las regiones ITS tienen limitaciones, y ocasionalmente se necesitan genes blanco alternativos para identificar ciertos géneros, al igual que los dominios D1 y D2 de la subunidad 28S ARN_r (Petti, 2007).

Para comparaciones entre cepas dentro de una especie, los fragmentos de ADN no funcionales o que no codifican para proteínas son generalmente más informativos que los genes conservados del ARN_r. Esto es debido a que los genes ARN_r están bajo una mayor presión evolutiva que las secuencias no codificantes. Con el incremento en accesibilidad y bajo costo, la secuenciación del ADN multilocus se está convirtiendo en una herramienta genética poderosa (Xu, 2010).

Estudios sobre la identificación molecular de bacterias promotoras del crecimiento vegetal

La identificación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) se ha realizado mediante pruebas bioquímicas, fisiológicas, morfológicas y mediante la comparación de secuencias de los genes ribosomales 16S en bases de datos y/o comparando las huellas genéticas con bacterias previamente tipificadas.

En esta sección se abordarán los estudios encaminados a identificar bacterias promotoras de crecimiento pertenecientes a los géneros. *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Frankia*, *Herbaspirillum*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* y *Streptomyces*.

Con base en el análisis del gen 16S, Bhromsiri y Bhromsiri (2010) identificaron a nivel especie aislados provenientes de raíces de pasto y de arroz de 6 órdenes: Xanthomonadales (13 aislados de *Stenotrophomonas maltophilia*), Burkholderiales (aislados de *Burkholderia vietnamiensis* y *Alcaligenes faecalis*), Enterobacteriales (aislados de *Serratia marcescens* y *Klebsiella pneumoniae*), Rhodospirillales (*Azospirillum* sp.), Rhizobiales (aislados de *Aurantimonas altamirensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium tropici* y *Beijerinckia mobilis*) y Bacillales (aislados de *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus amyloliquefaciens*).

Aunque el análisis de las secuencias de los 16S ADNr es frecuentemente empleado para identificar aislados, en ocasiones es necesario complementar la información con otras pruebas. Por ejemplo, Rainey y Wiegel (1996) realizaron un análisis comparativo entre una secuencia de 1410 a 1414 pb del 16S ADNr de cepas de *Aquabacter*, *Azorhizobium* y *Xanthobacter*. El análisis filogenético realizado sugirió una relación filogenética cercana ya que no fue posible ubicarlos en clusters diferentes. Estos autores sugirieron complementar la información obtenida con estudios fisiológicos y morfológicos para poder diferenciar las cepas de estos tres géneros. Otro ejemplo es el estudio realizado por Bahri *et al.* (2009) en el cual los autores no pudieron encontrar

suficiente resolución al analizar las secuencias de los genes 16S ADNr de 11 aislados de *Bacillus* sp. provenientes de la rizósfera de plantas de soya; las identidades encontradas fueron similares entre las secuencias de los aislados y las secuencias de varias especies de *Bacillus* depositadas en las bases de datos.

El complementar el análisis de secuencias de genes ribosomales 16S con pruebas morfológicas y pruebas bioquímicas puede llevar a una mejor identificación de los aislados. Empleando el kit de identificación API20E/NE, secuencias del gen 16S ADNr y del gen *cpn60*, Mehnaz *et al.* (2010) pudieron identificar aislados de PGPR provenientes de raíces de plantas de caña de azúcar pertenecientes a los géneros *Enterobacter* (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. oryzae*), *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. fluorescens*, *P. aurantiaca*, *P. reactans*), *Klebsiella* (*K. oxytoca*), *Azospirillum* (*A. brasilense*), *Rahnella* (*R. aquatilis*), *Delftia* (*D. acidovorans*), *Caulobacter* (*C. crecentus*), *Pannonibacter* (*P. phragmitetus*), *Xanthomonas* (*X. sp.*), *Stenotrophomonas* (*S. maltophilia*) y *Rhizobium* (*R. sp.*).

Con base en un análisis filogenético usando las secuencias de los genes 16S ADNr y *rpoB*, pruebas de hibridación ADN-ADN, perfiles de ácidos grasos y las características bioquímicas y fisiológicas, Kämpfer *et al.* (2005) propusieron un aislado proveniente de trigo como un nuevo PGPB identificándolo como *Enterobacter radicincitans* sp. nov. Las mismas pruebas también fueron realizadas por Madhaiyan *et al.* (2010) en un aislado PGPB proveniente de la rizósfera de plantas de Neem que fue nombrado *Microbacterium azadirachtae* sp. nov.

Deepa *et al.* (2010) emplearon análisis morfológicos y de secuencias de los genes 16S ADNr para identificar aislados PGPB de frijol pinto como *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* subsp. *Cloacae* y *Enterobacter asburiae*.

Giongo *et al.* (2010) ubicaron dos aislados provenientes de raíces de lupino silvestre dentro de los géneros *Enterobacter* y *Serratia* por medio de sus características bioquímicas, morfológicas, fisiológicas y del análisis secuencias de los genes 16S ADNr.

Mediante el análisis de las secuencias de los genes 16S ADNr, Koo y Cho (2009) identificaron una rizobacteria promotora del crecimiento como *Serratia* sp. proveniente del suelo adherido a las raíces de un pasto crecido en tierras contaminadas con petróleo y metales pesados.

Mediante la identificación de rizobacterias promotoras de crecimiento de pimentón y maíz por medio de análisis morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, Reyes *et al.* (2008) pudieron identificar 8 rizobacterias no-diazotróficas y 17 diazotróficas pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium*. Igualmente, empleando pruebas bioquímicas, Joseph *et al.* (2007) fueron capaces de caracterizar alrededor de 150 aislados de PGPR a partir de tierras sembradas con garbanzo y que correspondieron a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Rhizobium*.

Khan y Doty (2009) identificaron 11 cepas de bacterias endófitas de plantas de papa pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Rahnella*, *Rhodanobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* y *Phyllobacterium* a partir del análisis de secuencias del 16S ADNr.

Behbahani y Behbahani (2009) aislaron bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de la rizósfera de plantas de papa y remolacha. Al caracterizarlas mediante la secuencia de sus genes 16S ADNr los aislados pudieron ser identificados como *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis* y *Pseudomonas putida*.

Calvo *et al.* (2010) obtuvieron aislados PGPR provenientes de la rizósfera de plantas de papa. La mayoría de los aislados fueron identificados como *Bacillus amyloliquefaciens*, pero también se lograron encontrar algunas especies nuevas putativas de *Bacillus* mediante la secuencia de sus genes 16S ADNr.

Sock (2002) mediante marcadores RAPD y empleando cepas de referencia logró identificar un aislado rizosférico promotor del crecimiento vegetal de plátano y soya como *Bacillus sphaericus*.

Fürnkranz *et al.* (2009) identificaron tres aislados promotores del crecimiento de frijol a partir del análisis de secuencias del 16S ADNr. Los aislados fueron identificados como *Pectobacterium cypripedii* y *Pantoea agglomerans*.

Schoebitz (2006), empleando pruebas bioquímicas llevadas a cabo con con el kit API20E y el análisis de la secuencia de los genes 16S ADNr, identificó como *Pantoea agglomerans* un aislado promotor el crecimiento vegetal proveniente de la rizósfera de césped inglés.

Existen varios métodos de análisis del perfil molecular para identificar especies de *Azospirillum* y en algunos casos es posible diferenciar hasta cepas de una misma especie. Los aislados de *Azospirillum* de distintos cultivos han mostrado un patrón genético similar bajo el análisis del perfil proteico utilizando electroforesis en campos pulsados. Por otro lado, el perfil genético mediante marcadores RFLP sirve para la identificación de bacterias a nivel cepa. La identificación de *Azospirillum* a través del RFLP del operón de histidina, el análisis de secuencias del gen 16S ADNr y la utilización de sondas del gen 16S ARNr de *Azospirillum* son métodos relativamente fáciles, rápidos, confiables y reproducibles (Grifoni *et al.*, 1995; Kabir *et al.*, 1995).

Debido al éxito que se ha tenido en la identificación de cepas pertenecientes a las especies *A. lipoferum*, *A. brasilense* y *A. amazonense*, se ha sugerido el uso del análisis de patrones de restricción para la identificación rutinaria de *Azospirillum* (De-Bashan *et al.*, 2007).

Han *et al.* (2005), realizando análisis fenotípicos, fisiológicos bioquímicos y filogenéticos de la secuencia del gen 16S ADNr describieron la caracterización de una nueva bacteria promotora del crecimiento vegetal que fue identificada como *Delftia tsuruhatensis*.

Dastager *et al.* (2010) con base en características fenotípicas, el patrón de utilización de fuentes de carbono, el análisis de metil-ésteres de ácidos grasos y el análisis de la secuencia del 16S ADNr identificaron una nueva cepa promotora de crecimiento vegetal en frijol pinto que nombraron *Micrococcus sp.* NII-0909.

En cuanto a la identificación de aislados PGPB del género *Burkholderia*, Mora y Toro (2007) lograron identificar un aislado de la especie *Burkholderia cepacia* mediante pruebas bioquímicas, mientras que mediante pruebas fenotípicas, fisiológicas y del análisis de secuencias del 16S ADNr, Pandey *et al.* (2005) determinaron que un aislado proveniente de nódulos de *Mimosa pudica* pertenecía al género *Burkholderia*.

Las especies del género *Herbaspirillum* son bacterias diazotróficas y endofíticas de plantas de gramíneas que tienen una baja variabilidad en su secuencia del 16S ADNr. Soares-Ramos *et al.* (2003) lograron diferenciar cepas de *H. seropedicae* y *H. rubrisubalbicans* combinando el análisis de la secuencia del 16S ADNr con marcadores RAPD.

Yokoyama *et al.* (2006) encontraron una gran diversidad entre 55 cepas de *Bradyrhizobium* provenientes de plantas de *Vigna* mediante el análisis de la secuencia del gen 16S ADNr y análisis tipo RFLP utilizando como sonda una secuencia parcial del gen *nod*. Los autores concluyeron que la diversidad encontrada en el género *Bradyrhizobium* era útil para mejorar los sistemas simbióticos. Por otro lado, aislados PGPB de raíces de plantas de cacahuate fueron identificados dentro del género *Bradyrhizobium* mediante pruebas bioquímicas por Deshwal *et al.* (2003).

Kang *et al.* (2010) obtuvieron aislados provenientes de la rizósfera de diferentes suelos en búsqueda de PGPR. Los aislados fueron sometidos a diversas pruebas bioquímicas y fisiológicas, así como a un análisis de la secuencia de los 16S ARNr. Con base en este enfoque, los autores lograron ubicar catorce aislados dentro de cinco géneros: *Pseudomonas* (7 aislados), *Paenibacillus* (3 aislados), *Bacillus* (2 aislados), *Burkholderia* (1 aislado) y *Erwinia* (1 aislado).

Bertrand *et al.* (2001) reportaron la identificación de aislados provenientes de raíces de plantas de mostaza negra en al menos cuatro géneros: *Phyllobacterium* (*P. rubiacearum*), *Variovorax* (*V. paradoxus*), *Pseudomonas* (*P. migulae*), y *Agrobacterium* (*A. tumefaciens*). Ocho de estos aislados produjeron un aumento considerable en el tamaño de las raíces. La identificación se realizó mediante el análisis de secuencias del 16S ADNr y ARDRA (amplified

rDNA restriction analysis o análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado) sobre los productos de amplificación del 16S ADNr con las enzimas de restricción *Rsal*, *CfoI*, *HpaII* y *HaeIII*. Ambas metodologías también fueron empleadas por Fischer *et al.* (2007) para la identificación de un aislado rizosférico de cultivos de trigo que fue capaz de aumentar el tamaño de las raíces de este cereal y que al final resultó pertenecer al género *Pseudomonas*.

Se ha reportado que la mejor técnica de identificación de *Pseudomonas oryzae* es mediante el PCR y secuencia de los 16S ADNr (Gutiérrez *et al.*, 2009).

Mediante pruebas fenotípicas, bioquímicas y del análisis de 622 pb del 16S ADNr, Ayyadurai *et al.* (2006) lograron determinar que un aislado proveniente de la rizósfera de plátano correspondía a la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

Usando técnicas de emisión de fluorescencia y el análisis de la secuencia de 16S ADNr empleando cebadores diseñados para *Pseudomonas*, Cho y Tiedje (2000) lograron identificar 248 aislados provenientes de diferentes suelos como pertenecientes a las especies *Pseudomonas corrugata*, *P. syringae*, *P. fulva*, *P. rhodesiae* y *P. veronii*.

Finalmente, Shi *et al.* (2009) caracterizaron aislados endofíticos PGPB obtenidos de raíces y hojas de plantas de remolacha. Mediante pruebas bioquímicas, morfológicas y del análisis de la secuencia del 16S ADNr, identificaron entre los aislados a *Bacillus flexus*, *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fulva*, *Chryseobacterium indologene*, *Streptomyces globisporus* y *Streptomyces griseofuscus*.

Estudios sobre la identificación molecular de hongos promotores del crecimiento vegetal

Existen diversos estudios en los que se han identificado aislados del género *Penicillium* empleando los cebadores ITS1 e ITS4 diseñados por White *et al.* (1990), los cuales amplifican los espaciadores transcrito internos localizados entre la subunidad grande y la pequeña de los genes ribosomales. Khan *et al.* (2008) identificaron un aislado endofítico PGPF proveniente de las raíces de

Ixeris repens como *Penicillium citrinum*. Por otra parte, Hamayun *et al.* (2010) obtuvieron un aislado promotor del crecimiento de *Chrysanthemum coronarium* que identificaron como *Penicillium sp.* MH7. Tamura *et al.* 2008 obtuvieron dos aislados promotores del crecimiento de la planta *Xyris complanata* que identificaron como *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.*

A partir del análisis de las secuencias ITS (pero empleando los cebadores ITS5 e ITS2), La Guerche *et al.* (2004) identificaron 43 aislados diferentes, productores de geosmina (compuesto químico que disminuye la calidad del vino), colectados a partir de uva como *Penicillium expansum* y también ubicaron otros aislados no productores de geosmina dentro de las especies *P. purpurogenum*, *P. thomii* y *Talaromyces wortmanii*.

Simon *et al.* (1992) diseñaron el cebador VANS1 y que en conjunto con los cebadores diseñados por White *et al.* (1990) permitieron una amplificación más selectiva del 18S ADNr de hongos micorrízico arbusculares. Entre los géneros en los que fue posible lograr una amplificación selectiva se encontraron *Glomus* (*G. intraradices* y *G. mosseae*), *Gigaspora* (*G. gigantea* y *G. margarita*), *Entrophospora* (*E. colombiana*), *Scutellospora* (*S. pellucida*). Este cebador no amplificó ADN de angiospermas.

Smit *et al.* (1999) diseñaron un par de cebadores con el fin de analizar la diversidad fúngica en la rizósfera de plantas de trigo. Los cebadores EF3+EF4 amplificaron un fragmento de 1.4 kb mientras que con el uso de los cebadores EF4+fung5 se logró la amplificación de 0.5 kb del gen 18S ADNr. Con este par de cebadores se logró la amplificación de secuencias de hongos basidiomicetos, zigomicetos y ascomicetos. Los autores concluyen que aunque las secuencias del 18S ADNr no siempre permiten una resolución taxonómica para identificación a nivel especie y cepa, sí son útiles para dar información sobre la diversidad de especies en muestras ambientales.

Borneman y Hartin (2000) diseñaron cebadores para amplificar específicamente secuencias de la subunidad pequeña 18S de los genes ribosomales fúngicos y los probaron en diferentes muestras de suelos. Con estos cebadores, los autores fueron capaces de ubicar diferentes especies de PGPF dentro de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Glomus*, *Phoma* y *Penicillium*.

Lee *et al.* (2008) diseñaron un nuevo par de cebadores para amplificar alrededor de 800 pb de la subunidad pequeña ribosomal 18S, los cuales resultaron útiles para amplificar el ADN de diversas especies dentro de la división Glomeromycota, en la cual están incluidos los hongos micorrízico arbusculares. Los cebadores AML1 y AML2 fueron capaces de discriminar entre hongos micorrízicos y no micorrízicos y no amplificaron muestras de plantas.

De acuerdo con Guo (2010), la determinación de la diversidad poblacional de hongos endofíticos micorrízicos en su ambiente ha podido realizarse mediante el uso de técnicas de huella genética tales como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), T-RFLP (Terminal-RFLP), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeat), ISSR (inter-SSR), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) y SSCP (Single-Stranded Conformation Polymorphism). A menudo se emplean dichas técnicas para clasificar múltiples aislados mediante análisis filogenético (dendrogramas), tras lo cual, se eligen algunos aislados representativos de cada cluster para identificarlos por medio de secuencias ribosomales (ITS, 18S o 28S ADNr; Taylor *et al.*, 2002).

Chen *et al.* (2011) estudiaron la diversidad fúngica de raíces, tallos y hojas de la planta medicinal *Huperzia serrata*. La identificación se realizó mediante el análisis de los ITS empleando los cebadores ITS1 e ITS4 diseñados por White *et al.* (1990). Los hongos endofíticos identificados pertenecieron a 4 clases: *Sordariomycetos* (92.31%), *Dothideomycetos* (3.85%), *Pezizomycetos* (1.92%) y *Agaricomycetos* (1.92%). Además fueron identificadas 47 cepas a nivel género, incluyendo *Glomerella* (*Colletotrichum*), *Hypocrea* (*Trichoderma*), *Pleurostoma*, *Chaetomium*, *Coniochaeta* (*Lecythophora*), *Daldinia*, *Xylaria*, *Hypoxyton*, *Nodulisporium*, *Cazia* y *Phellinus*. Estos resultados demostraron la gran diversidad de hongos que conviven en *H. serrata*.

Piriformospora indica es un hongo rizosférico endófito que promueve el crecimiento vegetal en maíz, tabaco, cebada, jitomate, trigo, artemisia y perejil. Su identificación ha sido realizada mediante el análisis de la secuencia de la subunidad pequeña 18S de los genes ribosomales (Varma *et al.*, 1999).

Mucciarelli *et al.* (2002) aislaron un hongo PGPF del meristemo de *Mentha piperita*. No pudieron realizar estudios morfológicos debido a que el hongo no formó esporas. Sin embargo, el análisis de la secuencia del 18S ADNr permitió determinar que este PGPF era un miembro de los *Pyrenomyces* subclase *Sordariomycetidae*.

Hamayun *et al.* (2009a) identificaron un hongo endofítico proveniente de raíces de soya que funcionó como PGPF tanto en plantas soya como de arroz. Mediante el análisis del gen 28S ADNr, este microorganismo fue posteriormente identificado como *Cladosporium sphaerospermum*.

Hamayun *et al.* (2009b) identificaron un hongo endofítico con actividad de promoción de crecimiento en arroz, aislado previamente a partir de raíces de soya. Este hongo pudo ser identificado como *Phoma herbarum* mediante el análisis de la secuencia del 28S ADNr y de las secuencias ITS amplificadas con los cebadores ITS1 e ITS4 diseñados por White *et al.* (1990).

También mediante la amplificación de las secuencias ITS a través de los cebadores ITS1 e ITS4 mencionados anteriormente, Wu *et al.* (2010) reportaron la identificación de un aislado endofítico de las raíces de *Saussurea involucreta* con propiedades de PGPF.

Porras y Bayman (2007) tuvieron problemas para identificar aislados micorrízicos de plantas de vainilla con los cebadores de White *et al.* (1990), por lo que diseñaron nuevos cebadores sobre las secuencias ITS. El análisis de las secuencias ITS y de la subunidad ribosomal mitocondrial grande les permitió a estos autores la ubicación de diversas especies dentro de los géneros *Ceratobasidium*, *Thanatephorus* y *Tulasnella*. Varios aislados del género *Ceratobasidium* resultaron eficaces para promover el crecimiento de plantas y geminación de semillas.

Zijlstra *et al.* (2005) obtuvieron aislados endofíticos promotores del crecimiento vegetal de *Deschampsia flexuosa* (heno común) y *Calluna vulgaris* (brezo). Mediante el análisis de las secuencias ITS amplificadas con los cebadores ITS1 e ITS4 diseñados por White *et al.* (1990), la mayoría de los

aislados se lograron ser ubicados dentro del orden *Helotiales*, otros más fueron identificados dentro del género *Cryptosporiopsis* o con semejanza a la especie *Phialocephala fortinii*.

La caracterización de aislados de *Trichoderma* a nivel de especie está basada sobre criterios tales como el tamaño, color y forma de los conidios, frecuencia y patrón de ramificación del micelio y otras características morfológicas que no son muy confiables. Por ello, estudios más actuales sobre este género han recurrido a métodos moleculares para realizar su identificación. Para la caracterización a nivel especie, se ha recurrido especialmente al análisis de las secuencias de los espacios transcritos internos (ITS) 1 y 2 del ADN ribosomal (ADNr). Por ejemplo, los agentes de biocontrol de *Trichoderma* han logrado ser diferenciados de los biotipos patogénicos Th2 y Th4 de *T. harzianum*, mediante el análisis de la secuencia ITS1. También se han empleado otras técnicas moleculares para distinguir especies en este género como RFLP, RAPD y PCR-RFLP (Maymon *et al.*, 2004).

Bois *et al.* (2005) estudiaron hongos micorrízico-arbusculares capaces de colonizar árboles de las especies *Pinus banksiana* y *Populus deltoides*, así como trébol forrajero, *Trifolium pratense*. La tipificación mediante caracteres morfológicos y de la secuencia de los ITS permitió la identificación de 6 hongos a nivel especie o género: *Laccaria* sp., *Thelephora americana*, *Wilcoxina* sp., *Tuber* sp., un Sebacinoide y un Pezizal.

Hijri *et al.* (2002), empleando los cebadores ITS1 e ITS4 lograron identificar un par de hongos viviendo dentro de las esporas del hongo micorrízico arbuscular *Scutellospora castanea*. Los dos hongos identificados pertenecieron a los géneros *Nectria* y *Leptosphaeria*. Ellos advierten que la presencia de hongos dentro de otros hongos podría ser un problema cuando se realicen estudios sobre genes diferentes a los ribosomales en hongos del orden Glomales.

Con base en la revisión presentada anteriormente es claro que la adecuada y confiable identificación de un microorganismo promotor del

crecimiento requerirá de un enfoque polifásico que incluya tanto análisis microbiológicos y fenotípicos convencionales como herramientas moleculares. La certidumbre de la identificación molecular dependerá, por otro lado, de la consideración de más un enfoque o técnica, por ejemplo, la secuenciación de más de un gen ribosomal o la complementación de esta información mediante el análisis de genes mitocondriales.

Las herramientas moleculares tendrán en el futuro cercano un papel fundamental en la consolidación de la tecnología de los biofertilizantes en México, contribuyendo al aislamiento e identificación confiables de nuevos microorganismos con capacidades de promoción de crecimiento que no representen un riesgo para la salud humana y animal, pero particularmente en la protección intelectual de los productos formulados con base en estos microorganismos.

Bibliografía Citada

- Anderson, I.C., Campbell, C.D. and Prosser, J.I. 2003. Potential bias of fungal 18S rDNA and ITS PCR primers for estimating fungal biodiversity in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 5:36-47.
- Ayyadurai, N., Ravindra, N.P., Sreehari, R.M., Sunish, K.R., Samrat, S.K., Manohar, M. and Sakthivel, N. 2006. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere soil bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *Appl. Microbiol.* 100:926-937.
- Bahri, S., Wahyudi, A.T. and Mubarik, N.R. 2009. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria of *Bacillus sp.* based on 16S rRNA sequence and amplified rDNA restriction analysis. *Microbiol. Indon.* 3:12-16.
- Behbahani, M. and Behbahani, M. 2009. Investigation of biological behavior of Iranian indigenous phosphate solubilizing bacteria and determinant of colonization ability of potato roots by these bacteria isolation. *J. Med. Plant. Res.* 3:1126-1133.
- Bertrand, H., Nalin, R., Bally, R. and Cleyet-Marel, J.C. 2001. Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biol. Fert. Soils.* 33:152-156.
- Bhromsiri, C. and Bhromsiri, A. 2010. Isolation screening of growth-promoting activities and diversity of rhizobacteria from vetiver grass and rice plants. *Thai J. Agr. Sci.* 43:217-230.
- Bois, G., Piché, Y., Fung, M.Y.P. and Khasa, D.P. 2005. Mycorrhizal inoculums potentials of pure reclamation materials and revegetated tailing sands from Canadian oil sand industry. *Mycorrhiza* 15:149-158.
- Borman, A.M., Linton, C.J., Miles, S.J. and Johnson, E.M. 2008. Molecular identification of pathogenic fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:17-112.
- Borneman, J. and Hartin, R.J. 2000. PCR primers that amplify fungal ribosomal RNA genes from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4356-4360.
- Boyanton, B.L., Luna, R.A., Fasciano, L.R., Menne, K.G. and Versalovic, J. 2008. DNA pyrosequencing-based identification of pathogenic *Candida* species by using the internal transcribed spacer 2 region. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 132:667-674.

- Bruns, T.D. 2002. Primers sequences. <http://nature.berkeley.edu/brunslab/tour/primers.html>.
- Calvo, P., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E. and Zúñiga, D. 2010. Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from Andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. *Braz. J. Microbiol.* 41:899-906.
- Chakraborty, B.N., Chakraborty, U., Saha, A., Dey, P.L. and Sunar, K. 2010. Molecular characterization of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* isolated from soils of North Bengal based on rDNA markers and analysis of their PCR-RAPD profiles. *Global J. Biotechnol. Biochem.* 5:55-61.
- Chen, X.Y., Qi, Y.D., Wei, J.H., Zhang, Z., Wang, D.L., Feng, J.D. and Gan, B.C. 2011. Molecular identification of endophytic fungi from medicinal plant *Huperzia serrata* based on rDNA ITS analysis. *Microbiol. Biotechnol.* 27:495-503.
- Cho, J.C. and Tiedje, J.M. 2000. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5448-5456.
- Dastager, S.G., Deepa, C.K. and Pandey, A. 2010. Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiol. Biochem.* 48:987-992.
- De-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. y Bashan, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *In: Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo.* Ferrera-Cerrato, R. and Alarcón, A. (eds). Trillas, D.F., México.
- Deepa, C.K., Dastager, S.G. and Pandey, A. 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria from non-rhizospheric soil and their effect on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seedling growth. *Microbiol. Biotechnol.* 26:1233-1240.
- Deshwal, V.K., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K. 2003. Isolation of plant growth promoting strains of *Bradyrhizobium* (*Arachis*) sp. with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. *Curr. Sci.* 84:443-448.

- Edwards, J.E., Huws, S.A., Kim, E.J. and Kingston-Smith, A.H. 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62:323-335.
- Fischer, S.E., Sandra, I., Fischer, S.M. and Gladys, B.M. 2007. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *Microbiol Biotechnol.* 23:895-903.
- Fürnkranz, M., Müller, H. and Berg, G. 2009. Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. *J. Plant. Dis. Protect.* 116:149-155.
- Gardes, M. and Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2:113-118.
- Gil-Lamagnere, C., Roilides, E., Hacker, J. and Müller, F.M.C. 2003. Molecular typing for fungi-a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin. Microbiol. Infect.* 9:172-185.
- Giongo, A., Beneduzi, A., Ambrosini, A., Vargas, L.K., Stroschein, M.R., Eltz, F.L., Bodanese-Zanettini, M.H. and Passaglia, L.M.P. 2010. Isolation and characterization of two plant growth-promoting bacteria from the rhizoplane of a legume (*Lupinus albus*) in sandy soil. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 34:361-369.
- Grifoni, A., Bazzicalupo, M., Di-Serio, C., Fancelli, S. and Fani, R. 1995. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiol. Lett.* 127:85-91.
- Guo, L.D. 2010. Molecular diversity and identification of endophytic fungi. *In: Molecular identification of fungi.* Gherbawy, Y. and Voigt, K. (eds). Springer Verlag. Heidelberg. New York.
- Gurtler, V. and Stanisich, V.A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142:3-16.
- Gutiérrez, D.C., Hernández, A.M. y Corrales, L.C. 2009. *Pseudomonas oryzae*: un microorganismo de creciente interés científico. *Nova* 7:103-112.
- Hamayun, M., Khan, S.A., Ahmad, N., Tang, D.S., Kang, S.M., Na, C.I., Sohn, E.Y., Hwang, Y.H., Shin, D.H., Lee, B.H., Kim, J.G. and Lee, I.J. 2009a.

- Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.). Merr. World J. Microbiol. Biotechnol. 25:627-632.
- Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, A.L., Rehman, G., Sohn, E.Y., Kim, S.K., Joo, G.J. and Lee, I.J. 2009b. *Phoma herbarum* as a new gibberellin-producing and plant growth-promoting fungus. J. Microbiol. Biotechnol. 19:1244-1249.
- Hamayun, M., Khan, S.A., Iqbal, I., Ahmad, B. and Lee, I.J. 2010. Isolation of a gibberellin-producing fungus (*Penicillium sp.* MH7) and growth promotion of crown daisy (*Chrysanthemum coronarium*). J. Microbiol. Biotechnol. 20:202-207.
- Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Sun, X. and Yang, Y. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. Syst. Appl. Microbiol. 28:66-76.
- Han, X.Y. 2006. Bacterial identification based on 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. *In: Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Tang, Y.W. and Stratton, C. (eds). Springer. New York, USA.
- Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E. and Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66:1890-1898.
- Hijri, M., Redecker, D., McDonald, C., Petetot, J.A., Voigt, K., Wöstemeyer, J. and Sanders, I.R. 2002. Identification and isolation of two ascomycete fungi from spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea*. Appl. Environ. Microbiol. 68:4567-4573.
- James, G. 2010. Universal bacterial identification by PCR and DNA sequencing of 16S rRNA gene *In: PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective*. Schuller, M., Sloots, T.P., James, G.S., Halliday, C.L. and Carter, I.W.J. (eds). Springer. London.
- Joseph, B., Patra, R.R. and Lawrence, R. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Plant. Prod. 2:141-152.
- Kabir, M.M., Faure, D., Haurat, J., Normand, P., Jacoud, C., Wadoux, P. and Bally, R. 1995. Oligonucleotide probes based on 16S rRNA sequences for the identification of four *Azospirillum* species. Can. J. Microbiol. 41:1081-1087.

- Kämpfer, P., Ruppelb, S. and Remus, R. 2005. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*. Syst. Appl. Microbiol. 28:213-221.
- Kang, Y., Cheng, J., Mei, L. and Yin, S. 2010. Screening and identification of plant growth-promoting rhizobacteria. Wei Sheng Wu Xue Bao 50:853-861.
- Khan, S.A., Hamayun, M., Yoon, H.J., Kim, H.Y., Suh, S.J., Hwang, S.K., Kim, J.M., Lee, I.J., Choo, Y.S., Yoon, U.H., Kong, W.S., Lee, B.M. and Kim, J.G. 2008. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. BMC Microbiol. 8:231.
- Khan, Z. and Doty, S.L. 2009. Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. Plant Soil 322:197-207.
- Koo, S.Y. and Cho, K.S. 2009. Isolation and characterization of a plant growth-promoting rhizobacterium *Serratia* sp. SY5. J. Microbiol. Biotechnol. 19:1431-1438.
- La Guerche, S., Garcia, C., Darriet, P., Dubourdiou, D. and Labarere, J. 2004. Characterization of *Penicillium* species isolated from grape berries by their internal transcribed spacer (ITS1) sequences and by gas chromatography-mass spectrometry analysis of geosmin production. Curr. Microbiol. 48:405-411.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds). John Wiley & Sons. New York.
- Lane, D.J., Field, K.G., Olsen, G.J., and Pace, N.R. 1988. Reverse transcriptase sequencing of ribosomal RNA for phylogenetic analysis. Meth. Enzymol. 167:138-144.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. and Pace, N.R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 6955-6959.
- Lee, J., Lee, S. and Young, J.P.W. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 65:339-349.
- Liew, E.C.Y., Guo, L.D., Ranghoo, V.M., Goh, T.K. and Hyde, K.D. 1998. Molecular approaches to assessing fungal diversity in the natural environment. Fungal Divers. 1:1-17.

- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J.S., Lee, K.C., Saravanan, V.S. and Santhanakrishnan, P. 2010. *Microbacterium azadirachtae* sp. nov., a plant-growth-promoting actinobacterium isolated from the rhizoplane of Neem seedlings. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:1687-1692.
- Magalhães, C.L., Maltempi de Souza, E., Baler, W.O., Baldani, J.I., Döbereiner, J. and De Oliveira, P.F. 2001. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2375-2379.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiam, S.J., Dymnock, D. and Wade, W.G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:795-799.
- Maymon, M., Minz, D., Barbul, O., Zveibil, A., Elad, Y. and Freeman, S. 2004. Identification of *Trichoderma* biocontrol isolates to clades according to AP-PCR and ITS sequence analyses. *Phytoparasitica* 32:370-375.
- Mehnaz, S., Baig, D.N. and Lazarovits, G. 2010. Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20:1614-1623.
- Mora, E. y Toro, M. 2007. Estimulación del crecimiento vegetal por *Burkholderia cepacia*, una cepa nativa de suelos ácidos de sabanas venezolanas. *Agronomía Trop.* 57:123-128.
- Mucciarelli, M., Berteà, C.M., Scannerini, S. and Maffei, M. 2002. An ascomycetous endophyte isolated from *Mentha piperita* L.: biological features and molecular studies. *Mycologia* 94:28-39.
- Muyzer, G., Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
- Nübel, U.B., Engelen, A., Felske, J., Snaidr, A., Wieshuber, R.I., Amann, W., Ludwig, A. and Backhaus, H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriology* 178:5636-5643.
- Ochoa, D. y Suárez, J.P. 2008. Caracterización molecular de 60 hongos que forman parte del cepario micológico del C.B.C.M. de la Universidad Técnica Particular de Loja. Tesis Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Loja, Ecuador.

- Pandey, P., Kang, S.C. and Maheshwari, D.K. 2005. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. from root nodules of *Mimosa pudica*. *Curr. Sci.* 89:177-180.
- Petti, A.C., Bosshard, P.P., Brandt, M.E., Clarridge, J.E., Feldblyum, T.V., Foxall, P., Furtado, M.R., Pace, N. and Procop, G. 2011. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing: approved guideline. *In*: CLSI document MM18-A, Clinical and Laboratory Standards Institute MM18-A, Vol. 28(12). Pennsylvania.
- Petti, C.A. 2007. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin. Infect. Dis.* 44:1108-1114.
- Porras, A. and Bayman, P. 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia* 99:510-525.
- Rainey, F.A. and Wiegel, J. 1996. 16S ribosomal DNA sequence analysis confirms the close relationship between the genera *Xanthobacter*, *Azorhizobium*, and *Aquabacter* and reveals a lack of phylogenetic coherence among *Xanthobacter* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:607-610.
- Rasche, F., Velvis, H., Zachow, C., Berg, G., Van, E. and Sessitsch, A. 2006. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. *J. Appl. Ecol.* 43:555-566.
- Reyes, I., Alvarez, L., El-Ayoubi, H. and Valery, A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro* 20:37-48.
- Sabir, J.S.M., Aboa, S.E.M., Mohamed, M.M. and Gomaa, M. 2009. PCR-RFLP of 16s rRNA amplification techniques and utilization of different carbon sources used for identification of *Frankia* spp. isolated from different egyptian governorates. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 3:960-965.
- Schoebitz, C.M.I. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.). Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

- Schütte, U.E., Abdo, Z., Bent, S., Shyu, C., Williams, C., Pierson, J. and Forney, L. 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:365-380.
- Shi, Y., Lou, K. and Li, C. 2009. Isolation, quantity distribution and characterization of endophytic microorganisms within sugar beet. *African J. Biotechnol.* 8:835-840.
- Simon, L., Lalonde, M. and Bruns, T.D. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:291-295.
- Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B., Dirk, J. and Wernars, K. 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2614-2621.
- Soares-Ramos, J.R.L., Ramos, H.J.O., Cruz, L.M., Chubatsu, L.S., Pedrosa, F.O., Rigo, L.U. and Souza, E.M. 2003. Comparative molecular analysis of *Herbaspirillum* strain by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. *Genet. Mol. Biol.* 26:537-543.
- Sock, K.K. 2002. Identification of a plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus sphaericus* (UPMB10), using PCR-based DNA fingerprinting technique. Master Thesis, University Putra Malaysia.
- Stackebrandt, E. and Ebers, J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology* 33:152-155.
- Susuki, M.T. and Giovannoni, S.J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:625-630.
- Tamura, R., Hashidoko, Y., Ogita, N., Limin, S. and Tahara, S. 2008. Necessity of particular seed-borne fungi for seed germination and seedling growth of *Xyris complanata*, a pioneer monocot in top soil-lost tropical peatland in Central Kalimantan, Indonesia. *Ecol. Res.* 23:573-579.
- Taylor, D.L., Bruns, T.D., Leake, J.R. and Read, D.J. 2002. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. *In: Mycorrhizal Ecology. Ecological Studies Vol 157.* Van der Heijden, MGA and Sanders, I. (eds). Springer-Verlag. Berlin.

- Varma, A., Verma, S., Sahay, N., Bütehorn, B. and Franken, P. 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. Appl. Environ. Microbiol. 65:2741-2744.
- Viaud, M. 2000. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. Mycological Res. 104:1027-1032.
- Vilgalys, R. 2004. Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds). Academic Press, Inc. New York.
- Woese, C.R. and Fox, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5088-5090.
- Wu, L.Q., Lu, Y.L., Meng, Z.X., Chen, J. and Guo, S.X. 2010. The promoting role of an isolate of dark-septate fungus on its host plant *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. Mycorrhiza 20:127-135.
- Xu, J. 2010. Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. Curr. Issues. Mol. Biol. 8:75-90.
- Yokoyama, T., Tomooka, N., Okabayashi, M., Kaga, A., Boonkerd, N. and Vaughan, D.A. 2006. Variation in the *nod* gene RFLPs, nucleotide sequences of 16S rRNA genes, nod factors, and nodulation abilities of *Bradyrhizobium* strains isolated from Thai *Vigna* plants. Can. J. Microbiol. 52:31-46.
- Zijlstra, J.D., Van't, H.P., Baar, J., Verkley, G.J.M., Summerbell, R.C., Paradi, I., Braakhekke, W.G. and Berendse, F. 2005. Diversity of symbiotic root endophytes of the Helotiales in ericaceous plants and the grass *Deschampsia flexuosa*. Studies in Mycology 53:147-162.

Capítulo 5

Manejo y Calidad de los Biofertilizantes

*Blanca Moreno-Gómez¹, Quintín Rascón-Cruz² y
Gerardo Armando Aguado-Santacruz^{1*}*

¹*Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Molecular de Plantas y Microorganismos
C.E. Bajío-INIFAP, Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende,
Celaya, Gto. C.P. 38010.*

²*Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma
de Chihuahua, Circuito No.1 Campus Universitario
Chihuahua, Chih. C.P. 31125*

**Autor de correspondencia*

email: aguado.armando@inifap.gob.mx, gaguados@gmail.com

Tel: (461)6115323 ext. 122

El proceso de formulación de un biofertilizante comprende toda la serie de procedimientos y tecnologías posteriores a la multiplicación de los microorganismos promotores de crecimiento, enfocados a su preservación en una presentación comercialmente aceptable que permita mantener una viabilidad máxima del producto durante el mayor tiempo posible. En la práctica, la elección de la formulación adecuada de un biofertilizante determinará su éxito (Fages, 1992). Un inoculante está integrado por una o más cepas de bacterias u hongos en un material que le sirve de soporte y protección (acarreador). Una de las principales funciones de los acarreadores en una formulación es prevenir la pérdida gradual de la viabilidad de los microorganismos a introducir a los cultivos.

El acarreador ocupa la mayor proporción (por volumen o peso) del inoculante. La naturaleza de los acarreadores puede ser muy variable (Cuadro 1). Los inoculantes deben tener una cantidad adecuada de microorganismos benéficos que al ser aplicados al suelo o la planta les permita mantener un número mínimo efectivo de microorganismos capaces de establecer una asociación funcional con las plantas. En otras palabras, un buen acarreador debe tener la capacidad de liberar un número suficiente de microorganismos viables en condiciones fisiológicas adecuadas durante un tiempo considerable (Fages, 1992; Trevors *et al.*, 1992) y no debe alterar las capacidades de promoción de crecimiento de los microorganismos.

Cuadro 1. Viabilidad de algunas bacterias formuladas en diferentes acarreadores.

Vehículo	Bacteria (cepa)	Conteos iniciales/finales (Tiempo y temperatura almacenamiento)	Referencia
Aserrín-carbón	<i>Bacillus subtilis</i> BN1	7.8×10^7 - 6.2×10^6 (6 meses)	Singh et al. (2008)
Cápsulas de alginato	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas corrugata</i>	1×10^5 - 1×10^3 1×10^5 - 1×10^3 (6 meses, 4°C)	Trivedi et al. (2005)
Cápsulas de alginato	<i>Azospirillum brasilense</i>	1×10^9 - 1×10^8 (6 meses, 25°C)	Ivanova et al. (2005)
Carbón	<i>Rhizobium</i> sp. <i>Azotobacter chroococcum</i> <i>Azospirillum lipoferum</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus megaterium</i>	1×10^9 - 1×10^9 1×10^9 - 1×10^9 1×10^9 - 1×10^9 1×10^8 - 1×10^8 1×10^{10} - 1×10^{10} (1 mes)	Suneja et al. (2007)
Cenizas-lignita	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	34×10^7 - 4×10^7 (6 meses, 28°C)	Jayaraj et al. (2007)
Estiércol	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30×10^7 - 0.1×10^7 (8 meses)	Vidhyasekaran y Muthamilan (1995)
Kaolinita	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30×10^7 - 2.8×10^7 (4 meses)	Vidhyasekaran y Muthamilan (1995)

Lignita	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$30 \times 10^7 - 5.3 \times 10^7$ (4 meses)	Vidhyasekaran y Muthamilan (1995)
Perlita	<i>Bradyrhizobium</i> CB1809	$1 \times 10^9 - 1 \times 10^9$ (6 meses)	Khavazi et al. (2007)
Residuos de corcho	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Sinorhizobium fredii</i>	$1 \times 10^{10} - 1 \times 10^9$ $1 \times 10^{10} - 1 \times 10^9$ (12 meses, 25°C)	Albareda et al. (2008)
Residuos de corcho	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Mesorhizobium ciceri</i>	$1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ (12 meses)	Ferreira y Castro (2005)
Suelo	<i>Azospirillum brasilense</i> <i>Azotobacter chroococcum</i>	$2 \times 10^3 - 1 \times 10^3$ $2 \times 10^3 - 1 \times 10^3$ (3 meses, 35°C)	Gaind y Gaur (2004)
Suelo-ceniza 1:1	<i>Pseudomonas striata</i> <i>Bacillus circulans</i>	$2 \times 10^3 - 1 \times 10^2$ $2 \times 10^3 - 1 \times 10^2$ (3 meses, 35°C)	Gaind y Gaur (2004)
Talco	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (cepas P7NF y TL3)	$1 \times 10^9 - 1 \times 10^8$ (12 meses)	Caesar y Burr (1991)
Talco	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (cepa Pf1)	$37.5 \times 10^7 - 1.3 \times 10^7$ (8 meses)	Vidhyasekaran y Muthamilan (1995)
Talco	<i>Bacillus subtilis</i>	$1 \times 10^8 - 1 \times 10^6$ (45 días)	Amer y Utkhede (2000)

Cuadro 1. Cont.

Talco	<i>Pseudomonas putida</i>	$1 \times 10^9 - 1 \times 10^3$ (45 días)	Amer y Utkhede (2000)
Talco	<i>Pseudomonas putida</i> (cepas 30 y 180)	$1 \times 10^{14} - 1 \times 10^9$ (3 meses)	Bora et al. (2004)
Turba	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$3.5 \times 10^7 - 0.7 \times 10^7$ (8 meses)	Vidhyasekaran y Muthamilan (1995)
Turba	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ (6 meses, 25-30°C)	Tittabutr et al. (2007)
Turba suplementada con quitina	<i>Bacillus subtilis</i>	$1 \times 10^5 - 1 \times 10^{10}$ (6 meses)	Manjula y Podile (2001)
Vermiculita	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$30 \times 10^7 - 0.1 \times 10^7$ (8 meses)	Vidhyasekaran y Muthamilan (1995)
Vermiculita	<i>Bacillus subtilis</i>	$1 \times 10^8 - 1 \times 10^7$ (45 días)	Amer y Utkhede (2000)
Vermiculita	<i>Pseudomonas putida</i>	$1 \times 10^9 - 1 \times 10^4$ (45 días)	Amer y Utkhede (2000)

Presentación y formas de aplicación de los biofertilizantes

Conforme a Bashan (1998) la presentación de los inoculantes microbianos incluye:

- a) *Polvos*. Esta forma de aplicación es la más empleada y constituye el medio más adecuado para inocular las semillas antes de ser sembradas. Entre más pequeño sea el tamaño de la partícula del acarreador mejor será la adherencia a la semilla y menor la probabilidad de atasco de las sembradoras. Los acarreadores con tamaños de partícula más pequeños tienen una mayor área de contacto, lo que les confiere una mayor resistencia a la desecación debido al incremento de la cobertura celular (Dandurand *et al.*, 1994). El tamaño de las partículas puede variar de 0.075 a 0.25 mm y la cantidad de biofertilizante usado es usualmente de 200 a 300 g por hectárea. En garbanzo, Vidhyasekaran y Muthamilan (1995) utilizaron exitosamente *Pseudomonas fluorescens* como recubrimiento de semillas (preparaciones de talco a razón de 100 g por cada 25 kg de semilla) para el control del marchitamiento de este cultivo.
- b) *Suspensiones*. Esta aplicación se basa en los inoculantes de polvo suspendidos en líquido (usualmente agua). La suspensión es aplicada directamente a los surcos, o alternativamente las semillas o plántulas son inmersas en una suspensión poco antes de su siembra o trasplante. Nandakumar *et al.* (2001) lograron reducir la incidencia del añublo de la vaina (sheat blight) de arroz mediante la inmersión de plántulas de arroz por dos horas en una suspensión de talco de *Pseudomonas fluorescens* (20 g/l).
- c) *Granular*. Estos inoculantes se aplican directamente en los surcos junto con las semillas. El tamaño de las partículas fluctúa entre 0.35 y 1.18 mm. Los inoculantes basados en *Rhizobium* se emplean a razón de 5 a 30 kg/ha. Las perlas de alginato son otra forma sintética de inoculantes granulares; el tamaño de partícula de esta presentación puede variar

entre 1 y 3 mm de diámetro. El soporte empleado en algunas formulaciones de micorrizas puede ser clasificado como granular; de esta presentación se recomiendan dosis 1 a 2 kg de micorriza por ha en función de la cantidad del inóculo efectivo contenido.

d) *Líquida*. Estos inoculantes emplean caldos de cultivo o formulaciones líquidas basadas principalmente en agua, pero también en aceites minerales u orgánicos. Las semillas o las plántulas son inmersas en el inoculante (o asperjadas mediante una mochila de aspersión) antes de la siembra o trasplante. Después de su secado, las semillas o las plántulas son sembradas directamente en los surcos. Para el biocontrol de patógenos, los inoculantes pueden ser asperjados con una mochila fumigadora sobre el follaje de las plantas ya establecidas. Alternativamente, la suspensión microbiana puede ser aplicada directamente en los surcos o en las semillas al momento de la siembra (por ejemplo, en el cultivo de papa). Por su método de fabricación, los inoculantes líquidos son perfectamente estériles y muestran una supervivencia superior a un año si los envases son conservados a temperaturas próximas a los 4°C. Estos biofertilizantes son fáciles de inocular e ideales para ser utilizados en cultivos en los que se puedan aplicar a través de los sistemas de riego o aspersión. Las recomendaciones de aplicación de esta presentación varían en función de la concentración y la efectividad de los microorganismos empleados. En Cuba, se recomendaban dosis de 20 l por hectárea de *Azotobacter*, pero actualmente se usan solamente 2 litros de soluciones más concentradas de esta bacteria.

d) *Geles*. Para la elaboración de esta presentación se utilizan algunos polímeros derivados de la celulosa que facilitan su concentrado, envasado y manejo. Estos geles son disueltos posteriormente en agua para su aspersión a las plantas.

En el caso de formulaciones sólidas, la fase de deshidratación es la más crítica, especialmente para bacterias que no forman esporas. La cantidad y efectividad

de los microorganismos en el producto final formulado es afectada por diferentes factores entre los que se encuentran la genética y fisiología de los propios microorganismos, la composición del medio utilizado para su multiplicación (Schisler y Slininger, 1997), la fase de crecimiento considerada para la cosecha del microorganismo, el material utilizado como acarreador (naturaleza, tamaño de partículas y presencia de microorganismos contaminantes u otros factores inhibitorios del crecimiento o viabilidad de la bacteria) y la tecnología empleada para el secado y preservación de las bacterias (adición de nutrientes y conservadores) en los sustratos. Por ejemplo, se sabe que la adición de 0.72 M de sacarosa al medio King's B permite incrementar la población bacteriana y viabilidad de *Pseudomonas fluorescens* (Caesar y Burr, 1991).

Las materias primas utilizadas en la mayoría de los acarreadores comerciales son baratas y naturalmente abundantes. Se pueden emplear sustratos orgánicos o inorgánicos, por ejemplo turba, césped, talco, lignita, vermiculita, zeolita o alginato. Para bacterias promotoras de crecimiento comúnmente se emplean como acarreadores extracto de algas marinas (*Ascophyllum nodosum*) o yuca (*Yucca schidigera*) y turba finamente molida con carbonato de calcio para neutralizar la acidez de este sustrato. La turba es un acarreador ideal ya que aporta nutrientes a los microorganismos y posee una gran superficie específica, así como un alto poder de retención de humedad y capacidad de amortiguamiento, lo que proporciona a los microorganismos protección ante condiciones ambientales adversas. Sin embargo, la turba es extremadamente difícil de desinfectar y su proceso de esterilización puede causar la liberación de compuestos tóxicos a los microorganismos. Por esta razón se admite cierto grado de contaminación en la formulación de biofertilizantes que emplean turba como acarreador. Por otro lado, la turba posee una composición orgánica compleja lo que genera una gran variabilidad en su constitución de modo tal que algunos materiales de este tipo pueden incluso resultar tóxicos para algunos cultivos (Bashan *et al.*, 2007). También se pueden emplear medios de cultivo líquidos, sin embargo, la vida de anaquel de una presentación líquida suele ser más corta que una sólida.

Adicionalmente a las formulaciones ya mencionadas, los biofertilizantes pueden ser integrados como recubrimientos en las semillas comerciales o encapsulados, aunque los limitados tiempos de viabilidad de algunos microorganismos podrían limitar la consideración de estas alternativas, particularmente en las bacterias.

El objetivo de la encapsulación de microorganismos es el de inmovilizar o atrapar células microbianas benéficas en una matriz. La formulación matriz-microorganismo puede ser fermentada posteriormente en un medio de crecimiento óptimo para incrementar la carga microbiana. En la encapsulación, se emplean micropartículas (50 a 200 μm) o macropartículas (2-4 mm) para inmovilizar los microorganismos en distintos polímeros que incluyen alginato, poliacrilamida, agar, agarosa y k-carragenina, entre otros (Bashan *et al.*, 2007). Entre estos materiales, el alginato se posiciona como el polímero con mayor potencial para la encapsulación de bacterias, aunque también se ha utilizado para la formulación de micorrizas y hongos de biocontrol como *Trichoderma* y *Gliocladium* (Ganry *et al.*, 1982; Marx y Kennedy, 1982; Lewis y Papavizas, 1985; Lewis y Papavizas, 1987). Algunas de las principales ventajas del empleo de alginato son su inocuidad, biodegradabilidad y capacidad de dosificación de los microorganismos en el suelo (Bashan *et al.*, 2002), así como el mantenimiento de una elevada viabilidad de los microorganismos en el tiempo (hasta 14 años; Bashan, 1998). A pesar de todas las ventajas mencionadas del alginato, se requiere una valoración de sus beneficios y costos para que pueda ser utilizado extensivamente en la industria de los biofertilizantes (Bashan *et al.*, 2007).

De acuerdo con Bashan (1998) los factores que afectan la formulación de un buen inoculante incluyen:

- *Características químicas y físicas.* Además de poseer una uniformidad química y física, los soportes de los inoculantes deben ser casi estériles o fácilmente esterilizables. En este punto es importante considerar que el empleo de un acarreador estéril puede incrementar los costos de producción de 5 a 10 veces (Smith, 1995). La calidad del acarreador debe

ser consistente, tener alta capacidad de retención de agua y debe asegurar una retención máxima de microorganismos.

- *Cualidades de fabricación.* El acarreador debe ser de fácil manejo para la industria, permitiendo la adición de nutrientes y otros aditivos, así como un fácil ajuste del pH. Además, debe poseer un costo razonable y una alta disponibilidad en el mercado.
- *Cualidades de manejo para el agricultor.* Un buen inoculante debe ser de fácil manejo y aplicación (la principal preocupación del productor), que proporcione una liberación rápida y controlada del microorganismo en el suelo y que pueda ser aplicado con maquinaria agrícola estándar. Su almacenamiento debe ser realizado preferentemente a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. El tamaño de las partículas del acarreador debe permitir su fácil adherencia a la semilla o su solubilización en agua, sin que ocasionen un bloqueo de las sembradoras o los sistemas de riego.
- *Cualidades ambientales.* El inoculante no debe ser tóxico, debe ser biodegradable y no contaminante, y presentar un riesgo mínimo de dispersión en la atmósfera o aguas profundas.
- *Cualidades de almacenamiento.* El inoculante debe tener suficiente vida de anaquel (uno o dos años a temperatura ambiente muchas veces es necesario para su aceptación en los sistemas de producción agrícola).

Para el caso de las micorrizas también existe una amplia gama de materiales que pueden ser utilizados como acarreadores (Backhaus y Feldmann, 1996; Jarstfer y Sylvia, 1994). La asociación de las micorrizas con la planta hospedera se mantiene hasta que el hongo completa su ciclo de vida con la formación de esporas maduras y otros tipos de propágulos infectivos en el suelo. La naturaleza y propiedades de los sustratos que se utilizan para la producción de inoculantes micorrízicos deben considerar no solamente la fisiología de las plantas hospederas, sino también la de los hongos micorrízicos, *i.e.*, se requiere optimizar el crecimiento tanto de las plantas como

el de los hongos. Asimismo, es importante considerar el tamaño de las partículas del sustrato a utilizar para la producción de las micorrizas, ya que un alto contenido de arena resultará en un mayor daño a los equipos de molido.

La producción de micorrizas usando arcillas expandibles permite obtener una mayor cantidad de propágulos (micelio, esporas y raíces colonizadas) de estos hongos, así como mantener el inoculante viable durante periodos de almacenamiento más largos (hasta cinco años), incluso a temperatura ambiente (Grundwaldt y Dehne, 1989). En cualquier caso, es necesario el seguimiento de buenas prácticas para el cultivo de las plantas hospederas, ya que el inóculo debe estar libre de microorganismos fitopatógenos. La aplicación de soluciones nutritivas es muy común para la producción de micorrizas con plantas trampa. Por ejemplo, el uso de la solución nutritiva de Hoagland (20 a 50%) ha permitido la producción de raíces con un mayor porcentaje de colonización y un mayor número de esporas (Chen *et al.*, 2003).

Si bien los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son comúnmente producidos en invernaderos especiales, existe la posibilidad de multiplicar estos microorganismos en laboratorio bajo condiciones estériles utilizando el método desarrollado por Mosse y Hepper en 1975 y que consiste en usar raíces transformadas con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* (conocidas como "hairy roots" o raíces peludas), las cuales son consideradas "inmortales" porque pueden ser propagadas de manera indefinida en contenedores estériles (Fig. 1). Las raíces peludas son infectadas con esporas estériles de hongos MA para el establecimiento de cultivos monoaxénicos que típicamente producen más de 5000 esporas y abundante micelio en una caja de Petri de 9 cm de diámetro (Becard y Fortin, 1988; Diop *et al.*, 1992).

En términos generales, la presentación sólida es la más empleada para la formulación de inoculante fúngicos. Las formulaciones líquida y de gel también pueden ser empleadas en micorrizas siempre y cuando sea posible acceder directamente al sistema radical de las plantas, como en el caso de los trasplantes, donde las plántulas o esquejes son sumergidos en una solución líquida o gel, previamente a su siembra.

Actualmente se comercializan presentaciones líquidas de micorrizas para su aplicación a plantas adultas ya establecidas. Sin embargo, esta presentación no es funcional, ya que las esporas de los hongos tienden a flotar en agua, dificultando la aspersión uniforme de estos propágulos en el cultivo. Además, es difícil que los propágulos del hongo (esporas o raicillas infectadas) puedan atravesar el suelo para alcanzar el sistema radical de las plantas para establecer la simbiosis. Para solventar este problema se han desarrollado métodos para la aplicación de micorrizas en plantas ya establecidas como el sistema "Terravention", el cual inyecta a presión inoculantes fúngicos en el suelo mediante el impulso de gas de nitrógeno presurizado (Ardle, 2003). Alternativamente, el uso de palas u otros implementos para crear trincheras alrededor de las plantas y posteriormente aplicar las micorrizas puede ser viable siempre y cuando la relación beneficio-costos sea favorable.



Figura 1. Producción *in vitro* de micorrizas empleando cultivos de 'raíces peludas' (hairy roots) obtenidas mediante la transformación genética de zanahoria y tabaco. a) Inducción de raíces peludas en zanahoria, b) Inducción de raíces en tabaco, c) Producción de micorrizas en cultivo de raíces peludas de tabaco y d) Producción de micorrizas en cultivo de raíces peludas de zanahoria.

Además de poder incluir diversos microorganismos, la formulación de los biofertilizantes también puede incorporar otros aditivos entre los que se encuentran nutrientes, conservadores, surfactantes, adyuvantes solubles en agua, aceites, adherentes y emulsiones. La adición de estos compuestos incrementa la supervivencia de los microorganismos durante el proceso de formulación y mejora su capacidad de colonización y funcionamiento en campo (Connick *et al.*, 1991; Barnes y Moore, 1997; Green *et al.*, 1998).

La formulación de los biofertilizantes también puede incluir otros elementos orgánicos como quitosano o quitosán (Benhamou y Thériault, 1992; Choong-Min *et al.*, 2007) y/o algunos compuestos químicos como benzothiadiazole (Görlach *et al.*, 1996) para potenciar la resistencia sistémica inducida (o ISR por sus siglas en inglés) de las plantas a los patógenos. En el caso de perlas de alginato, la adición de arcilla y leche desnatada durante la formulación incrementa significativamente la supervivencia de las bacterias (Bashan, 1998).

Debido a que las bacterias son particularmente sensibles al calor, la desecación y la luz, los biofertilizantes basados en estos microorganismos deben conservarse a temperaturas bajas (4-9°C, pero nunca en congelación). El uso de soportes estériles permite el transporte de los biofertilizantes en condiciones no refrigeradas, aunque en estas circunstancias es necesario proteger los envases del calor y el sol. La fecha de vencimiento debe ser considerada, ya que normalmente la viabilidad de los inoculantes microbianos decrece rápidamente con el tiempo, particularmente en aquellos formulados con bacterias.

En términos generales, los inoculantes basados en bacterias son más versátiles en cuanto a sus posibilidades de aplicación que aquellos que emplean hongos en su formulación (por ejemplo, micorrizas). Los biofertilizantes pueden ser aplicados de distintas formas siendo algunas de las más comunes:

- *Tratamiento a la semilla.* Se emplean compuestos derivados de la celulosa o azúcares para adherir los microorganismos a la semilla. Es el método más comúnmente empleado para la inoculación de micorrizas.
- *Biopriming.* Consiste en la inmersión de la semilla en un biofertilizante líquido por varias horas hasta alcanzar una humedad de 20-30%. El proceso de hidratación en maíz es comúnmente llevado a cabo a 23°C durante 20 a 24 hrs y debe ser controlado a través del empleo de vermiculita, toallas de papel húmedas o de cualquier otro material capaz de controlar la entrada de humedad a las semillas. Las semillas deben ser removidas de los sistemas de hidratación antes de la emergencia de la radícula (Callan *et al.*, 1990). Este método puede combinarse con el "osmopriming" (Moeinzadeh *et al.*, 2010), si los microorganismos son capaces de tolerar las tensiones osmóticas requeridas para llevar a cabo este proceso (Ghiyasi *et al.*, 2008), o el "priming de tambor" (drum priming) si las cepas son compatibles con los pesticidas y otros productos usados comúnmente por los productores durante el proceso de hidratación de las semillas. El 'biopriming' resulta en una emergencia más rápida y uniforme de las plántulas y presenta ventajas sobre el empleo de semillas recubiertas con los microorganismos (Mathre *et al.*, 1994). Aunque esta técnica fue originalmente desarrollada para biofertilizantes bacterianos, actualmente existen protocolos para hongos como *Trichoderma* (Nayaka *et al.*, 2010). Mediante el 'biopriming' es posible incrementar en al menos 10 veces la carga bacteriana presente en la espermósfera y la rizósfera de las plantas inoculadas con los métodos tradicionales. Esta mejoría en la cantidad de microorganismos resulta en un incremento significativo de la protección a los patógenos de suelo (Callan *et al.*, 1990). Por ejemplo, el empleo de una suspensión conidial (1×10^8 esporas/ml) de *Trichoderma harzianum* durante el 'biopriming' de semillas de maíz redujo considerablemente la incidencia de *Fusarium verticillioides* (Nayaka *et al.*, 2010).
- *Inmersión de plántulas.* En este método las plántulas (o cualquier propágulo empleado en la producción del cultivo) son inmersas en una

solución del inoculante momentos antes de su trasplante al sustrato o siembra en el suelo. Los tiempos de inmersión pueden variar desde 15 minutos a 3 horas y la proporción recomendada comúnmente para las formulaciones es de 20 g por litro (Bharathi *et al.*, 2004; Rini y Sulochana, 2006).

- *Directamente en los surcos.* Este método de aplicación es adecuado para inoculantes líquidos, comúnmente bacterianos, que pueden ser aplicados por aspersion al momento de la siembra de la semilla, aunque también se pueden utilizar algunos biofertilizantes encapsulados.
- *En los sistemas de riego o mochilas agrícolas.* Se emplea para inoculantes microbianos líquidos o solubles en agua que tengan un tamaño de partícula que no obstruya los sistemas de riego. Requiere una cuidadosa calibración de los sistemas de riego o las mochilas para lograr la dosificación adecuada del inoculante.
- *En el sustrato de las charolas de invernadero.* Este método es adecuado para inoculantes que pueden ser mezclados con los sustratos en los que se crecen las plántulas a ser trasplantadas posteriormente al campo o a los recipientes de crecimiento definitivos (macetas o bolsas de plástico). La efectividad de esta forma de aplicación depende de un mezclado uniforme del sustrato con el biofertilizante.
- *En las compostas.* Se aplica con la intención de acelerar la descomposición de las compostas y favorecer el crecimiento de ciertos microorganismos benéficos (por ejemplo, *Trichoderma*) antes de su empleo en los sistemas de producción.
- *Aplicación foliar o a los frutos.* El inoculante, comúnmente bacteriano, es aplicado por aspersion en las hojas de las plantas. La presencia de inoculantes con actividad antipatogénica en los frutos o en las hojas resultará en productos de mejor aspecto y calidad.

Las formas de aplicación de los inoculantes microbianos no son excluyentes y en ocasiones el empleo de más de una forma reforzará su efecto promotor de

crecimiento. Por otro lado, la frecuencia de aplicación de los biofertilizantes dependerá de la base microbiana de los productos, su formulación y el cultivo en cuestión. Asimismo, es preferible poner en contacto al cultivo con el biofertilizante lo más pronto posible, preferentemente desde la siembra de las semillas o establecimiento de las plántulas, a fin de aprovechar todos sus beneficios, particularmente el potenciamiento de los mecanismos de resistencia sistémica a patógenos y la invasión de los espacios físicos de la planta que de otro modo podrían ser aprovechados posteriormente por microorganismos perjudiciales.

Limitaciones del empleo de biofertilizantes

Los resultados obtenidos mediante el empleo de biofertilizantes en la producción agrícola son muy variables, pero en términos generales es posible lograr aumentos en los rendimientos de los cultivos que oscilan del 15 al 50%. Existe una gran diversidad de factores que pueden afectar la interacción de estos microorganismos con las plantas y consecuentemente repercutir en los rendimientos finales obtenidos. Al emplear un biofertilizante deberá tenerse en consideración el cultivo en cuestión, la naturaleza de los biofertilizantes a emplear, el tipo y estatus actual del suelo, así como las condiciones generales de manejo de las tierras y del propio cultivo.

En secciones anteriores de este libro se mencionaron ya algunos ejemplos en los cuales normalmente no se establece la relación mutualista planta-microorganismo, por lo cual deberá tenerse en cuenta la compatibilidad de la especie vegetal y el biofertilizante a utilizar.

Por otro lado deberá considerarse que ciertos microorganismos que actúan bien en un ambiente y cultivo específicos, no necesariamente funcionarán adecuadamente para el mismo cultivo en otro contexto ambiental. Se asume que las micorrizas funcionan mejor en suelos con bajas concentraciones de nutrientes y que la fertilización química, particularmente la fosfatada, reduce su eficiencia.

Durante el ciclo de producción del cultivo, deberá evitarse el empleo de agroquímicos que afecten sus poblaciones o funcionamiento, particularmente fungicidas si se emplean micorrizas, o bactericidas si se utilizan biofertilizantes bacterianos. En semilla tratada con antifúngicos, se han logrado en la práctica mejores resultados duplicando la dosis normal de micorrizas, particularmente en cebada maltera (comunicación personal Dr. Oscar Grageda Cabrera). Actualmente el INIFAP está llevando a cabo un proyecto enfocado precisamente a conocer el efecto de los pesticidas sobre el funcionamiento de los biofertilizantes bacterianos y fúngicos.

Un conocimiento profundo de la biología y la susceptibilidad de los microorganismos a los pesticidas será instrumental para lograr un manejo más adecuado de los biofertilizantes en los cultivos, especialmente en los casos en los cuales sea inevitable el empleo de agroquímicos.

Calidad de los biofertilizantes

La efectividad de los biofertilizantes está ligada fuertemente con la efectividad de las propias cepas, con los procesos de producción, formulación y almacenamiento del producto, y finalmente con la tecnología de aplicación en campo o invernadero (tiempos, dosis y formas de aplicación de los productos biológicos).

Efectividad de las cepas de microorganismos

Algunas de las características importantes en una cepa promotora de crecimiento eficiente incluyen:

- Fuerte promoción del crecimiento de las plantas.
- Antagonismo contra diversos organismos fitopatógenos.
- Capacidad de movimiento.
- Capacidad de sinergismo con otros microorganismos.
- Resistencia a pesticidas.
- Capacidad competitiva.
- Presencia de múltiples mecanismos de promoción de crecimiento.

Es importante definir la actividad que se busca promover a través del uso de un microorganismo determinado, ya que si lo que se desea es, por ejemplo, incrementar o hacer eficiente la tasa de asimilación de nutrientes en las plantas se requerirá de una cepa, o de un consorcio de microorganismos que estimulen este proceso, *i.e.*, organismos fijadores de nitrógeno como *Azoarcus* sp. (Hurek *et al.*, 1994), *Beijerinckia* sp. (Baldani *et al.*, 1997), *Pantoea agglomerans* (Riggs *et al.*, 2001), *Rhizobium* sp. (Yanni *et al.*, 2001), o bien organismos solubilizadores de fosfatos como *Azotobacter circulans* (Kumar y Narula, 1999), *Bacillus circulans* y *Cladosporium herbarum* (Singh y Kapoor, 1999), *Enterobacter agglomerans* (Kim *et al.*, 1998), *Pseudomonas chlororaphis* y *Pseudomonas putida* (Cattelan *et al.*, 1999).

Existen además cepas o variantes de un microorganismo particular que pueden ser más eficientes que otros para llevar a cabo ciertos procesos fisiológicos. Por ejemplo, el empleo de ciertas cepas de *Pseudomonas fluorescens* que se caracterizan por producir niveles más altos de sideróforos, resultará en mayores incrementos en los rendimientos de los cultivos en suelos con baja disponibilidad de hierro. La selección de la cepa o cepas adecuadas para la formulación de un biofertilizante determinará el éxito del producto. Una mala elección de los microorganismos a utilizar conllevará al fracaso de la tecnología propuesta. Se requiere que el biofertilizante de prueba formulado sea evaluado en al menos 15 a 20 localidades bajo diferentes condiciones ambientales para validar el funcionamiento adecuado del producto (Nakkeeran *et al.*, 2006). La selección de una cepa inadecuada para los procesos de producción, formulación y/o comercialización representaría un costoso error en el desarrollo del producto (Schisler y Slininger, 1997). Incluso, una vez establecido el proceso de comercialización, se requiere un adecuado seguimiento de la estabilidad del producto biológico, ya que la capacidad de los microorganismos para promover el crecimiento de las plantas puede ir disminuyendo con el tiempo. Un ejemplo de esta situación es BioCoat™, un producto biológico desarrollado con base en *Pseudomonas fluorescens* para combatir al hongo patógeno *Fusarium* en rábano y que después de varios años de uso tuvo que ser retirado del mercado por mostrar una baja actividad de biocontrol y una considerable reducción de su vida de anaquel (Kempf *et al.*, 1997).

Calidad y tipo de acarreadores

La finalidad de un acarreador es mantener la viabilidad de los microorganismos (Heijnen *et al.*, 1993). Como se mencionó previamente existen grandes diferencias en la capacidad de los soportes usados en la formulación de los biofertilizantes para maximizar la retención de microorganismos y viabilidad a través del tiempo (Cuadro 1).

Algunas características deseables en un soporte incluyen:

- Ausencia de organismos patogénicos o contaminantes en los soportes.
- Contenido de la dosis adecuada y efectiva de microorganismos.
- Tamaño de partículas adecuado al uso que se pretende dar al producto.
- Inclusión de nutrimentos u otros aditivos que prolonguen la viabilidad de los microorganismos. Comúnmente se adiciona un extracto para que la bacteria mantenga sus funciones vitales básicas, ya que éstas disminuyen a un mínimo cuando entran en un estado de latencia en las formulaciones sólidas. Los componentes de los medios de crecimiento pueden incluir triptona, hidrolizado de caseína, extracto de levadura, maltodextrina y diversos azúcares.

Material de empaque confiable

El tipo de empaque dependerá de la presentación del biofertilizante, líquida o sólida. Los primeros biofertilizantes se empacaban en botellas de cristal, aunque actualmente se usan bolsas o recipientes de plástico para facilitar la manipulación y el intercambio de gases, así como su empacado al calor. Para el empacado de biofertilizantes en presentación sólida comúnmente se emplean bolsas resistentes, pero manejables, de polietileno de baja o alta densidad (o polipropileno), de dimensiones 8 x 16 cm o 30 x 40 cm y oscuras u opacas para evitar que los microorganismo sean dañados por la luz. Para las presentaciones líquidas se usan recipientes de plástico resistente, también opaco u oscuro, y de un tamaño óptimo para facilitar su manejo y almacenamiento.

En México, el etiquetado de los recipientes deberá ajustarse a la NOM-182-SSA1-1998 (Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, 2000) y deberá contener información básica que incluye lote, fecha de elaboración, contenido neto, caducidad, género y especie del o los microorganismos utilizados en la formulación del producto (y si es que estos han sido modificados genéticamente), registro sanitario, cultivos recomendados para el empleo del inoculante, dosis e instrucciones para su empleo, forma de acción de los microorganismos, beneficios obtenidos mediante el uso del producto y cantidad de microorganismos en UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo o mililitro que den lugar al desarrollo de colonias en un lapso de 72 horas a 37°C en medios específicos.

Calidad adhesiva del biofertilizante

En la formulación del biofertilizante deberá considerarse la utilización de un agente adhesivo que favorezca la unión de los microorganismos a la semilla, suelo o superficie de la planta y de este modo aumentar los porcentajes de colonización. Algunos de los más empleados son sacarosa (azúcar de mesa), polietilenglicol, metilcelulosa o carboximetil celulosa.

Forma de aplicación

Las bacterias promotoras de crecimiento son aplicadas a través de varios métodos que incluyen la aplicación a la semilla, al suelo, a las hojas, a las plántulas o a los rizomas. Las micorrizas suelen ser inoculadas mediante su adhesión a la semilla. El empleo de diferentes métodos de inoculación, o la realización de aplicaciones de refuerzo, pueden resultar en mayores rendimientos, sin embargo, un análisis beneficio-costos determinará la mejor estrategia de aplicación y dosificación de estos productos.

Condiciones de almacenamiento del producto

Se refiere a las condiciones ambientales y técnicas óptimas para el almacenamiento de los biofertilizantes. Normalmente, el almacenamiento a 20-25°C se considera satisfactorio, mientras que temperaturas cercanas al punto

de congelación pueden ser dañinas. Los inoculantes bacterianos se pueden almacenar entre 4 y 20°C durante 6 meses o más, pero pueden perder su efectividad en pocas horas a 40°C o temperaturas superiores. Las micorrizas, por su parte, pueden conservar su viabilidad por varios años cuando se almacenan a 25°C.

Población efectiva mínima de microorganismos

Se refiere a la cantidad de microorganismo necesaria para que un biofertilizante ejerza un efecto significativo sobre el crecimiento o sanidad de las plantas (Cuadro 2). Depende tanto de la cantidad total del biofertilizante a ser aplicada como de la concentración del producto.

La variable más comúnmente utilizada para la determinación de la concentración de los biofertilizantes bacterianos es el número de unidades formadoras de colonias o UFC. La mayoría de los productos comerciales basados en bacterias refieren en su etiquetado valores de fluctúan entre 1.6 a 2×10^7 UFC/g, concentraciones que se asumen aceptables en un biofertilizante. Particularmente en el caso de *Azospirillum* se recomiendan concentraciones que oscilan entre 1×10^9 a 1×10^{11} UFC por mililitro o gramo de biofertilizante formulado (Okon y Labandera-González, 1994).

En este punto, es importante mencionar que se ha enfatizado más en la concentración de los microorganismos en el producto final formulado que en la cantidad total recomendada de microorganismos a aplicar en una superficie o cantidad de plantas determinada.

Ciertamente la cantidad efectiva de microorganismos en los biofertilizantes (*i.e.*, las cargas microbianas necesarias para que un producto ejerza de manera significativa un efecto positivo sobre el crecimiento y rendimiento de los cultivos) dependerá tanto de la eficiencia de la cepa o cepas como de la concentración de los microorganismos en el producto final formulado y las dosis de aplicación recomendadas.

En Cuba, se han logrado formular biofertilizantes basados en la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter* que contienen concentraciones de hasta 10^{14} unidades formadoras de colonias (UFC) por ml, lo cual ha permitido reducir considerablemente la cantidad de producto a aplicar (Dibut y Martínez, 2004). Anteriormente, cuando se tenían formulaciones con concentraciones de 1×10^8 UFC por ml, las dosis recomendadas a aplicar de esta bacteria eran de 20 litros por hectárea, con lo cual se aplicaban a los cultivos un total teórico de 2,000,000,000,000 (o 2×10^{12}) UFC por hectárea. Empleando las formulaciones actuales de 1×10^{14} UFC por ml, las recomendaciones de aplicación son de solamente 2 litros por hectárea. Con estas nuevas recomendaciones los productores cubanos pueden aplicar una cantidad total de 200,000,000,000,000,000 (o 2×10^{17}) UFC de *Azobacter* por hectárea. En otras palabras aplican 100,000 veces más de bacteria con una cantidad de producto diez veces menor.

En Brasil, la normatividad indica que las empresas deben formular los biofertilizantes de modo que posean una concentración mínima de 1×10^9 células por gramo o ml de producto a la fecha de vencimiento (al menos 6 meses). En el caso de soya los productos deben proveer una cantidad mínima de 600,000 células por semilla (Hungria y Campo, 2007). Asumiendo una densidad de siembra de soya de 450,000 plantas por hectárea, la cantidad mínima de biofertilizante recomendada por hectárea para llenar este requerimiento debe ser de al menos 300 ml (o gramos) de producto con la concentración de anaquel de 1×10^9 células por gramo o ml. Estas cifras son teóricas ya que la mezcla del producto en agua para llevar a cabo el proceso de inoculación y el manejo posterior de la semilla ya inoculada (exposición a la luz o temperaturas inadecuadas) puede reducir la cantidad de células microbianas por semilla.

Cuadro 2. Cargas microbianas experimentales empleadas en algunos cultivos.

Recomendación	Cultivo	Bacteria	Referencia
0.4 ml por planta de una suspensión (1×10^7 UFC/ml)	Arroz	<i>Azospirillum brasilense</i>	Curá <i>et al.</i> (2005)
1×10^6 UFC/semilla	Cebada	<i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> y <i>P. fluorescens</i>	Germida y Walley (1996)
10 días después de la siembra cada plántula se inocula con 5 ml de una suspensión bacteriana (2×10^9 UFC/ml)	Lechuga	30 diferentes cepas de rizobacterias (<i>Azospirillum</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsiella</i>)	Díaz-Vargas <i>et al.</i> (2001)
1×10^4 UFC/semilla. 50 g de semilla se mezclan con 0.5 g de inoculante a una concentración de 2.5×10^9 UFC/g.	Lenteja negra	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sarma <i>et al.</i> (2009)
Mantener 1.5 g de semilla por 1 hora en 10 ml de una suspensión (1×10^8 UFC/ml).	Maíz	<i>Enterobacter sp.</i> , <i>Serratia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>	Chabot <i>et al.</i> (1996)
La semilla se inocula con una suspensión (1×10^8 UFC/ml) mezclada con 1% de carboximetilcelulosa	Pino	<i>Bacillus subtilis</i>	Singh <i>et al.</i> (2008)

Cuadro 2. Cont.

1 x 10 ⁶ UFC/semilla. La cantidad de inoculante sólido es equivalente al peso de la semilla.	Soya	<i>Rhizobium Bradyrhizobium</i>	Albareda et al. (2008)
Se aplica 1 ml de suspensión bacteriana (1 x 10 ⁷ UFC/ml) por semilla al momento de la siembra.	Tabaco	<i>Serratia marcescens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus pumilus</i> SE34 <i>Bacillus pumilus</i> T4 <i>Bacillus pasteurii</i>	Zhang et al. (2004)
Después de la germinación se utiliza 1 ml de inoculante (1 x 10 ⁸ UFC/ml) por plántula	Tomate, pepino	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Chryseobacterium balustinum</i>	Domenech et al. (2006)
Se aplican 2.5 x 10 ⁷ UFC/semilla. El inóculo está contenido en 200 microcápsulas de alginato que se mezclan manualmente con la semilla.	Tomate	<i>Azospirillum brasilense</i>	Bashan et al. (2002)
5 ml de una solución 5 x 10 ⁸ UFC/ml para 100 semillas	Tomate	<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	Anith et al. (2004)

Regulación y control de la calidad de los biofertilizantes en México

La reglamentación oficial del uso de biofertilizantes implica la creación de normas que rijan su registro, el establecimiento de estándares de calidad y el monitoreo de la calidad de estos productos en las fábricas y en los anaqueles de los distribuidores.

Para el caso de micorrizas, la efectividad de los productos comerciales basados en estos hongos depende del número de esporas, fragmentos de raíz colonizados y las hifas del hongo presentes en el inoculante. Aunque la infectividad de los fragmentos de raíz colonizados por las micorrizas puede ser mayor que la de las esporas (Sieverding, 1991), comúnmente se utiliza como criterio de calidad el número de esporas por 100 gramos de suelo, debido a la dificultad para determinar los fragmentos de raíz o hifas en los inoculantes. Además, al paso del tiempo las hifas pierden su capacidad infectiva más rápidamente que las esporas. Valores entre 20 y 60 esporas por gramo de suelo generalmente suelen ser considerados como aceptables. Otras pruebas complementarias como el grado de infección y de promoción de crecimiento bajo condiciones de invernadero pueden aportar elementos adicionales para la evaluación de la calidad y efectividad de las cepas de micorriza. Finalmente, las dosis efectivas de los biofertilizantes deben ser establecidas mediante pruebas de campo.

Como ejemplo de normatividad de biofertilizantes bacterianos, se muestra a continuación los parámetros de calidad considerados por la India (Indian Standards), uno de los países con mayor tradición en el uso biofertilizantes, y que son regulados por su Ministerio de Agricultura (http://ncof.dacnet.nic.in/quality_standards.htm):

Normatividad para Rhizobium (IS: 8268-2001):

- Conteo de células 10^7 /g de sustrato hasta seis meses después de su fabricación.
- Ausencia de contaminación a una dilución de 10^5 .
- pH 6.5-7.5.
- Tamaño de partícula del sustrato sólido entre 150-212 micrómetros.

Normatividad para Azotobacter (IS: 9138-2002):

- Conteo de células 10^7 /g de sustrato hasta seis meses después de su elaboración.
- Ausencia de contaminación a una dilución de 10^5 .
- pH 6.4-7.5.
- Tamaño de partícula del sustrato sólido entre 150-212 micrómetros.

Normatividad para Azospirillum (IS: 14806:2000):

- Conteo de células 10^7 /g de sustrato.
- Ausencia de contaminación a una dilución de 10^5 .
- Presencia de una película blanca.
- pH 6.4-7.5.
- Tamaño de partícula del sustrato sólido de 100 micrómetros.

Normatividad para Bacterias Solubilizadoras de Fosfatos (IS: 14807:2000):

- Conteo de células 10^7 /g de sustrato.
- Ausencia de contaminación a una dilución de 10^5 .
- Zona de solubilización mínima de 10 mm.
- pH 6.5-7.5.
- Tamaño de partícula del sustrato sólido de 100 micrómetros.

La regulación de la calidad de los biofertilizantes es un tópico de primordial importancia para países en los cuales no existen a la fecha los estándares y mecanismos de monitoreo oficiales que permitan controlar la calidad de estos productos biológicos. Aunque en algunos países como Estados Unidos o Inglaterra, el control de la calidad de los biofertilizantes es dejado a merced de las fuerzas del mercado y a la discreción de los fabricantes (Smith, 1995), esto tiene sus peligros, particularmente en países como el nuestro, donde la incipiente apertura de los productores a la tecnología de los biofertilizantes podría verse minada por productos de mala calidad.

Las recomendaciones de aplicación de los biofertilizantes son muy variables y la presión que tienen las compañías en México por tener precios competitivos (particularmente ante empresas que no cuentan con registro sanitario) ha hecho que algunas reduzcan sustancialmente las

recomendaciones de aplicación de sus productos, *i.e.*, la dosis original del producto es recomendada para su aplicación en una superficie mayor o para ser empleada para más de una aplicación en el mismo terreno. Esta situación es un reflejo de la situación que vivieron países como Brasil en los inicios de la comercialización de sus biofertilizantes, pero que a través del tiempo se transformó para conformar procesos de certificación y fiscalización más estrictos y eficientes, de tal modo que actualmente hasta el 91% de sus productos biológicos se ajustan a las normas oficiales de calidad establecidas (Hungria y Campo, 2007)

Aunque en la mayoría de los países que actualmente emplean biofertilizantes en sus sistemas de producción agrícola se cuenta con una reglamentación oficial para el registro de biofertilizantes, existen deficiencias, omisiones o ambigüedades que dificultan su regulación.

En países Latinoamericanos como Bolivia, Venezuela, Perú y México el establecimiento de estándares y el monitoreo de la calidad de estos productos en las fábricas y los anaqueles de los distribuidores representa un grave problema (Abela y Valenzuela, 2007; Caballero-Mellado, 2005; Cuenca, 2007; Zúñiga, 2007), mientras que Colombia, a pesar de poseer una normatividad de calidad, adolece de un proceso de monitoreo adecuado de biofertilizantes (Sarmiento, 2007).

Dentro de los países más avanzados en cuanto a la legislación y reglamentación del uso de biofertilizantes se encuentran Brasil, Uruguay, Canadá, Argentina, Cuba, Francia y Australia (Bashan, 1998; Corvalán *et al.*, 2007; Hungria y Campo, 2007; Labandera, 2007). Sin embargo, aún en estos países existen ciertas lagunas en la legislación que requieren ser solventadas. Por ejemplo, Argentina cuenta con una normatividad oficial para controlar la calidad de los biofertilizantes basados en rizobios, pero carece de una reglamentación que rija la calidad de biofertilizantes basados en otros microorganismos como *Pseudomonas*, *Bacillus* o micorrizas (Corvalán *et al.*, 2007); esta situación que no es de extrañar si se considera que los primeros biofertilizantes en ser comercializados fueron aquellos que empleaban como base rizobios. Argentina también carece de reglamentación en cuanto a los

niveles permisibles de contaminación en los biofertilizantes o el origen de las cepas empleadas en la formulación de estos productos (Corvalán *et al.*, 2007). La carencia de estas normas crea un vacío muy grande es su normatividad si se toma en cuenta que el nivel requerido de bacterias en un cultivo varía de especie a especie y no puede, por lo tanto, ser establecido como regla general, además de que la presencia de contaminantes en los biofertilizantes puede reducir considerablemente su efectividad (Bashan, 1998).

En este contexto es importante mencionar que aunque las recomendaciones de aplicación (cantidad de biofertilizante por superficie o número de plantas y periodicidad de aplicación) pueden variar, finalmente las pruebas de efectividad biológica en campo de los biofertilizantes son los instrumentos más robustos para determinar las dosis efectivas de estos productos.

En México, el registro de biofertilizantes es actualmente controlado por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), la cual define un inoculante como un producto elaborado a base de microorganismos que se aplican al suelo o a la semilla con el fin de aprovechar los nutrimentos contenidos en asociación con el vegetal o su rizósfera (Norma Oficial Mexicana NOM-182-SSA1-1998, Etiquetado de Nutrientes Vegetales; Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, 2000). El registro de inoculantes ante COFEPRIS precisa, entre otros requisitos, de la realización de pruebas de efectividad biológica, el análisis de laboratorio del producto a comercializar y la presentación de una licencia sanitaria por el laboratorio que formulará el biofertilizante.

Ante el resurgimiento de los biofertilizantes como una alternativa viable para incrementar la productividad agrícola y la consecuente aparición en México de un gran número de productos que no reúnen los requisitos mínimos de calidad, el Gobierno Federal de México, a través de SAGARPA e INIFAP, ha emprendido una iniciativa formal para reglamentar y fiscalizar la fabricación de biofertilizantes en México; se espera tener la primer propuesta estructurada para el presente año.

Actualmente existe un interés común entre diversos países de impulsar el empleo de los biofertilizantes para lo cual están implementando o mejorando sus instrumentos normativos y de fiscalización. Las inquietudes de los países Latinoamericanos en torno a la problemática de los biofertilizantes planteada anteriormente impulsó la creación en el año de 2003 de la Red Iberoamericana de Fertilizantes Biológicos para la Agricultura y el Medio Ambiente (BIOFAG), esencialmente bajo los objetivos de facilitar la integración de conocimientos y tecnologías entre diversas áreas de la ciencia para impulsar del empleo de biofertilizantes en Iberoamérica. En esta red están actualmente adscritos cerca de 60 grupos de investigación y empresas productoras de inoculantes, pertenecientes a 12 países (Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Chile, Cuba, España, México, Perú, Portugal, Uruguay, Venezuela). Una de sus últimas actividades fue el desarrollo en el año de 2010 del "Taller Iberoamericano para la Creación de Redes Nacionales de Control de Calidad de Inoculantes" que tuvo por objetivo transmitir las herramientas necesarias para la generación de redes de control de calidad y exteriorizar el modelo de control de calidad de inoculantes en todos los países Iberoamericanos miembros de la RED-BIOFAG.

Se espera que este tipo de iniciativas sean los interruptores que detonen la utilización y el mejor aprovechamiento de los biofertilizantes en estos países, en beneficio de su industria, agricultura, economía y la ecología de sus entornos.

Bibliografía Citada

- Abela, J.E. y Valenzuela, R. 2007. Situación de los Cultivos Leguminosos y los Biofertilizantes en Bolivia. *In: Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial.* Izaguirre-Mayoral, M.L. Labandera, C. y Sanjuan, J. (eds). Denad Internacional, S.A. Montevideo, Uruguay.
- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Camacho, M. and Temprano, F.J. 2008. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. *Soil Biol. Biochem.* 40:2771-2779.
- Amer, G.A. and Utkhede, R.S. 2000. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Can. J. Microbiol.* 46:809-816.
- Anith, K.N., Momol, M.T., Kloepper, J.W., Marois, J.J., Olson, S.M. and Jones, J.B. 2004. Efficacy of plant growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and soil amendment for integrated management of bacterial wilt on tomato. *Plant Dis.* 88:669-673.
- Ardle, J. 2003. Underground partnership. *The Garden:* 859-861.
- Backhaus, G.F. and Feldmann, F. 1996. Mykorrhiza in gärtnerischen Substraten-endlich einsatzreif. *Taspo Gartenbaumagazin* 4:12-14.
- Baldani, J.I., Caruso, L., Baldani, V., Goi, S.R. and Döbereiner, J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* 29:911-922.
- Barnes, S. and Moore, D. 1997. The effect of fatty, organic, or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycol. Res.* 10:662-666.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16:729-770.
- Bashan, Y., de Bashan, L.E., Hernández, J.P., Puente, M.E., Bacilio, M. and Leyva, L.A. 2007. Inoculantes microbianos sintéticos: ¿son el futuro?. *In: La Biofertilización como Tecnología Sostenible.* Díaz-Franco, A. y Mayek-Pérez, N. (eds). Plaza y Valdés. México.
- Bashan, Y., Hernandez, J.P., Leyva, L.A. and Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth promoting bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 35:359-68.

- Bécard, G. and Fortin, J.A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
- Benhamou, N. and Thériault, G. 1992. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41:33-52.
- Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harish, S., Ramanathan, A. and Samiyappan, R. 2004. Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Protec.* 23:835-843.
- Bora, T., Ozaktan, H., Gore, E. and Aslan, E. 2004. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. *J. Phytopathol.* 152:471-475.
- Caballero-Mellado, J. 2005. Legislación y normativa sobre comercialización y control de calidad de inoculantes para la agricultura en México. *In: I Taller Iberoamericano sobre normativa y control de calidad de inoculantes para la agricultura.* CYTED/BIOFAG/Ministerio, Salvador, Bahía, Brasil.
- Caesar, A.J. and Burr, T.J. 1991. Effect of conditioning, betaine and sucrose on survival of rhizobacteria in powder formulations. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:168-172.
- Callan, N.W., Mathre, D.E. and Miller, J.B., 1990. Bio-priming seed treatment for biological control of *Pythium ultimum* pre emergence damping off in sh2 sweet corn. *Plant Dis.* 74:368-372.
- Cattelan, A.J., Hartel, P.G. and Fuhrmann, J.J. 1999. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63:1670-1680.
- Chabot, R., Antoun, H. and Cescas, M.P. 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli*. *Plant Soil* 184:311-321.
- Chen, N., Wang, Y., Li, X., Zhang, M., Xing, L., Feng, G. and Ni, X. 2003. Effects of nutrient solution strength on development of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycosistem* 22:394-401.

- Choong-Min, R., Murphy, J.F., Reddy, M.S. and Kloepper, J.W. 2007. A Two-strain mixture of rhizobacteria elicits induction of systemic resistance against *Pseudomonas syringae* and cucumber mosaic virus coupled to promotion of plant growth on *Arabidopsis thaliana*. J. Microbiol. Biotechnol. 17:280-286.
- Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario. 2000. Norma Oficial Mexicana NOM-182-SSA1-1998, Etiquetado de Nutrientes Vegetales. www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/182ssa18.html
- Connick, W., Daigle, D. and Quimby, P. 1991. An improved invert emulsion with high water retention for mycoherbicide delivery. Weed Technol. 5:442-444.
- Corvalán, D., Dubois, M., Medana, M., Peticari, A., Racca, R. y Ruiz, O.A. 2007. Situación actual y perspectivas del mercado de semillas y biofertilizantes en la Argentina. *In: Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial.* Izaguirre-Mayoral, M.L. Labandera, C. y Sanjuan, J. (eds). Denad Internacional, S.A. Montevideo, Uruguay.
- Cuenca, G. 2007. Situación de los biofertilizantes en base a micorrizas en Venezuela. *In: Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial.* Izaguirre-Mayoral, M.L. Labandera, C. y Sanjuan, J. (eds). Denad Internacional, S.A. Montevideo, Uruguay.
- Curá, J.A., Rinaudo, C.M., Gaetano, A.M. y Ghiglione, H. 2005. Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en cultivo de arroz durante las primeras etapas del desarrollo. Rev. Foro Arroceros Lat. 11:10-13.
- Dandurand, L.M., Morra, M.J., Chaverra, M.H. and Orser, C.S. 1994. Survival of *Pseudomonas* spp in air dried mineral powders. Soil. Biol. Biochem. 26: 1423-1430.
- Díaz-Vargas, P., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J.J. y Alcántar González, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. Terra 19: 227-235.
- Dibut, A.B. y Martínez, V.R. 2004. Biofertilizantes y Bioestimuladores. Métodos de inoculación. *In: Manual sobre Agricultura Orgánica Sostenible.* FAO.

- Diop, T.A., Bécard, G. and Piché, Y. 1992. Long-term in vitro culture of an endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri T-DNA transformed root of carrot. *Symbiosis* 12:249-259.
- Domenech, J., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Ramos, B. and Gutierrez-Mañero, J. 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *BioControl* 51:245-258.
- Fages, J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. *Symbiosis* 13:15-26.
- Ferreira, M.E. and Castro, V.I. 2005. Residues of the cork industry as carriers for the production of legume inoculants. *Silva Lusitana* 13:159-167.
- Gaind, S. and Gaur, A.C. 2004. Evaluation of fly ash as a carrier for diazotrophs and phosphobacteria. *Bioresource Technol.* 95:187-190.
- Ganry, F., Diem, H.G. and Dommergues, Y.R. 1982. Effect of inoculation with *Glomus mosseae* on nitrogen fixation by field grown soybeans. *Plant Soil* 68:321-329.
- Germida, J.J. and Walley, F.L. 1996. Plant growth-promoting rhizobacteria alter rooting patterns and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field-grown spring wheat. *Biol. Fertil. Soils* 23:113-120.
- Ghiyasi, M., Myandoab, M.P., Tajbakhsh, M., Salehzade, H. and Meshkat, M.V. 2008. Influence of different osmopriming treatments on emergency and yield of maize (*Zea mays* L.). *Res. J. Biol. Sci.* 3:1452-1455.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G. and Beckhove, U. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8: 629-643.
- Green, S., Wade-Stewart, S., Boland, G., Teshler, M. and Liu, S. 1998. Formulating microorganisms for biological control of weeds. *In: Plant-/Microbe Interactions and Biological Control*. Boland, G. and Kuykendall, L., (eds). Marcel Dekker, Inc., New York.
- Grundwaldt, S.G. and Dehne, H.W. 1989. The use of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on plant production. II. Characterization of inocula on inorganic carrier material. *J. Plant Disease Protect.* 96:615-626.

- Heijnen, C.E., Hok-A-Hin, C.H. and Van Elsas, J.D. 1993. Root colonization by *Pseudomonas* introduced into bentonite amended soil. *Soil Biol. Biochem.* 25:239-246.
- Hungria, M. y Campo, R.J. 2007. Inoculantes Microbianos: Situação no Brasil *In: Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial.* Izaguirre-Mayoral, M.L. Labandera, C. y Sanjuan, J. (eds). Denad Internacional, S.A. Montevideo, Uruguay.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Van Montagu, M. and Kellenberger, E. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* 176:1913-1923.
- Ivanova, E., Teunou, E. and Poncelet, D. 2005. Alginate based macrocapsules as inoculants carriers for production of nitrogen fixing biofertilizers. *In: Proceedings of the Balkan Scientific Conference of Biology.* Gruev, B., Nikolova, M. and Donev, A. (eds). Plovdiv, Bulgaria.
- Jarstfer, A.G. and Sylvia, D.M. 1994. Aeroponic culture of VAM fungi. *In: Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology.* Varma, A.K. and Hock, B. (eds). Springer, Verlag, Berlin.
- Jayaraj, J., Parthasarathi, T. and Radhakrishnan, N.V. 2007. Characterization of a *Pseudomonas fluorescens* strain from tomato rhizosphere and its use for integrated management of tomato damping-off. *BioControl* 52:683-702.
- Kempf, H.J., Scheffer, R.J. and Ligon, J. 1997. Examples of Novartis research activities regarding the use of bacteria in disease control. *In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-present status and future prospects.* Ogoshi, A., Kobayashi, K., Homma, Y., Kodama, F., Kondo, N. and Akino, S. (eds). Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Khavazi, K., Rejali, F., Seguin, P. and Miransari, M. 2007. Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L.) inoculants. *Enzyme Microb. Tech.* 41:780-784.
- Kim, K.Y., Jordan, D. and McDonald, G.A. 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soils* 26:79-87.
- Kumar, V. and Narula, N. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter choroococcum* mutants. *Biol. Fertil.* 28:301-305.

- Labandera, C. 2007. Actividades en Fijación Biológica de Nitrógeno: Situación actual y Perspectivas en Uruguay: *In: Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial*. Izaguirre-Mayoral, M.L., Labandera, C. y Sanjuan, J. (eds). Denad Internacional, S.A. Montevideo, Uruguay.
- Lewis, J.A. and Papavizas, G.C. 1985. Characteristic of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in the soil. *Plant Pathol.* 34: 571-577.
- Lewis, J.A. and Papavizas, G.C. 1987. Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. *Plant Pathol.* 36: 438-446.
- Manjula, K. and Podile, A.R. 2001. Chitin-supplemented formulations improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF 1. *Can. J. Microbiol.* 47:618-625.
- Marx, D.H. and Kenney, D.S. 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. *In: Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. Schenck, N.C. (ed). The American Phytopathological Society. St. Paul, MN.
- Mathre, D.E., Callan, N.W. and Schwend, A., 1994. Factors influencing the control of *Pythium ultimum*-induced seed decay by seed treatment with *Pseudomonas aureofaciens* AB254. *Crop Protect.* 13:301-307.
- Moeinzadeh, A., Sharif-Zadeh, F., Ahmadzadeh, M. and Tajabadi, F.H. 2010. Biopriming of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed with *Pseudomonas fluorescens* for improvement of seed invigoration and seedling growth. *Aust. J. Crop Sci.* 4:564-570.
- Mosse, B. and Hepper, C.M. 1975. Vesicular arbuscular mycorrhizal infections in root organ culture. *Physiol. Plant Pathol.* 5:215-223.
- Nakkeeran, S., Dilantha Fernando, W.G. and Siddiqui, Z.A. 2006. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. *In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Siddiqui, Z.A. (ed). Springer, Netherlands.
- Nayaka, S.C., Niranjana, S.R., Shankar, A.C.U., Raj, S.N., Reddy, M.S., Prakash, H.S. and Mortensen, C.N. 2010. Seed biopriming with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the control of toxigenic *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize. *Archiv. Phytopathol. Plant Protect.* 43:264-282.

- Okon, Y. and Labandera-González, C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26:1591-1601.
- Riggs, P.J., Chelius, M.K., Iniguez, A.L., Kaeppler, S.M. and Triplett, E.W. 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:829-836.
- Rini, C.R. and Sulochana, K.K. 2006. Management of seedling rot of chilli (*Capsicum annum* L.) using *Trichoderma* spp. and fluorescent pseudomonads (*Pseudomonas fluorescens*). *J. Trop. Agric.* 44:1-2.
- Sarma, M.V.R.K., Saharan, K., Prakash, A., Bisaria, V.S. and Sahai, V. 2009. Application of fluorescent Pseudomonads inoculant formulations on *Vigna mungo* through field trial. *Int. J. Biol. Life Sci.* 5:25-29.
- Sarmiento, M.N. 2007. Legislación y normativa sobre comercialización y control de calidad de inoculantes para la agricultura en Colombia. *In: Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial.* Izaguirre-Mayoral, M.L., Labandera, C. y Sanjuan, J. (eds). Denad Internacional, S.A. Montevideo, Uruguay.
- Schisler, D.A. and Slininger, P.J. 1997. Microbial selection strategies that enhance the likelihood of developing commercial biological control products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:172-179.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, Eschborn, Germany.
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K. 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1669-1679.
- Singh, S. and Kapoor, K.K. 1999. Inoculation with phosphate-solubilising microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in sandy soil. *Biol. Fertil. Soils* 28:139-144.
- Smith, R.S. 1995. Inoculant formulations and applications to meet changing needs. *In: Nitrogen fixation: fundamentals and applications.* Tikhonovich, I.A., Provorov, N.A., Romanov, V.I. and Newton W.E. (eds). Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands.

- Suneja, P., Dudeja, S.S. and Narula, N. 2007. Development of multiple co-inoculants of different biofertilizers and their interaction with plants. *Arch. Agron. Soil Sci.* 53:221-223.
- Tittabutr, P., Waraporn, P., Neung, T., Singleton, P.W. and Boonkerd, N. 2007. Growth, survival and field performance of Bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. *ScienceAsia* 33:69-77.
- Trevors, J.T., Van Elsas, J.D., Lee, H. and Van Overbeek, L.S. 1992. Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil. *Microb. Releases* 1:61-69.
- Trivedi, P., Pandey, A. and Palni, L.M.S. 2005. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21:941-945.
- Vidhyasekaran, P. and Muthamilan, M. 1995. Development of formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Dis.* 79:782-790.
- Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Abd El-Fattah, F.K., Squartini, A., Corich, V., Giacomini, A., de Bruijn, F., Rademaker, J., Maya-Flores, J., Ostrom, P., Vega-Hernandez, M., Hollingsworth, R.I., Martinez-Molina, E., Mateos, P., Velazques, E., Wopereis, J., Triplett, E., Umali-Garcia, M., Anarna, J.A., Rolfe, B.G., Ladha, J.K., Hill, J., Mujoo, R., Ng, P.K. and Dazzo, F.B. 2001. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Aust. J. Plant. Physiol.* 28:845-870.
- Zhang, S., Reddy, M.S. and Kloepper, J.W. 2004. Tobacco growth enhancement and blue mold disease protection by rhizobacteria: relationship between plant growth promotion and systemic protection by PGPR strain 90-166. *Plant Soil* 262:277-288.
- Zúñiga, D.D. 2007. Legislación y normativa sobre comercialización y control de calidad de inoculantes para la agricultura en Perú. *In: Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial.* Izaguirre-Mayoral, M.L., Labandera, C. y Sanjuan, J. (eds). Denad Internacional, S.A. Montevideo, Uruguay.

Capítulo 6

Biofertilizantes Bacterianos Desarrollados por el INIFAP

Gerardo Armando Aguado Santacruz* y Blanca Moreno Gómez
Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Molecular de Plantas y Microorganismos
C.E. Bajío-INIFAP, Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende
Celaya, Gto. C.P. 38010.

*Autor de correspondencia

email: aguado.armando@inifap.gob.mx, gaguados@gmail.com

Tel: (461) 6115323 ext. 122

En algunos países, como Argentina, Brasil, Uruguay, India y Cuba, los biofertilizantes cuentan con una larga historia de investigación y aplicación. Contrariamente, en México esta tecnología se encuentra actualmente en fase de expansión y adopción definitiva por los productores. Parte de este retraso en la adopción de los biofertilizantes como parte integral de los sistemas de producción agrícola se relaciona con la abundancia, disponibilidad y los costos relativamente bajos de los agroquímicos derivados del petróleo hasta antes del año de 2007 en nuestro país. Actualmente esta situación ha cambiado de modo tal que la vista de nuestro gobierno se enfoca cada vez más en la utilización de los biofertilizantes como una opción para reducir el empleo de agroquímicos derivados del petróleo.

Uno de los precedentes más importantes para la adopción de esta tecnología en nuestro país se estableció a través del Programa de Validación de Biofertilizantes apoyado por el Gobierno Federal e instrumentado por el INIFAP en el año de 1999. En este programa se emplearon como pilares para la transferencia de la tecnología de biofertilizantes las bacterias *Rhizobium* y *Azospirillum* y hongos micorrízicos arbusculares, que al momento se mantienen como los microorganismos más ampliamente evaluados como biofertilizantes en el campo mexicano.

Desde entonces la optimización de métodos para la producción y formulación de micorrizas se conformó como una de las líneas de investigación prioritarias del Programa de Investigación sobre Biofertilizantes del INIFAP. El

establecimiento de cuatro centros de producción de micorrizas en Campos Experimentales del INIFAP (C.E. Valle de México en Texcoco, Estado de México, C.E. Cotaxtla en Veracruz, C.E. General Terán en Nuevo León, C.E. Bajío en Celaya, Guanajuato, y C.E. Rosario Izapa, Chiapas) posibilitó la producción de alrededor de 600,000 dosis anuales de micorriza (1 kg por dosis) y la evaluación de estos microorganismos a un nivel sin precedente en nuestro país.

Posteriormente, el Programa de Investigación de Biofertilizantes del INIFAP incluyó una nueva línea de investigación relacionada con el aislamiento, identificación y desarrollo de nuevos microorganismos con potencial como biofertilizantes, bacterias y hongos, a partir de las regiones agroecológicas más importantes de nuestro país (Fig. 1).



Figura 1. Regiones agroecológicas de México consideradas para la colecta de microorganismos promotores de crecimiento (después De Alba, 1976).

El aislamiento de los microorganismos se ha enfocado principalmente en los géneros bacterianos *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, y hongos micorrízico arbusculares. El desarrollo de nuevos biofertilizantes

incluye el análisis de la actividad de promoción de crecimiento de las bacterias bajo condiciones *in vitro*, invernadero y finalmente campo (Fig. 2). Posteriormente, estas cepas son identificadas a través de un enfoque polifásico mediante pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares (Fig. 3). En un enfoque polifásico se integra la información genotípica, quimiotípica y fenotípica de los microorganismos a fin de poder llevar a cabo una identificación o agrupamiento confiable (Colwell, 1970).

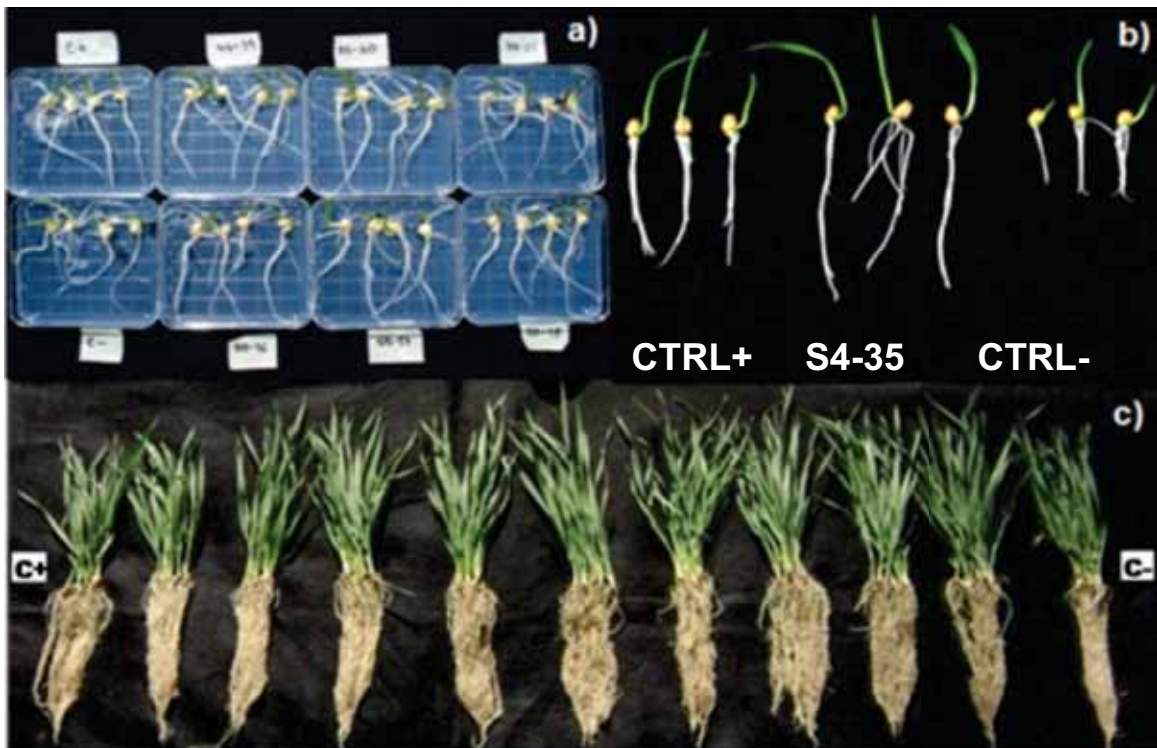


Figura 2. Evaluación *in vitro* y en invernadero de la actividad promotora de crecimiento de bacterias en maíz (a) y trigo (b y c). Estos análisis proveen un primer criterio para la identificación de bacterias con potencial empleo como biofertilizantes bajo condiciones de campo.

Las bacterias con potencial como biofertilizantes que han logrado ser aisladas e identificadas incluyen diversas especies de los géneros *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhanella* y *Rhizobium*, entre otras.

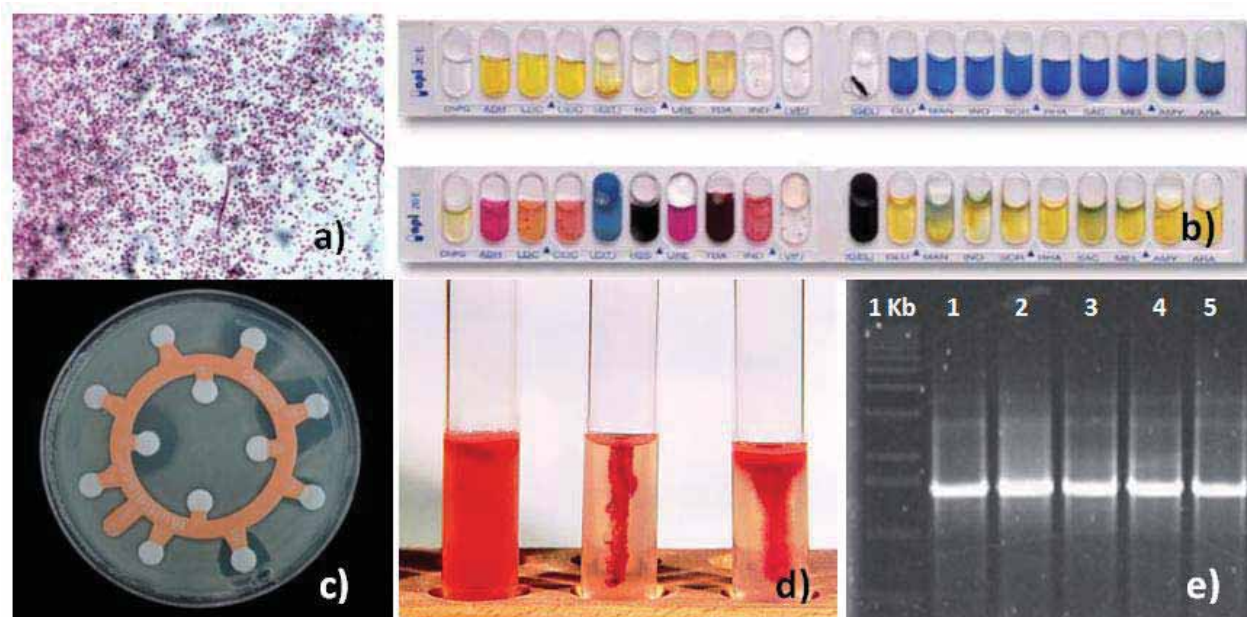


Figura 3. Análisis polifásico de aislados bacterianos con actividad promotora de crecimiento obtenidos a partir de las distintas regiones agroecológicas de nuestro país. a) Tinción de Gram para establecer un primer agrupamiento de los aislados, b) Caracterización bioquímica de los aislados mediante el uso de las tiras API, c) Pruebas de sensibilidad a antibióticos, d) Pruebas de motilidad y e) Amplificación del gen ribosomal 16S para la identificación genética de las bacterias.

Se ha logrado observar que dentro de la gran diversidad biológica observada en los aislamientos existe una variabilidad igualmente grande en cuanto a los mecanismos de acción de los microorganismos identificados (Fig. 4). Por ejemplo, se han identificado cepas promotoras del crecimiento del género *Pseudomonas* hiperproductoras de ácido indol acético y otras que producen niveles muy bajos de esta hormona. También se han encontrado cepas de este mismo género con alta o baja capacidad para la solubilizar hierro y fosfatos o para controlar diversos patógenos importantes de los cultivos (Fig. 4).

Algunos de los primeros microorganismos con potencial para ser utilizados como biofertilizantes se depositaron en una colección internacional de microorganismos regida por el Tratado de Budapest.

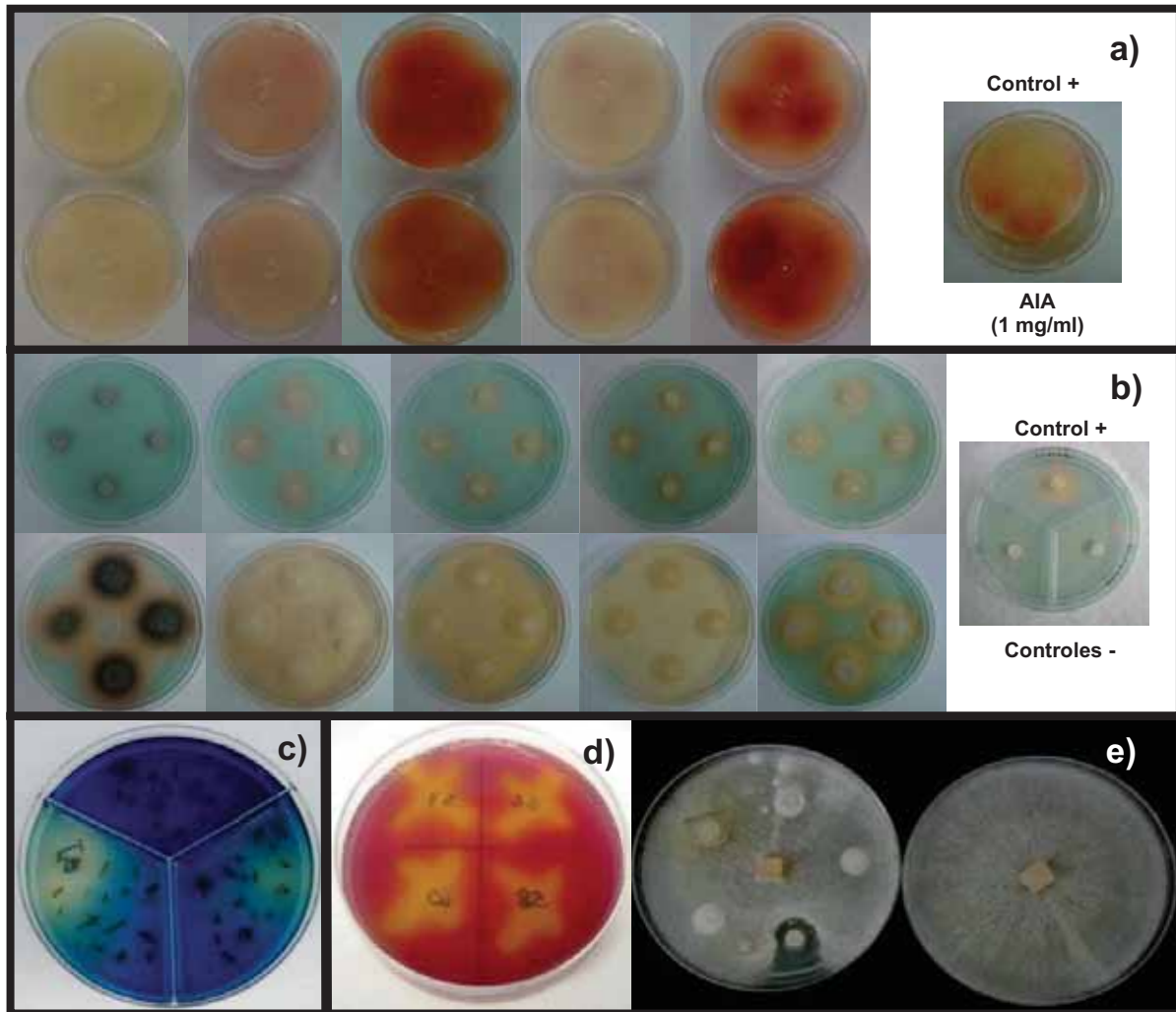


Figura 4. Evaluación cualitativa de los mecanismos de acción de bacterias con actividad promotora de crecimiento. a) Producción de ácido indol acético (AIA) (las pruebas se hicieron por duplicado), b) Cultivo de bacterias en medio con cromo azurol S (CAS) para detectar la producción de sideróforos mediante un cambio de color del medio de azul a naranja (en la parte superior se muestran las bacterias al inicio del cultivo, y en la parte inferior tres días después). En las figuras a y b se muestran, de izquierda a derecha, *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp.* y *Klebsiella oxytoca*, c) Crecimiento en medio NFb para analizar la capacidad fijadora de nitrógeno de las bacterias, d) Crecimiento en medio PS para analizar la capacidad de solubilización de fosfatos de las bacterias, y e) Pruebas de antagonismo contra microorganismos fitopatógenos. Se puede observar el halo de inhibición de una cepa de *Pseudomonas sp.* contra *Rhizoctonia solani*.

Posteriormente y con base en algunas cepas de la especie *Pseudomonas fluorescens* se desarrolló un consorcio bacteriano para formular un biofertilizante, llamado Biofertilizante Bacteriano INI2709 (Fig. 5) que está actualmente en proceso de registro y que ha demostrado sus beneficios en diversos cultivos de importancia para nuestro país (Aguado-Santacruz *et al.*, 2009).



Figura 5. Biofertilizante bacteriano INI2709 formulado con base en un consorcio de distintas cepas de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.

Resultados del empleo del Biofertilizante Bacteriano INI2709 en maíz de temporal

Diversos estudios han demostrado la factibilidad de mejorar el comportamiento agronómico de maíz mediante el uso de biofertilizantes (Fallik y Okon 1996a; Fulchieri y Frioni, 1994; Purcino *et al.*, 1996) desde la reducción del tiempo de germinación y aumento de los porcentajes de germinación y establecimiento de las plántulas hasta incrementos sustanciales en los rendimientos finales del cultivo. Se menciona que del 13 al 20% del contenido de nitrógeno en maíz puede ser atribuido a la actividad fijadora de nitrógeno de bacterias tales como *Azotobacter* (Soliman y Abdel Monem, 1994).

Reduciendo la dosis de fertilización química nitrogenada a la mitad (66 unidades proporcionadas en forma de urea) y empleando dos biofertilizantes basados en *Azospirillum*, Abdel Monem *et al.* (2001) lograron incrementar la

producción de maíz en dos toneladas/ha por encima de los rendimientos obtenidos en parcelas a las cuales se les suministró el 100 por ciento de la fertilización de nitrógeno (132 unidades) bajo condiciones de riego adecuado. Contrariamente, cuando la cantidad de agua se redujo en un 25 por ciento, las plantas biofertilizadas y que sólo recibieron la mitad del fertilizante nitrogenado produjeron de 0.4 y 1.5 ton/ha menos grano que las plantas no biofertilizadas y que recibieron el 100 por ciento del aporte de nitrógeno. Resultados similares fueron reportados por Fallik y Okon (1996a y 1996b).

Por su parte, Uribe *et al.* (2007) no encontraron diferencias en rendimiento entre plantas inoculadas con los microorganismos *Azospirillum brasilense* y la micorriza *Glomus intraradices* y plantas fertilizadas químicamente (40-100-00).

Con base en las premisas anteriores y como punto de partida para la evaluación extensiva en campo del biofertilizante INI2709 se realizó un estudio para establecer el potencial de este producto biológico como un medio para reducir las dosis de fertilización química en maíz de temporal. Las pruebas experimentales se llevaron a cabo en parcelas de una hectárea de superficie ubicadas en diferentes estados de México que incluyeron Guanajuato, Oaxaca y Chiapas y San Luis Potosí.

En Guanajuato, las pruebas fueron realizadas en la localidad “El Acebuche”, Municipio de Tarimoro, Gto. Este terreno de cultivo fue dividido en dos subparcelas de media hectárea cada una. Una de estas subparcelas fue fertilizada con el 100%, y la otra con el 50%, de la fertilización química empleada comúnmente por los productores de maíz de temporal de la zona (30-30-00), utilizando urea y superfosfato triple para el aporte de nitrógeno y fósforo, respectivamente. Además, 1/4 de hectárea adicional se empleó para el establecimiento de las plantas de maíz del control absoluto en la cual se omitió la fertilización química y el uso del biofertilizante INI2709. La variedad de maíz utilizada para el estudio fue la V-322, desarrollado por el Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del INIFAP. Los tratamientos considerados finalmente fueron:

- T1. 100% Fertilización química (30-30-00) + Biofertilizante INI2709
- T2. 50% Fertilización química (15-15-00) + Biofertilizante INI2709
- T3. Biofertilizante INI2709
- T4. 100% Fertilización química (30-30-00)
- T5. Control absoluto (sin fertilización química, sin biofertilización).



Figura 6. Aspecto de la parcela de maíz de temporal (variedad V-322) localizada en la población de Tarimoro, Gto., en la cual se aplicó el 50 por ciento de la fertilización química utilizada por los productores de temporal de la zona (30-30-00). Hacia la izquierda de la imagen las plantas de maíz fueron además inoculadas con el biofertilizante bacteriano INI2709.

Con 558.2 mm de lluvia ocurridos durante el año del estudio (2005), y 497.8 durante el periodo de crecimiento de maíz (julio a septiembre), se considera que el temporal que prevaleció durante el estudio fue bueno y que, en términos generales, las condiciones climáticas fueron adecuadas para la producción de maíz en la zona.

Las diferencias entre los tratamientos fueron muy claras desde el inicio hasta el final del experimento (Fig. 6) y se reflejaron en los rendimientos de grano obtenidos (Fig. 7). Los resultados indicaron que empleando este biofertilizante es posible reducir las dosis de fertilización química en un 50%, sin pérdidas en los rendimientos de grano.

Aunque las plantas biofertilizadas y que recibieron la dosis de fertilización química completa mostraron consistentemente a través de todo el estudio una mayor altura, el mayor rendimiento de grano se observó en las plantas que recibieron la dosis completa de fertilización y en aquellas que sólo recibieron la mitad de esta dosis, pero que además fueron biofertilizadas (Fig. 7), no encontrándose diferencias estadísticas entre estos dos últimos grupos de plantas.

Por otro lado, las plantas control que no fueron tratadas con el biofertilizante y que tampoco recibieron dosis alguna de fertilizante químico no lograron desarrollarse, por lo que no se cosechó grano al final del ciclo de cultivo. Contrariamente, aquellas plantas que recibieron al menos el biofertilizante lograron producir poco más de dos toneladas por hectárea.

Estudios posteriores demostraron que parte de la acción de este producto se relaciona con un incremento en los contenidos de hierro, zinc, manganeso y cobre (Loredo-Osti *et al.*, 2006).

Es interesante observar que la combinación de la fertilización química completa e inoculación con el biofertilizante no haya resultado en una mayor producción de grano (Fig. 7). En este respecto está bien documentada la importancia de utilizar cantidades subóptimas de fertilizantes químicos cuando se emplean microorganismos como *Azospirillum brasilense* (Woodard y Bly, 2000) y *Pseudomonas fluorescens* (Shaharoon *et al.*, 2006), ya que algunas bacterias pueden funcionar como desnitrificadoras en presencia de concentraciones elevadas de nitrógeno en el suelo (Bremner, 1997; Mulvaney *et al.*, 1997). Alternativamente se asume que el amonio proveniente del fertilizante químico (urea) es oxidado rápidamente en el suelo a nitratos lo que

provoca un aumento en la síntesis de etileno (a través de la activación de la enzima ACC-oxidasa) y una reducción en la efectividad de la inoculación con bacterias que contienen ACC-desaminasa como *Pseudomonas fluorescens* (Shaharoon et al., 2006).

Los resultados obtenidos en las otras localidades de evaluación en el país fueron similares a los obtenidos en esta parcela, inclusive cuando el biofertilizante bacteriano INI2709 se inoculó conjuntamente con otros biofertilizantes como la Micorriza INIFAP o *Azospirillum* (Aguado-Santacruz, 2006). Parte de la variación en los resultados obtenidos entre las distintas localidades de estudio pudo estar relacionada, entre otros factores, con el estatus nutricional del suelo y la carga de microorganismos patógenos presentes en cada localidad.

Estos resultados obtenidos en maíz impulsaron la evaluación del producto en otros cultivos de importancia económica como jitomate, tomate verde y chile ancho, entre otros. Una de estas evaluaciones se realizó en Silao, Gto., para comparar el funcionamiento de cuatro biofertilizantes distintos (VOP, Bactiva, Endospor e INI2709) en chile ancho variedad 'Rebelde'. Los efectos de los productos biológicos evaluados se pudieron constatar desde la fase de almácigo. Particularmente, las plántulas inoculadas con el biofertilizante INI2709 mostraron un mejor desarrollo evidenciado por una mayor altura y grosor de tallo (Cuadro 1), así como por una mayor proliferación del sistema radical (Fig. 8).

Posteriormente a los experimentos de invernadero se evaluó el efecto de la inoculación con los biofertilizantes Bioraíz, Endospor, VOP e INI2709 sobre esta misma variedad de chile, pero a nivel de campo. Los resultados mostraron que las plantas inoculadas con los biofertilizantes INI2709 y Bioraíz produjeron los mayores rendimientos de chile ($P < 0.05$). Con relación a las plantas control no inoculadas, los incrementos de rendimiento por la inoculación con estos productos biológicos fueron de alrededor de 9 ton/ha (Fig. 9).

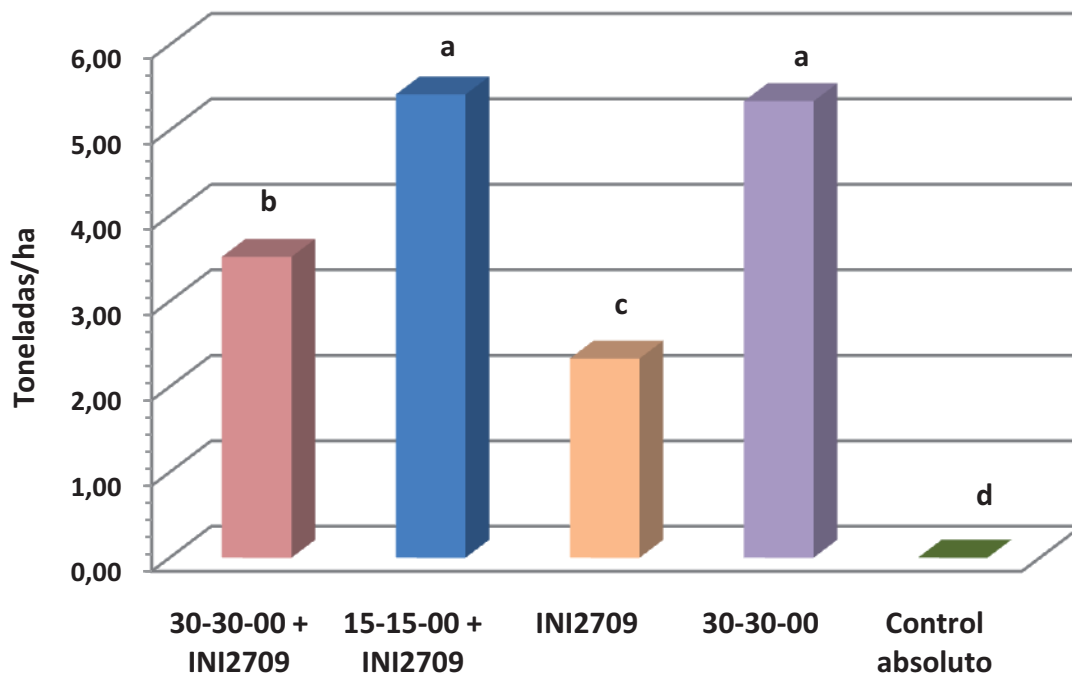


Figura 7. Rendimientos de grano obtenidos en maíz de temporal (variedad V-322) empleando dos dosis de fertilización química (30-30-00 y 15-15-00) e inoculación del biofertilizante INI2709. Literales distintas indican diferencias estadísticas entre los biofertilizantes para cada variables de acuerdo a pruebas de Tukey ($P < 0.05$).

A diferencia de *Azospirillum*, los efectos del empleo de *Pseudomonas fluorescens* como biofertilizante en México, y particularmente en maíz, están menos documentados, si bien estudios realizados en otros países muestran los beneficios del empleo de esta bacteria. Santillana (2006) encontró que plantas de maíz inoculadas con tres dosis de *Pseudomonas* sp. mostraron un mayor desarrollo de vástago y raíz que plantas control no inoculadas. Además, las plantas biofertilizadas no mostraron diferencias en estas variables con respecto a plantas fertilizadas químicamente (80-80-00). Vikram *et al.* (2007) encontraron un aumento en el desarrollo de raíz y vástago de plantas de maíz por efecto de la inoculación con *Pseudomonas fluorescens*. Este efecto benéfico se potenció cuando las plantas de maíz se co-inocularon con dos cepas distintas de *Bradyrhizobium*, una bacteria con actividad fijadora de

nitrógeno. Nezarat y Gholami (2009) encontraron, por su parte, incrementos de hasta un 18.5 por ciento en la germinación de maíz inoculado con diversas cepas de *Pseudomonas* y *Azospirillum*. El vigor de las plántulas (medido en términos del crecimiento de raíz y vástago, así como los porcentajes de germinación) y diversas variables de productividad, tales como peso seco de semilla (gm^{-2}), peso de 100 semillas y el número de semillas por mazorca también fueron mayores en las plántulas inoculadas con estos microorganismos.

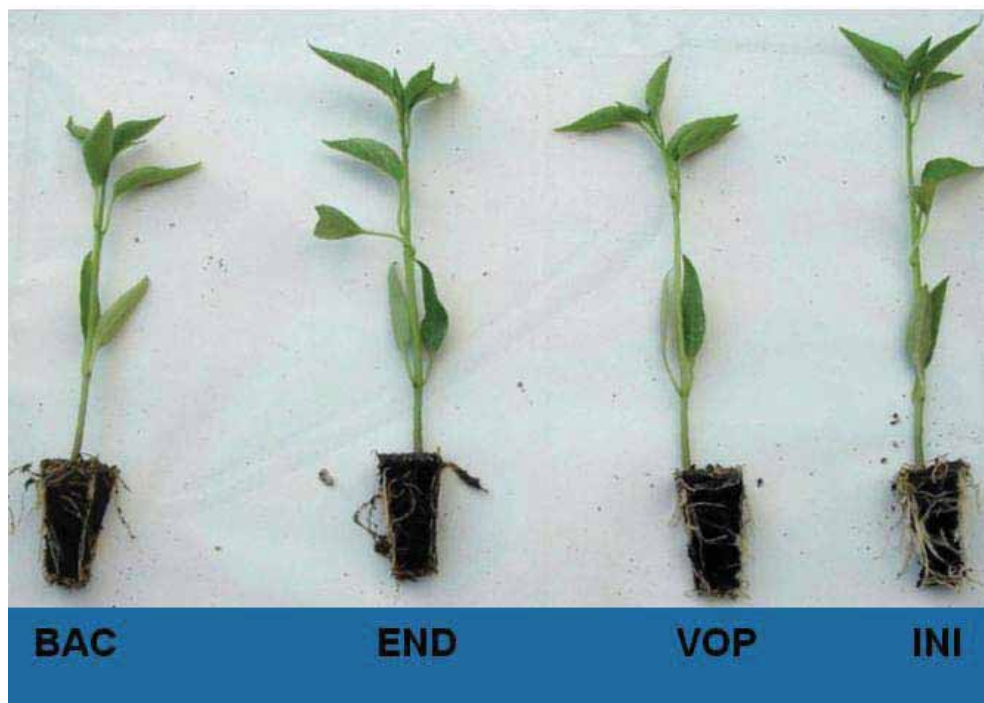


Figura 8. Aspecto de plántulas de chile ancho variedad 'Rebelde' inoculadas con cuatro biofertilizantes. De izquierda a derecha, Bactiva, Endospor, VOP e INI2709.

La eficiencia de *Pseudomonas fluorescens* como agente de biocontrol contra una amplia gama de microorganismos fitopatógenos está muy bien establecida (Sundaramoorthy *et al.*, 2012; Rajkumar *et al.*, 2008; Muthukumar *et al.*, 2010). Dentro de los mecanismos empleados por esta bacteria para el biocontrol se encuentran la activación de la resistencia sistémica inducida que incluye el incremento de la actividad de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) tales como algunas glucanasas, quitinasas, peroxidasas y polifenoloxidasas

(Muthukumar *et al.*, 2010), la competencia por espacio y la producción de antibióticos. Por otro lado, las pseudomonadas fluorescentes, tales como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*, en adición a sus capacidades de biocontrol, también han ganado importancia en la agricultura como promotoras del crecimiento vegetal. (Ramamoorthy *et al.*, 2002). Siddiqui y Meon en 2009 realizaron un estudio para observar el efecto de algunas rizobacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* y *Serratia marcescens* sobre la fisiología de plantas de Chile y su influencia en la supresión de patógenos. En este estudio se reporta un incremento en la tasa de germinación y establecimiento de las plántulas tras haber sido inoculadas con *Pseudomonas aeruginosa*. Además, se menciona que cuatro semanas después de la inoculación se obtuvo un incremento del 67.6% y 33.7% en las longitudes de tallo y raíz, respectivamente, y un aumento en el peso seco de las plántulas del 88.2%. Resultados similares fueron obtenidos por Lucas-García *et al.* (2003) en un estudio en el cual se analizó el efecto de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* (productora de ácido indolacético y sideróforos) sobre el crecimiento de plántulas de Chile cultivadas bajo condiciones ambientales controladas, en el cual se refiere un incremento del 33.5 % en el peso fresco de las plántulas inoculadas con respecto a las plantas control no inoculadas.

Las formas en que *Pseudomonas fluorescens* promueve el crecimiento de las plantas son muy diversas y varían desde el control de hongos (Ganeshan y Kumar, 2005) y nemátodos (Haas y Keel, 2003) dañinos a las plantas, la producción de agentes quelantes llamados sideróforos que liberan el hierro de formas complejas y lo hacen asimilable a las plantas (Hamdan *et al.*, 1991), solubilización de fosfatos (Trujillo *et al.*, 2007), incremento del desarrollo de las raíces mediante la reducción de los niveles de etileno en el suelo (Nadeem *et al.*, 2009), fijación de nitrógeno (Gowda y Watanabe, 1985; Chan, 1994) y la producción de hormonas como citocininas (Neito y Frankenberger, 1989) y auxinas (Dey *et al.*, 2004), hasta la inducción de resistencia sistémica (De Vleeschauwer *et al.*, 2008). Adicionalmente se sabe que algunas cepas de *Pseudomonas* poseen actividades de biocontrol contra fitonemátodos (Haas y Kell, 2003; Ali *et al.*, 2002) y algunos moluscos que representan un problema en reservorios de agua (Molloy, 2001).

Cuadro 1. Respuesta agronómica de plántulas de chile ancho variedad 'Rebelde' a la inoculación con cuatro biofertilizantes.

Inoculante	Diámetro	Altura
VOP	2.27b ^{1-/}	13.84a
Bactiva	2.08c	12.04b
Endospor	2.11c	11.67b
INI2709	2.44a	14.30a

^{1-/}Literales distintas indican diferencias estadísticas entre los biofertilizantes para cada variable de acuerdo a pruebas de Tukey (P<0.05).

De los resultados presentados anteriormente resultan evidentes los beneficios del empleo del biofertilizante INI2709 formulado con base en un consorcio de cepas de la especie *Pseudomonas fluorescens*. Este producto biológico fue evaluado en diferentes ambientes agroecológicos de México con resultados similares a los presentados aquí, por lo que el INIFAP recibió por parte del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato el Premio a la Innovación Tecnológica 2008. Si consideramos que en nuestro país se siembran aproximadamente 6 millones de ha, que en estas áreas se llegan a utilizar 210 kg de fertilizante nitrogenado y 60 kg de fertilizante fosfatado por ha y que el biofertilizante INI2709 lograra reducir en un 30% la cantidad de fertilizante químico aplicado, entonces sería factible que nuestro país ahorrara cerca de \$1,900 millones de pesos (asumiendo un costo aproximado de \$3,880.00 por tonelada de urea y \$3,500.00 por tonelada de fosfato diamónico) y la necesidad de importar 810,000 ton de fertilizante químico (Aguado-Santacruz, 2011).

En este punto es importante mencionar que los biofertilizantes no reemplazan a los fertilizantes químicos sino que ayudan a que éstos sean aprovechados de una manera más eficiente por las plantas, por lo que en función del estatus nutricional actual del suelo se recomienda reducir

solamente de 30 a 50% las dosis de fertilización química. La sola utilización de biofertilizantes sin el retorno de nutrientes al suelo a través de los fertilizantes químicos o abonos orgánicos podría implicar la pérdida gradual de la fertilidad del suelo.

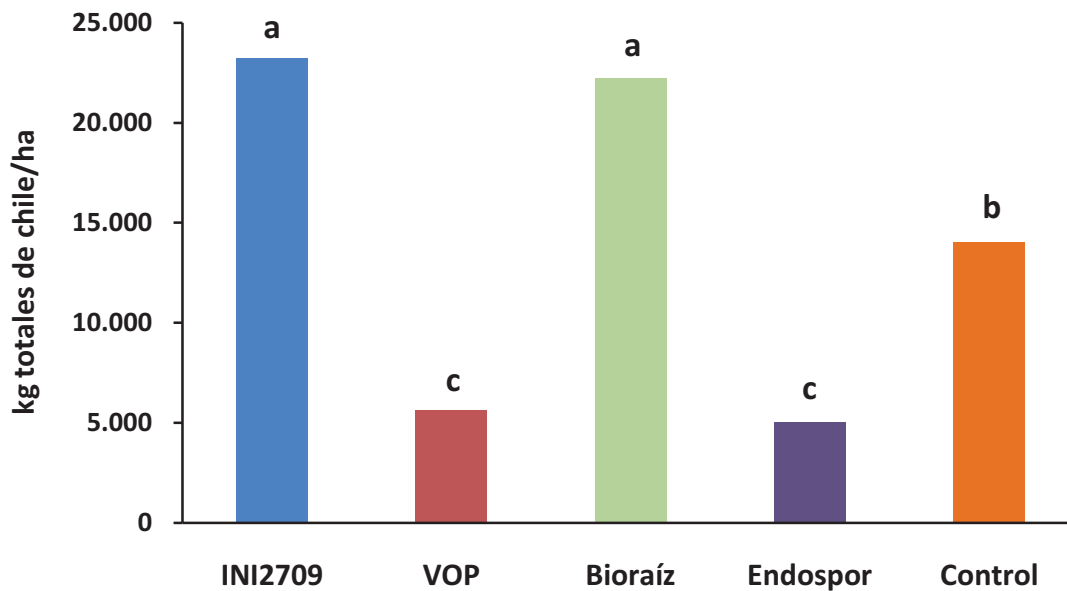


Figura 9. Rendimiento en chile ancho variedad "Rebelde" inoculado con cuatro biofertilizantes. Literales distintas indican diferencias estadísticas entre los biofertilizantes para cada variables de acuerdo a pruebas de Tukey ($P < 0.05$).

Aunque en México los biofertilizantes formulados con base en *Azospirillum*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Rhizobium* y micorrizas son los más conocidos en México y actualmente existen en el mercado diferentes marcas comerciales, la evaluación de otros microorganismos con reconocidas capacidades de promoción de crecimiento como *Azotobacter*, *Enterobacter*, las cianobacterias (*Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix* y *Aulosira*), así como la bacteria *Gluconacetobacter*, más recientemente descubierta, será instrumental para consolidar esta tecnología en México. Adicionalmente, será importante identificar nuevos microorganismos promotores de crecimiento a partir de la gran diversidad de ambientes agroecológicos que caracterizan a nuestro país,

así como las condiciones ambientales más favorables para la expresión de su potencial para incrementar la productividad de los cultivos. Esto es fundamental, si consideramos que los factores ambientales pueden afectar de manera significativa su funcionamiento. Por ejemplo, una bacteria solubilizadora de fósforo o hierro no tendrá el mismo impacto en un suelo con un alto contenido de formas no asimilables de estos elementos que en un suelo con cantidades mínimas de estos elementos en formas asimilables o no asimilables. Alternativamente se esperaría un mayor efecto beneficio de una bacteria fijadora de nitrógeno en suelos que posean un bajo contenido de este elemento que en aquellos que sean naturalmente ricos en este elemento o que posean remanentes de este nutriente proveniente de anteriores prácticas agrícolas. Ciertamente, y al igual que con las buenas prácticas para el uso adecuado de los fertilizantes químicos, la determinación del estatus actual del suelo será esencial para anticipar los probables beneficios de un microorganismo.

Si bien sabemos que México está siendo uno de los últimos países Latinoamericanos en adoptar esta tecnología, los científicos mexicanos tendremos, en el futuro cercano, que estrechar la brecha que nos separa de otros países más avanzados en cuanto al uso y desarrollo de biofertilizantes. Dentro de este contexto también será importante definir los mecanismos que nos permitan regular la calidad de los biofertilizantes, ya que a la luz del potencial económico de estos productos la aparición de productos de escasa calidad con efectos poco predecibles en los rendimientos de los cultivos podría poner en riesgo la consolidación de esta tecnología en nuestro país. El INIFAP ha tomado la iniciativa y este año ha realizado ya la primera propuesta oficial para la creación de una norma mexicana (NMX) enfocada a regular la calidad de los biofertilizantes en México.

Bibliografía Citada

- Abdel Monem, M.A.S., Khalifa, H.E., Beider, M., El Ghandour, I.A. and Galal, Y.G.M. 2001. Using biofertilizers for maize production: response and economic return under different irrigation treatments. *J. Sustain. Agric.* 19:41-48.
- Aguado-Santacruz, G.A. 2006. Informe final del Subproyecto “Potencial de bioinoculantes microbianos como una alternativa para reducir costos de fertilización en cultivos básicos de temporal”. *In*: Informe final del “Proyecto Incremento en rendimiento, productividad y eficiencia en el uso de fertilizantes químicos, biológicos y abonos orgánicos de los principales cultivos básicos empleando métodos racionales de diagnóstico y recomendación” (Convenio No. 30333454). CIRCE-INIFAP. Campo Experimental Bajío, Celaya, Gto.
- Aguado-Santacruz, G.A. 2011. Biofertilización de maíz: práctica redituable, factible y necesaria para la agricultura de nuestro país. *Claridades Agropecuarias* 214:42-47.
- Aguado-Santacruz, G.A. Moreno-Gómez, B., Velázquez-Ordinola, A. y Gámez-Vázquez, F.P. 2009. Biofertilizante bacteriano INI2709. Desplegable para productores No. 11. Campo Experimental Bajío-INIFAP. Celaya, Gto.
- Ali, N.I., Siddiqui, I.A., Shahid J., Shaukat, S. and Zaki, M.J. 2002. Nematicidal activity of some strains of *Pseudomonas* spp. *Soil Biol. Biochem.* 34:1051-1058.
- Bremner, J.M. 1997. Sources of nitrous oxide in soils. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 49:7-16.
- Chan, Y.K., Barraquio, W.L. and Knowles, R. 1994. N₂ fixing pseudomonads and related soil bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:95-118.
- Colwell, R.R. 1970. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* 104:410-433.
- De Alba, J. 1976. Panorama actual de la ganadería mexicana. *In*: Memoria del Seminario Internacional de Ganadería Tropical. FIRA/SAG/Banco de México. Acapulco, Guerrero.
- De Vleeschauwer, D., Djavaheri, M., Bakker, P.A.H.M. and Höfte, M. 2008. *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiol.* 148:1996-2012.

- Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M. and Chauhan, S.M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 159:371-394.
- Fallik, E. and Okon, Y. 1996a. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. *World J. Microbiol. Biotech.* 12:511-515.
- Fallik, E. and Okon, Y. 1996b. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: Biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem.* 28:123-126.
- Fulchieri, M. and L. Frioni. 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. *Soil Biol.* 26:921-923.
- Ganeshan, G. and Kumar, A.M. 2005. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. *J. Plant Interact.* 1: 123-134.
- Gowda, T.K.S. and Watanabe, I. 1985. Hydrogen-supported N₂ fixation of *Pseudomonas* sp. and *Azospirillum lipoferum* under free-living conditions and in association with rice seedlings. *Can. J. Microbiol.* 31:317-321.
- Haas, D. and Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:117-153
- Hamdan, H., Weller, D.M. and Thomashow, L.S. 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3270-3277.
- Loredo-Osti, C., Aguado-Santacruz, G.A., Peña del Río, M.A. y Cueto-Wong, J.A. 2006. Efecto de la bioinoculación sobre la nutrición mineral de maíz en temporal deficiente. *In: Resúmenes del XXXIII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Ciudad Victoria, Tamaulipas.*
- Lucas-García, J.A., Schloter, M., Durkaya, T., Hartmann, A. and Gutiérrez-Mañero, F.J. 2003. Colonization of pepper roots by a plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. *Biol. Fertil. Soils* 37:381-385.
- Molloy, D.P. 2001. A Method for controlling *Dreissena* species. United States Patent and Trademark Office, U. S. Department of Commerce. Patent No. 6,194,194. (Filed December 17, 1997 & issued February 27, 2001).
- Mulvaney, R.L., Khan, S.A. and Mulvaney, C.S. 1997. Nitrogen fertilizers promote denitrification. *Biol. Fertil. Soils* 24:211-220.

- Muthukumar, A., Eswaran, A., Nakkeeran, S. and Sangeetha, G. 2010. Efficacy of plant extracts and biocontrol agents against *Pythium aphanidermatum* inciting chilli damping-off. *Crop Protection* 29:1483-1488.
- Nadeem, S.M., Zahir, Z.A., Naveed, M. and Arshad, M. 2009. Rhizobacteria containing ACC-deaminase confer salt tolerance in maize grown on salt-affected fields. *Can. J. Microbiol.* 55:1302-1309.
- Neito, K.F. and Frankenberger, W.T., Jr. 1989. Biosynthesis of cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Soil Biol. Biochem.* 21:967-972.
- Nezarat, S. and Gholami, A. 2009. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving seed germination, seedling growth and yield of maize. *Pakistan J. Biol. Sci.* 12:26-32.
- Purcino, A.A.C., Paiva, E., Silva, M.R. and de Andrade, S.R.M. 1996. Influence of *Azospirillum* inoculation and nitrogen supply on grain yield, and carbon- and nitrogen assimilating enzymes in maize. *J. Plant Nutr.* 19:1045-1060.
- Rajkumar, M., Lee, K.J. and Freitas, H. 2008. Effects of chitin and salicylic acid on biological control activity of *Pseudomonas* spp. against damping off of pepper. *South Afr. J. Bot.* 74:268-273.
- Ramamoorthy, V., Raguchander, T. and Samiyappan, R. 2002. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. *Eur. J. Plant Pathol.* 108:429-441.
- Santillana, V.N. 2006. Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecología Aplicada* 5:87-91.
- Shaharoon, B., Arshad, M., Zahir, Z.A. and Khalid, A. 2006. Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biol. Biochem.* 38:2971-2975.
- Siddiqui, Y. and Meon, S. 2009. Effect of seed bacterization on plant growth response and induction of disease resistance in chilli. *Agr. Sci. China* 8:963-971.
- Soliman, S. and Abdel Monem, M. 1994. Influence of ¹⁵N labeled urea and *Azotobacter* on corn yield and nitrogen budget as affected by organic matter. *Proceeding of the 2nd Arab Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy.* 5-9 November, Cairo, pp. 683-694.
- Sundaramoorthy, S., Raguchader, T., Ragupathi, N. and Samiyappan, R. 2012. Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. *Biol. Control* 60:59-67.

- Trujillo, M., Velázquez, E. Miguélez, S., Jiménez, M., Mateos, P. and Martínez-Molina, E. 2007. Characterization of a strain of *Pseudomonas fluorescens* that solubilizes phosphates in vitro and produces high antibiotic activity against several microorganisms. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Develop. Plant Soil Sci. 102: 265-268.
- Uribe, V.G., Petit, J. y Dzib, E.R. 2007. Respuesta del cultivo de maíz a la aplicación de biofertilizantes en el sistema roza, tumba y quema en suelo alfisol (chac-lu'um, nomenclatura maya), en Yucatán, México. Agricultura Andina 13:3-18.
- Vikram, A., Krishnaraj, P.U., Hamzehzarghani, H., Jagadeesh, K.S. 2007. Growth promotional potential of *Pseudomonas fluorescens* FPD-10 and its interaction with *Bradyrhizobium* sp. Res. J. Microbiol. 2:354-36.
- Woodard, H.J. and Bly, A. 2000. Maize growth and yield responses to seed-inoculated N₂-fixing bacteria under dryland production conditions. J. Plant Nutr. 23: 55–65.

Capítulo 7

Empleo de *Azospirillum* como Biofertilizante

Alberto Mendoza Herrera* y Ma. Antonia Cruz Hernández

Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismo, Centro de Biotecnología Genómica-
IPN. Blvd. del Maestro S/N, Col. N. Mendoza
Reynosa, Tam. C.P. 88710

*Autor de correspondencia
email: amendozah@ipn.mx
Tel: (899) 9243627 ext. 87717

Actualmente está bien reconocida la importancia que tiene la producción ecológica de alimentos a través de bioproductos que contribuyan a la fertilización de los suelos para su producción. Casi todos ejercen una fuerte influencia sobre las plantas y, a su vez, ellas a través de las secreciones de su sistema radical les proporcionan sustancias alimenticias indispensables como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, distintas combinaciones minerales e incluso vitaminas (De-Bashan *et al.*, 2008). La agricultura mundial ha tendido a buscar la sustentabilidad de los cultivos a través de alternativas de origen biológico que sean más económicas, mejoren la rentabilidad de los cultivos y eviten el deterioro del ambiente. El desarrollo y uso de los biofertilizantes se contempla como una importante alternativa para la sustitución parcial o total de los fertilizantes minerales. La aplicación de bacterias que interaccionan con las plantas es considerada una opción viable en muchos países y en la actualidad se busca el desarrollo de biofertilizantes basados en bacterias promotoras del crecimiento vegetal, en particular con bacterias del género *Azospirillum*; fijadora de nitrógeno y productora de fitohormonas.

El objetivo de las estrategias de manejo de nutrientes es lograr la producción requerida en los cultivos de una manera eficiente, económica y sustentable. Existe un consenso en todo el mundo que indica que la agricultura basada en la dependencia exclusiva de insumos químicos no es sustentable a largo plazo y que sólo involucrando la combinación de fertilizantes orgánicos, abonos verdes y biofertilizantes será posible lograr una producción sostenible de alimentos, manteniendo la biodiversidad del suelo y evitando la

contaminación del ambiente, particularmente de los mantos acuíferos y cuerpos de agua superficiales. La carga económica y el costo ambiental son altos con la utilización de fertilizantes de origen químico. Contrariamente, el nitrógeno obtenido mediante la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) el ahorro potencial es enorme, lo cual es especialmente importante para países en desarrollo en donde la agricultura continuará estando en las manos de pequeños agricultores.

Uso de microorganismos como fertilizantes biológicos

Estudios sobre la aplicación de biofertilizantes a base de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Derxia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y otros microorganismos en la producción de diversos cultivos (maíz, trigo, remolacha y girasol) muestran que ellos pueden, dependiendo de la cepa, el modo y la forma de aplicación, reemplazar de 20 a 60 kg de N ha⁻¹. La inoculación a plantas con bacterias asociativas fijadoras de N y solubilizadoras de minerales fosfóricos incrementa significativamente la producción y biomasa de cultivos en campo (Govedarica *et al.*, 1997), la calidad productiva de la remolacha (Mrkovaki *et al.*, 2009) y la resistencia de los cultivos a diversos fitopatógenos (Compant *et al.*, 2005). La aplicación de biofertilizantes facilita la asimilación de P y K por las plantas mediante la producción de sustancias activas por los microorganismos tales como algunas vitaminas y ciertas hormonas, e.g. auxinas y giberelinas. La inoculación de semillas de trigo con *Azospirillum* mostró un efecto positivo en la longitud de espiga (7-30%) y la producción de espiguillas fértiles (12-25%; Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2009). La inoculación con *Azotobacter chroococcum* resultó en un incremento en la producción de maíz, aunque el efecto dependió de la cepa, el híbrido y la cantidad de fertilizante aplicado. Estudios a largo plazo sobre el efecto de diferentes cepas de *Azotobacter chroococcum* sobre la producción de maíz indican la posibilidad de reemplazar una cierta cantidad de fertilizantes nitrogenados minerales (Cvijanovi *et al.*, 2005). De acuerdo a Dobbelaere *et al.* (2003), es posible reemplazar el 30% del N mineral mediante el uso de biofertilizantes.

Debido a sus efectos benéficos sobre la salud y desarrollo de las plantas,

algunos microorganismos presentes en el suelo se utilizan como base para la formulación de inoculantes (Bashan, 1998).

La aplicación práctica de los biofertilizantes comienza en 1886 cuando Hellriegel y Wilfarth, descubren la existencia de una relación simbiótica entre plantas leguminosas y bacterias que se alojaban dentro de nódulos ubicados en las raíces. Una vez aisladas dichas bacterias, Nobbe y Hiltner demuestran en 1890 la ventaja de adicionar cultivos puros de estas bacterias a las semillas de plantas leguminosas; en este momento se registra Nitragin®, la primer patente de inóculo para plantas basado en *Rhizobium* sp. A mediados de los 70's se producen dos fenómenos importantes en la tecnología de la inoculación de bacterias; por un lado se observa que el género *Azospirillum* mejora el crecimiento de plantas no leguminosas (Döbereiner y Baldani, 1979) y por otro lado se encuentra que actúa directamente sobre el metabolismo (Bashan y Holguin 1997a, b).

Desde entonces y debido a la versatilidad metabólica del género *Azospirillum* se han realizado diversos estudios en los que se analiza el efecto de co-inocular esta bacteria con otros microorganismos. La inoculación de *Azospirillum* junto con bacterias solubilizadoras de fósforo (P) ha demostrado tener efectos benéficos sobre la planta, así como un incremento en la nodulación por *Rhizobium*. A pesar de las ventajas aparentes que ofrece la co-inoculación se han comercializado muy pocas formulaciones mixtas, siendo los inóculos basados en un solo microorganismo los que más se producen. Ejemplo de éstas son Soil Implant®, Gold Coat®, Cell Tech®, Lift o Azogreen basado en *Azospirillum lipoferum* CRT1 (Fages ,1992).

A pesar del importante avance en la formulación y desarrollo de los inoculantes, la respuesta a los mismos varía considerablemente. El efecto de los biofertilizantes sobre los cultivos depende de una multitud de factores entre los cuales destacan las características del microorganismo empleado en la formulación del biofertilizante (e.g. capacidad competitiva), especie vegetal, tipo de suelo, concentración del inoculante y las condiciones ambientales. En general, al poco tiempo de introducir la bacteria en el suelo, la población

disminuye rápidamente (Van Elsas, 1986; Bashan y Levanony, 1988; Heijnen y Van Elsas, 1994). Para que el microorganismo llegue en el mejor estado al momento de su aplicación, es esencial que el soporte o sustrato empleado en la formulación del biofertilizante mantenga las características originales del inóculo el mayor tiempo posible. Se ha avanzado mucho en la formulación de inoculantes, pero no se puede hablar de un sustrato universal. Una característica común que todos deben cumplir es la capacidad para liberar el número adecuado de células viables en buenas condiciones fisiológicas al momento de la inoculación (Fages y Lux, 1991, Fages, 1992; Smith y Eady, 1992; Trevors, 1996). Actualmente se emplean diferentes sustratos con buenos resultados como turbas, carbón, arcillas, compostas, vermiculita, perlita, alginatos o cultivos bacterianos liofilizados (Iswaran *et al.*, 1972; Smith y Eady, 1992).

Inoculantes bacterianos

Los microorganismos del suelo han despertado gran interés en los últimos años por lo que han sido estudiados intensamente por diferentes científicos vinculados a la agricultura en el mundo. Entre ellos los microorganismos más estudiados por sus efectos sobre el rendimiento de los cultivos se encuentran los rizobios que establecen simbiosis nodulantes con las leguminosas y las bacterias de vida libre como *Azospirillum* que poseen la habilidad de formar asociaciones benéficas con muchas plantas no leguminosas.

Mucho se ha investigado sobre el proceso de cómo actúan estas bacterias sobre las plantas. En numerosos ensayos se ha comprobado que *Azospirillum* produce un incremento radicular altamente significativo en la etapa inicial de las plantas del cultivo. Esto se manifiesta posteriormente en incrementos en los rendimientos de los cultivos (hasta 40%) crecidos en suelos de escasa fertilidad o bajo condiciones de estrés hídrico. Por otro lado, en cultivos biofertilizados y en los cuales se han empleado menores dosis de fertilización química se han obtenido rendimientos similares, o un poco inferiores, a los alcanzados en cultivos en los cuales se han empleado las dosis químicas completas

recomendadas, efecto que es atribuible a un mejor aprovechamiento del fertilizante químico agregado por la mayor capacidad de exploración del suelo ocasionada por el incremento del crecimiento de la raíz inducido por los microorganismos.

Desde el punto de vista de una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente, el uso de biofertilizantes representa una importante alternativa para reducir el uso de abonos químicos, reduciendo sus impactos negativos ambiental y económico y mejorando la productividad de los cultivos. Asimismo, los biofertilizantes pueden ser de gran utilidad en la recuperación de terrenos degradados para su aprovechamiento con fines agrícola o forestal.

De este modo es importante la integración de esfuerzos y conocimientos entre especialistas de diferentes áreas para el adecuado desarrollo de biofertilizantes enfocados a solventar los problemas particulares que afectan las diferentes regiones agroecológicas de un país determinado.

Particularmente, el uso de *Azospirillum* constituye una forma de aumentar la productividad de los cultivos, reduciendo al mismo tiempo los efectos secundarios de la fertilización química sobre el medio ambiente y la salud. El utilizar las bacterias del género *Azospirillum* como biofertilizante tiene como propósito: 1) sustituir hasta 50% del fertilizante nitrogenado en las gramíneas y 2) incrementar los rendimientos por la acción de las sustancias activas que son capaces de sintetizar.

En los inicios de su comercialización, los biofertilizantes bacterianos eran productos importados formulados en turba. Posteriormente otros soportes, como el alginato y polvo de carbón, llegaron a ser utilizados para la formulación de biofertilizantes. La demanda de biofertilizantes en el 2011 fue estimada en 30,000 toneladas (De Bashan *et al.*, 2007).

Entre los distintos tipos de biofertilizantes se encuentran las bacterias fijadoras de N₂ (*Azospirillum*, *Rhizobium*, *Acetobacter* y las algas verde azules o cianobacterias, entre otros), bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) y los hongos micorrízicos. Las prácticas de manejo del suelo como la corrección de

deficiencias de nutrientes, el reciclamiento de los residuos de la cosecha, aplicación de composta, entre otras, son todas cruciales para asegurar el desempeño exitoso de los biofertilizantes. Los casos de éxito en respuesta a la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), principalmente *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, van en aumento. Por ejemplo, mediante el uso de estos microorganismos se ha logrado un ahorro del 25% de los nutrientes químicos aplicados normalmente. La co-inoculación de *Rhizobium*, *Azospirillum*, micorrizas arbusculares y bacterias solubilizadoras de fosfatos ha resultado ser significativamente mejor que la inoculación de un solo microorganismo. La inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfatos o micorrizas arbusculares resultó en un ahorro de 8-10 kg ha⁻¹ de P en arroz, trigo, cacahuate, soya y otros cultivos (De Bashan *et al.*, 2007).

Un intento de sustituir el soporte común de *Azospirillum* a base de turba con vermiculita irradiado con rayos gamma como soporte al parecer falló. La supervivencia y las pruebas de control de calidad de vida útil reveló que el número de células viables de *Azospirillum* en vermiculita disminuyó gradualmente hasta llegar a 1.3 X 10⁷ UFC/g substrato (peso seco) al final de 44 semanas de almacenamiento. La vida útil de un inóculo de *Azospirillum* en vermiculita fue de solamente 20 semanas a temperatura ambiente, en comparación a 44 semanas para un inoculante formulado en turba (Saleh *et al.*, 2001). Un inoculante que contenía hongos MA (*Glomus fasciculatum*), *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fosfatos y que fue formulado en gránulos de arcilla para una fácil aplicación en viveros tuvo una vida útil de 60 días (Lilly y Santhanakrishnan, 1999).

Inoculantes a base de *Azospirillum*

Un inoculante a base de *Azospirillum* es una formulación que contiene una o más cepas bacterianas o especies en un material portador económico fácil de usar, ya sea de naturaleza orgánica o sintética. El inoculante es el medio de transporte bacteriano de la fábrica/laboratorio a la planta. La formulación del inoculante tiene un efecto crucial en el proceso de inoculación porque la formulación escogida determina el éxito potencial del inoculante (Bashan, 1998).

Efectos de *Azospirillum* sobre el crecimiento y rendimiento de plantas

Los estudios de campo a nivel mundial sobre *Azospirillum* indican tres conclusiones fundamentales: (i) la posibilidad de inocular exitosamente plantas que no sean cereales. Existe un diverso número de experimentos que demuestra que más de 100 especies de plantas pueden establecer una simbiosis funcional con esta bacteria. A pesar de que *Azospirillum* se aisló originalmente a partir de cereales y la mayor parte de los experimentos de inoculación se realizaron en cereales (Levanony y Bashan, 1990), actualmente existen más reportes de especies exitosamente inoculadas que no son cereales (Bashan y Holguín, 1997a). Por lo tanto, a nivel mundial, se ha propuesto que *Azospirillum* debe ser considerado una bacteria promotora del crecimiento vegetal y no un estimulador del crecimiento de cereales, (ii) en numerosos casos, la inoculación con este microorganismo redujo el uso de fertilizantes químicos, especialmente de N en 20-50% y los resultados siempre fueron mejores cuando se incorporaron fertilizantes orgánicos, (iii) en muchos países en desarrollo, la inoculación aumentó la relación beneficio-costos de los cultivos.

La evaluación a nivel mundial en las décadas pasadas referente a las inoculaciones en el campo con *Azospirillum*, sólo o en combinación con otros microorganismos fijadores de N, nos lleva a la conclusión de que estas bacterias son capaces de promover el desarrollo y la productividad de cultivos importantes en la agricultura, aún en diferentes tipos de suelo y regiones climáticas. Los datos indican entre 60-70% de éxito en las inoculaciones, con incrementos estadísticamente significativos en la producción que van del 5 al 30% dependiendo de la región y las cepas de *Azospirillum* empleadas.

Actualmente la formulación a nivel mundial de los biofertilizantes basados en *Azospirillum* utiliza turba como vehículo. Las inoculaciones de *Azospirillum* en turba resultaron en un incremento en la producción del 15% con respecto a cultivos no inoculados. El límite máximo de fertilización para la obtención de los beneficios con *Azospirillum* es de 10-30 kg ha⁻¹ de N.

Los Consejos de Agricultura de diferentes países han recomendado el uso de *Azospirillum* como inoculante en diferentes cultivos para reducir el uso de fertilizantes nitrogenados. Asimismo, en la producción de trigo a nivel mundial se han encontrado incrementos significativos del 10 al 40% en parcelas biofertilizadas con esta bacteria en comparación con parcelas no inoculadas. Sin embargo, en algunos experimentos la ganancia absoluta debido a la inoculación fue inconstante e independiente de los niveles de fertilización nitrogenada. La promoción del crecimiento vegetal no siempre puede verse reflejada en un aumento de la producción. Diferentes cepas de *Azospirillum* han sido aisladas alrededor del mundo tanto de la rizósfera como del interior de la raíz, encontrándose que estas últimas son más eficientes en promover el desarrollo de la planta y su producción cuando son usadas con su hospedero original (Caballero-Mellado *et al.*, 2007).

Efectos de la co-inoculación de *Azospirillum* con otros microorganismos sobre el crecimiento y la producción de plantas

El fenómeno más notable del empleo de *Azospirillum* es que sus efectos son más eficaces y rentables cuando otros microorganismos son co-inoculados (Bashan y Holguín, 1997a, b). Los consorcios aparentemente funcionan mejor cuando se incluyen bacterias solubilizadoras de fosfatos, *Azotobacter*, *Rhizobium*, bacilos y hongos MA. Esto se explica por los efectos sinérgicos de cada uno de ellos sobre el aumento en la disponibilidad de nutrientes y la inactivación de compuestos inhibitorios, actividades que conllevan a un mejor crecimiento de las plantas.

Aunque la mayoría de los mecanismos por los cuales una co-inoculación resulta en un efecto aditivo sobre el crecimiento vegetal son todavía desconocidos, se sabe que en muchos casos algunas mezclas de microorganismos mejoran la nutrición y la absorción de nutrientes por las plantas. Los resultados más notables que se reportan son un incremento en la absorción de minerales, reducción de las dosis de fertilizantes nitrogenados y fosfatados en 25-50% y un incremento de la disponibilidad de N, P y K del suelo, lo cual, su vez, repercute en aumento en la cantidad y calidad de los

productos agrícolas cosechados y una mejora de la relación costo-beneficio. Especialmente en países en desarrollo, la co-inoculación ha resultado ser el método de elección en la última década. Con una mejor caracterización de las cepas y mejores soportes para la formulación de inoculantes, esta alternativa de inoculación podría ser la elección futura de aplicación de *Azospirillum* a nivel de campo.

Aspectos agrotecnológicos: *Azospirillum* y su interacción con pesticidas

Una poderosa razón para entender la interacción *Azospirillum*-planta, es la aplicación comercial de la bacteria en sistemas agrícolas de países desarrollados y en vías de desarrollo. De manera sorprendente, muy poco se ha publicado acerca de los aspectos agrotecnológicos del sistema, *i.e.*, efectos potenciales de la inoculación con *Azospirillum* en conjunto con diferentes compuestos químicos aplicados en sembradíos de interés comercial. Cuando esta información existe, no es accesible ya que las compañías que la han generado se niegan a publicar sus resultados (Fages, 1992; Bashan, 1998).

Aún después de haber establecido la mejor combinación planta-*Azospirillum* para la producción comercial de los cultivos persiste el problema de lograr una aplicación exitosa de las bacterias. Las bacterias tienen que llegar a la raíz para cumplir con su cometido, por lo que la inoculación bacteriana debe realizarse en el momento requerido por la planta (Bashan, 1986b). Las técnicas de inoculación deben ser prácticas, económicas y fáciles de manejar por el agricultor, el producto formulado debe proveer inóculo suficiente para la planta, además de que el biofertilizante requiere ser competitivo con las normas comerciales vigentes y poseer una larga viabilidad de almacenamiento (Fages, 1992; Sabaratnam y Traquair, 2002; De Bashan *et al.*, 2007).

Aunque en la actualidad se utilizan diversos métodos para inocular *Azospirillum* el más simple consiste en aplicar las bacterias en suspensión líquida, ya sea directamente al suelo o a las semillas. Esta técnica se ha utilizado en numerosos experimentos de invernadero y de campo (Albrecht *et al.*, 1981; Reynders y Vlassak, 1982; Smith *et al.*, 1984), pero resulta

inadecuada puesto que el tiempo de supervivencia de *Azospirillum* en suelo es relativamente corto en ausencia de un acarreador; formulaciones más confiables utilizan diversos acarreadores orgánicos (Sadasivan *et al.*, 1986).

Los mejores resultados en rendimiento se han obtenido a partir de suspensiones de turba que son vertidas, aplicadas por goteo al surco o distribuyendo el inoculante al momento de la siembra. Al comparar la viabilidad de *Azospirillum* con diferentes acarreadores, la turba superó a la vermiculita, polvo de talco, gránulos de basalto y a la bentonita (Fallik y Okon, 1996). Estos inoculantes no poseen ninguna de las características que requiere un buen inoculante como la liberación controlada de bacterias y facilidad de almacenamiento (Bashan, 1986a), lo que ha dado como resultado inconsistencias en los efectos del biofertilizante sobre el rendimiento de los cultivos. El encapsulamiento de células en polímeros como el alginato protege a las células de las tensiones ambientales y permite una liberación gradual de las bacterias en el suelo (Bashan, 1986a; Bashan, 1998). La supervivencia de las células microbianas dependerá de variables tales como la cepa utilizada, la composición del medio en que se suspenden las células y las condiciones de secado. Paul *et al.* (1993) encontraron que la viabilidad de células de *Azospirillum lipoferum* encapsuladas en macroesferas de alginato es mayor cuando se utiliza una tasa baja de secado ($1.18 \text{ g g peso seco}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Otra opción es la formulación de bacterias en microesferas de alginato. Mediante esta formulación se satisfacen los requerimientos de un inoculante eficiente y práctico. Este es un acarreador químicamente inerte similar a polvo de mármol, arena o carbonato de calcio, seco, fácil de usar, uniforme, biodegradable por organismos del suelo, de naturaleza no-tóxica, capaz de retener una población bacteriana alta y uniforme y permitir la liberación gradual de las bacterias durante periodos de hasta un mes, además de que posibilita la producción a gran escala de biofertilizantes (Bashan, 1986a; Bashan y Levanony, 1987; Paul *et al.*, 1993).

Durante el proceso de optimización para la producción de microesferas de alginato se logró una mayor supervivencia de las células bacterianas al agregar

leche descremada y posteriormente llevar a cabo una deshidratación controlada por aire. Al final se obtuvo un inoculante en polvo fácil de almacenar y manejar con más de 10 billones de células g^{-1} (Fages, 1990; Fages, 1992; Carrillo y Bashan, 1997).

Debido a las ventajas de supervivencia que presentan las células enquistadas de *Azospirillum* sobre las células vegetativas, se sugiere la generación de inoculantes compuestos por agregados masivos o floculados de *Azospirillum* o *Rhizobium*, los cuales consisten en una mezcla de quistes y células vegetativas rodeados por una red de polisacáridos. La inoculación de frijol con formas floculadas de *R. leguminosarum* o coagregadas con *A. brasilense*, promovió la nodulación y el crecimiento de las plantas al compararse con inoculaciones con *Rhizobium* no floculado (Smith *et al.*, 1984; Neyra *et al.*, 1995). Además, se encontró que el cultivo continuo en condiciones anaerobias aumenta la actividad de la nitrato reductasa en células enquistadas de *A. brasilense* (Sp-7) y (Sp-245) inmovilizadas en esferas de alginato. Los mejores resultados en crecimiento de plantas de maíz se obtuvieron al utilizar como inóculo células de *Azospirillum brasilense* con 40% de polihidroxitirato (Fallik y Okon, 1996).

El desarrollo comercial de inoculantes de *Azospirillum* a escala industrial depende de tres factores principales, interrelacionados entre sí: 1) avances en la investigación básica relacionada con el entendimiento de la asociación planta-bacteria; 2) una formulación y una tecnología de aplicación optimizadas, y 3) un cambio de actitud favorable por parte de las industrias agroquímicas y semilleras hacia los inoculantes microbianos y la constitución de normas legislativas en cada país para el uso de biofertilizantes. El desarrollo de inoculantes avanzados es una tarea esencial para lograr la consolidación de la biofertilización con *Azospirillum* como una práctica esencial dentro de las labores agrícolas rutinarias. El desarrollo de un acarreador bacteriano adecuado (sintético, orgánico o inorgánico) determinará si la interacción *Azospirillum*-planta tendrá un impacto significativo en la producción agrícola del futuro (Bashan, 1998; Bashan y González, 1999; Bashan *et al.*, 2002).

Efectos de formulaciones polimicrobianas para aumentar la productividad de los cultivos

Enfrentando un fuerte aumento en el precio de la energía, una creciente preocupación sobre el calentamiento global y un rápido crecimiento de la población mundial (estimada en 6.9 miles de millones en 2010), la necesidad de un aumento de productividad de los cultivos a largo plazo con bases ecológicas y sustentables nunca había sido mayor (Grandy *et al.*, 2006). Desde esta perspectiva, los biofertilizantes ofrecen una alternativa tecnológica viable. En este sentido será importante desarrollar formulaciones microbianas estables, eficaces y amigables con el ambiente que contengan diversos grupos de microorganismos, con funciones complementarias, y que estén diseñadas para mejorar la productividad de un amplio espectro de plantas, incluyendo leguminosas, no leguminosas, cereales, plantas ornamentales y cultivos forrajeros con dosis mínimas de fertilizantes y pesticidas químicos.

Se espera que las formulaciones mejoradas futuras proporcionen los efectos benéficos observados por múltiples mecanismos que incluyen: el mejoramiento de la fijación de nitrógeno, control de patógenos de plantas (ya sea directamente por la segregación de antibióticos o indirectamente mediante la inducción sistemática de resistencia en plantas frente a los patógenos), solubilización y movilización de minerales como fósforo y hierro, y la producción de compuestos estimuladores del crecimiento.

Si bien la idea de los inoculantes microbianos para estimular la producción de cultivos no es nuevo, el cuidadoso y deliberado diseño de una formulación que contenga microorganismos de múltiples grupos filogenéticos con funciones complementarias, que mantenga una alta viabilidad en el tiempo a temperatura ambiente y que posibilite el uso de cantidades mínimas de fertilizantes químicos y pesticidas si es innovador.

Por tal razón, una de las tendencias a nivel mundial en el uso de biofertilizantes es la implementación de proyectos de investigación para el desarrollo de formulaciones microbianas estables, eficaces y amigables con el ambiente y sobre todo que contengan diversos microorganismos con funciones

complementarias destinadas a mejorar la productividad de un amplio espectro de cultivos. Por ejemplo, la inoculación de cepas autóctonas (silvestres) incrementó en 65% la altura de maíz, 41% en berenjena, 40% en frijol arbustivo, 91% en tomate, 96% en soya, 50% en chícharo y 16% en okra; estos aumentos en la altura de las plantas estuvieron acompañados por incrementos en los rendimientos de los cultivos (Caballero-Mellado *et al.*, 1992). Resultados similares fueron encontrados por Shaheen *et al.* (2007) y Pedraza *et al.* (2009), quienes mencionan que a través de la inoculación de cepas nativas de *Azospirillum*, la media de rendimiento de tomate aumentó en 88%, la de okra en 50% y la de arroz en 40%. En general, las plantas tratadas fueron en apariencia más sanas, mostraron una floración y fructificación más tempranas y desarrollaron una buena nodulación radical en el caso de leguminosas. Los rendimientos obtenidos en ensayos de campo han sido en ocasiones consistentes con los obtenidos en condiciones de invernadero. Los resultados indican que las formulaciones polimicrobianas reducen el uso de fertilizantes nitrogenados y pesticidas, mejoran la productividad de un amplio espectro de cultivos, no contaminan y contribuyen a la conservación del suelo.

Inoculantes bacterianos genéticamente modificados

La implementación de aplicaciones técnicas innovadoras basadas en desarrollos biotecnológicos para la promoción del sector agroalimentario es un tema de interés creciente y vigente que no se considera de forma totalmente favorable por la sociedad. Una de las principales razones por las que no existe una aceptación generalizada de los productos biotecnológicos es el hecho de que no ofrezcan beneficios obvios y tangibles a través de su empleo. Sin embargo, algunos productos comienzan a ser aceptados ya que han demostrado su capacidad para solventar demandas específicas de la sociedad ante situaciones particulares que son motivo de preocupación.

Entre los productos conocidos como “amigables con el ambiente” se encuentran los inoculantes microbianos, reconocidos por su capacidad para mejorar el vigor de los cultivos, hacerlos más resistentes al ataque de patógenos y a diferentes estreses y, en suma, para incrementar su productividad.

La sociedad está consciente de que el uso indiscriminado de pesticidas, fungicidas y fertilizantes químicos puede acarrear serios problemas ambientales. En este contexto, dentro del proyecto ECO-SAFE de la Unión Europea se desarrollan proyectos orientados a evaluar las consecuencias ecológicas de la utilización de nuevos productos biotecnológicos, entre ellos los inoculantes microbianos desarrollados con base en *Azospirillum* para contribuir a lograr una sustentabilidad de la agricultura europea.

Debido a que se ha demostrado que los efectos de *Azospirillum* como fitoestimulante pueden ser mejorados mediante su manipulación genética (microorganismos genéticamente modificados o MGM) de aislados nativos (WT), ECO-SAFE se ha enfocado en la obtención de inoculantes mejorados a base de bacterias GM. En consecuencia, en este proyecto también se pretende desarrollar estrategias que proporcionen información clave para determinar el impacto ecológico de la liberación de bioinoculantes GM y predecir su destino en el ambiente. ECO-SAFE propone liberar aislados WT y GM de *Azospirillum*, formulados como bioinoculantes, con una vida media aceptable, en ensayo de campos manejados según las prácticas de agricultura habitual y en interacción con diferentes niveles de fertilización de nitrógeno. Ya que *Azospirillum* es una bacteria particularmente adaptada a la rizósfera de los cereales, los cultivos propuestos para estas evaluaciones son trigo y maíz, cultivos claves en muchas aéreas de la Unión Europea (Basaglia, 2003).

Argentina como ejemplo del empleo de bioinoculantes a base de *Azospirillum*

Argentina es uno de los países a nivel mundial que ha adoptado más fuertemente los biofertilizantes a base de *Azospirillum*. La gran variabilidad en la respuesta de los cultivos a los inoculantes formulados con base en *Azospirillum*, la cual fluctúa entre valores negativos hasta superiores al 100% con relación a parcelas control, ha sido escasamente mencionada con anterioridad (Baldani *et al.*, 1987; Kaushik *et al.*, 2002; Mantelin y Touraine, 2004). Los efectos positivos son mencionados frecuentemente, pero también existen referencias sobre efectos neutros y negativos atribuidos a la

especificidad cepa-planta y a una posible competencia por nutrientes con la planta (Dobbelaere *et al.*, 2003; Kozdrój *et al.*, 2004). Existen numerosas referencias sobre variaciones en la colonización de las plantas en condiciones controladas (laboratorio e invernadero) atribuidas a: a) contenido de humedad del suelo (El-Komy *et al.*, 2003), b) distribución de las bacterias sobre la raíz con relación a las zonas con mayor tasa de crecimiento que producen más exudados promotores la colonización (Fischer *et al.*, 2003), c) especificidad cepa-planta (Ramey *et al.*, 2004) y d) competencia con microorganismos nativos (Saubidet *et al.*, 2002). Las agrupaciones de microorganismos que se han detectado para interpretar los factores que regulan la colonización en condiciones de campo indican que la alta variabilidad detectada a nivel general se mantiene en todos los agrupamientos microbianos (Abril *et al.*, 2006). La única excepción la constituye la duración del ciclo de los cultivares de trigo para una misma zona de cultivo y en un mismo ciclo. Estos resultados muestran que no existe diferencia en el grado de colonización según el origen de la cepa utilizada. Sin embargo, es de destacar que fueron pocos los casos considerados en los cuales se evaluaron las cepas nativas aisladas de la región semiárida de Córdoba, Argentina. Merece destacarse la gran diferencia encontrada en maíz en el Campo Escuela durante el ciclo 2003-2004 (Abril *et al.*, 2006). En este caso la colonización con una cepa nativa fue casi 70 veces más alta que con una cepa aislada en la Pampa Húmeda (INTA Az 39). Probablemente estos resultados se deban a que las cepas nativas poseen mayor competitividad en condiciones de estrés ya que durante el ciclo 2003-2004 las condiciones de humedad fueron limitantes para el crecimiento de maíz (precipitación= 247 mm). Numerosos autores mencionan que bajo condiciones de estrés la planta cancela la emisión de exudados a la raíz, lo que ocasiona la falta de alimento para las bacterias rizosféricas (Fischer *et al.*, 2000; Schulze y Pöschel, 2004). Cuando la fuente carbonada es escasa se produce una fuerte competencia entre los microorganismos cuyo resultado es la sobrevivencia de los mejor adaptados (Fischer *et al.*, 2000; Edge y Wyndham, 2002; Ramey *et al.*, 2004). La alta variabilidad en la colonización detectada entre diferentes cultivares de trigo en un mismo sitio y año de cultivo podría deberse a factores

de índole genético (Schulze y Pöschel, 2004). Sin embargo, la diferencia encontrada entre los cultivares según la duración de su ciclo, estaría indicando una interacción entre factores fenológicos y climáticos. Probablemente, las diferencias en la colonización entre cultivares de ciclo corto y largo dentro del mismo año de cultivo de trigo podrían deberse a las condiciones de estrés hídrico durante el período de antesis. Los cultivares de ciclo corto sembrados temprano pueden haber tenido mejores condiciones de humedad que los tardíos. En la región semiárida central de la Argentina la cantidad de agua para el cultivo de trigo depende más del agua almacenada en el suelo que de las precipitaciones registradas durante el cultivo que son escasas e impredecibles. Durante 2003, los cultivos se iniciaron con escasa humedad en el perfil del suelo y las primeras lluvias se registraron a inicios de octubre con sólo 18 mm. Probablemente los cultivares de ciclo largo soportaron déficit hídrico en antesis. No se detectó un patrón definido que permita explicar la alta heterogeneidad de los resultados, sin embargo se podría especular que los principales factores que pueden haber afectado el grado de colonización son: el estrés hídrico y el origen de las cepas del inoculante (Abril *et al.*, 2006). Bajo condiciones de estrés puede existir una fuerte competencia entre las poblaciones rizosféricas, situación en la cual las cepas nativas tienen ventaja por su mayor adaptación al medio.

Consideraciones finales

Actualmente la explicación más empleada para explicar el efecto estimulador de *Azospirillum* sobre el crecimiento de las plantas es la producción de fitohormonas, principalmente ácido indol acético (IAA), las cuales alteran el metabolismo y la morfología de las raíces para mejorar la absorción de agua y minerales y, consecuentemente, el rendimiento de las plantas. La contribución de *Azospirillum* a la fijación de N₂ es más controversial y a pesar del creciente aumento de la literatura sobre otros posibles mecanismos, éstos son en gran parte ignorados en revisiones sobre el tema de la promoción del crecimiento vegetal.

En un análisis global sobre la fisiología, vías metabólicas y mecanismos moleculares a través de los cuales ejerce *Azospirillum* su promoción de crecimiento en las plantas, aparentemente el IAA en conjunto con otras hormonas producidas por la bacteria juegan un papel fundamental. Se desconocen muchos aspectos fundamentales de la interacción bacteria-planta y, por ejemplo, nuestro conocimiento sobre su participación en la mitigación del estrés o control biológico de patógenos es casi nulo.

Desafortunadamente, con frecuencia el conocimiento sobre el metabolismo bacteriano se extrapola para explicar los posibles efectos sobre las plantas sin aportar evidencia sólida de que tal actividad es inexistente en la planta. En este campo de la investigación se emplean mutantes que son defectuosas en varios rasgos, pero en mucho menor grado que en campos relacionados como el control biológico de patógenos.

Para una determinación más precisa del papel de las fitohormonas en la promoción del crecimiento de plantas en general, y del IAA en particular, se requiere la generación de mutantes que estén totalmente afectadas en la producción de IAA y que conserven inalterados los otros caracteres de la cepa parental. Aunque se han obtenido diversos mutantes IAA-atenuadas, el objetivo primordial no se ha logrado todavía. Además, para establecer claramente si las hormonas son el principal mecanismo para promover el crecimiento de las plantas se necesita demostrar que otros mecanismos alternativos tienen un papel menor en la promoción de crecimiento. Sin embargo, hay mucha evidencia en contra de este supuesto derivada de experimentos de invernadero y campo (Van Dommelen *et al.*, 2003). La evidencia acumulada en los últimos años y que ha llevado a proponer que la teoría que la fijación de N_2 juega un papel secundario en la actividad promotora de crecimiento de *Azospirillum*, es prematura y debe ser reconsiderada. Adicionalmente, el papel de las moléculas de señal que inician la cascada de eventos y que inducen la respuesta en la planta, particularmente en las membranas de la raíz, también amerita reevaluación. Igualmente, muchos casos en los cuales la inoculación resulta en un aumento de la tolerancia de las plantas al estrés ambiental, merecen ser

evaluados en función de mecanismos no considerados hasta ahora, tales como el control de patógenos en las plantas. La diversidad de opciones para incrementar el crecimiento vegetal mediante la inoculación con *Azospirillum* nos llevó a proponer la “Teoría de Mecanismos Múltiples”, basada en el supuesto de que no es sólo un mecanismo, sino una combinación de éstos, el fundamento de la promoción del crecimiento en las plantas mediado por *Azospirillum*. Estos mecanismos pueden variar con las especies de las plantas, las cepas de *Azospirillum* y las condiciones ambientales prevalecientes durante la interacción. Este efecto puede ser acumulativo, como se propone por la “hipótesis aditiva” (Bashan y Levanony, 1990), donde los efectos de pequeños mecanismos, operando al mismo tiempo o consecutivamente, resultan en un efecto mayor en la planta.

El efecto en el crecimiento de las plantas también puede ser el resultado de mecanismos en tándem, o en cascada, en el que un mecanismo estimula otro para que finalmente resulten en un efecto promotor de crecimiento final en las plantas (como sería el caso de las posibles relaciones entre las hormonas de la planta, propiedades de la membrana y la proliferación de la raíz). Finalmente, la promoción del crecimiento puede ser el resultado de una combinación de mecanismos independientes que operan de acuerdo a las condiciones ambientales o de manejo agrícola en un determinado lugar. Estos incluyen la mitigación del estrés (sal, sequía, toxicidad) y el control biológico de microflora patógena. Esta teoría es inclusiva y puede cerrar los huecos entre las teorías propuestas y podría conducir a nuevo conocimiento acerca de la superposición y la cooperación entre los diferentes mecanismos que afectan el crecimiento de las plantas y que han sido estudiados hasta la fecha.

Bibliografía Citada

- Abril, A., Biasutti, C., Maich, R., Dubbini, L. and Noe, L. 2006. Inoculación con *Azospirillum* spp. en la region semiárida-central de Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica. *Ci. Suelo* 24:11-19.
- Albrecht, S.L., Okon, L., Lonquist, Y. and Burris, R.H. 1981. Nitrogen fixation by corn-*Azospirillum* associations in a temperate climate. *Crop Sci.* 21:301-306.
- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. and Döbereiner, J. 1987. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biol. Fertil. Soils.* 4:37-40.
- Basaglia, M. 2003. Field released of genetically marked *Azospirillum brasilense* in association with *Sorghum bicolor*. *Plant Soil* 256:281-290.
- Bashan, Y. 1986a. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biol. Biochem.* 18:297-301.
- Bashan, Y. 1986b. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *J. Gen. Microbiol.* 132:3407-3414.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16:729-770.
- Bashan, Y. and González, L.E. 1999. Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:262-266.
- Bashan, Y. and Holguin, G. 1997a. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43:103-121.
- Bashan, Y. and Holguin, G. 1997b. Short- and medium term avenues for *Azospirillum* inoculation *In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present Status and Future Prospects.* Ogoshi, A., Kobayashi, K., Homma, Y., Kodama, F., Kondo, N. and Akino, S. (eds.). Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Bashan, Y. and Levahony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36:591-608.

- Bashan, Y. and Levanony, H. 1987. Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. *J. Gen. Microbiol.* 133:3473-3480.
- Bashan, Y. and Levanony, H. 1988. Interaction between *Azospirillum brasilense* Cd and wheat root cells during early stages of root colonization. *In: Azospirillum IV, Genetics, Physiology, Ecology.* Klingmüller, W. (ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Bashan, Y., Hernández, J.P., Leyva, L.A. and Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 35:359-368.
- Caballero-Mellado, J., Carcano, M., Montiel, M.G. and Mascarua-Esparza, M.A. 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. *Symbiosis* 13:243-253.
- Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-de los Santos, P. and Martínez-Aguilar, L. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5308-5319.
- Carrillo, A. and Bashan, Y. 1997. Microencapsulation as a potential carrier for plant growth-promoting bacteria. *In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present Status and Future Prospects.* Ogoshi, A., Kobayashi, K., Homma, Y., Kodama, F., Kondo, N. and Akino, S. (eds.) Faculty of Agriculture, Hokkaido University Sapporo, Japan.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Essaid, A.B. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4951-4959.
- Cvijanovi, G., Jovanovic, Z., Govedarica, M., Milosevic, N. and Cvijanovic, D. 2005. Ecological and economic effects of the bacterization application within a system of sustainable agriculture. *Savremena poljoprivreda* 54:115-119.
- De-Bashan, L.E., Antoun, H., and Bashan, Y. 2008. Involvement of indole-3-acetic-acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. *J. Phycol.* 44:938-947.
- De-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. and Bashan, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *In: Microbiología Agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo.* Ferrera-Cerrato, R. and Alarcón, A. (eds). Editorial Trillas, México.

- Díaz-Zorita, M. and Fernández-Canigia, M.V. 2009. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur. J. Soil Biol.* 45:3-11.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., and Okon, Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Rev. Plant Sci.* 22:107-149.
- Döbereiner, J. and Baldani, V.L.D. 1979. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25:1264-1269.
- Edge, T. and Wyndham, C. 2002. Predicting survival of a genetically engineered microorganism, *Pseudomonas chlororaphis* 3732RN-L11, in soil and wheat rhizosphere across Canada with linear multiple regression models. *Can. J. Microbiol.* 48:717-727.
- El-Komy, H.M., Hamdia, M.A. and El-Baki, G.K.A. 2003. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. *Biol. Plant.* 46:281-287.
- Fages, J. 1990. An optimized process for manufacturing an *Azospirillum* inoculant for crops. *Appl. Microbiol. Biotech.* 32:473-478.
- Fages, J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: Formulation and application technology. *Symbiosis* 13:15-26.
- Fages, J. and Lux, B. 1991. Identification of bacteria isolated from roots of sunflower (*Helianthus annuus*) cultivated in a French Soil. *Can. J. Microbiol.* 37:971-974.
- Fallik, E. and Okon, Y. 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem.* 28:123-126.
- Fischer, S., Rivarola, V. and Mori, G. 2000. Colonization of wheat by *Azospirillum brasilense* Cd is impaired by saline stress. *Plant Soil* 225:187-191.
- Fischer, S.E., Miguel, M.J., and Mori, G.B. 2003. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 219:53-62.
- Govedarica, M., Milosevic, N., Jarak, M., Milosev, D. and Djuric, S. 1997. Diazotrophs and their activity in pepper. *Acta Hort.* 462:725-732.
- Grandy, A.S. and Robertson, G.P. 2006. Do productivity and environmental trade-offs justify periodically cultivating no-till cropping systems?. *Agron. J.* 98:1377-1383.

- Heijnen, C.E. and Van Elsas, J.D. 1994. Metabolic activity of bacteria introduced into soil. *In: Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. Ryder, M.H., Stephens, P.M., Bowen, G.D. (eds). CSIRO, Adelaide, South Australia.
- Iswaran, V. 1972. Growth and survival of *R. trifolii* in coir dust and soybean meal compost. *Madras Agric. J.* 59:52-53.
- Kaushik, R., Saxena, A.K. and Tilak, K.V.B.R. 2002. Can *Azospirillum* strains capable of growing at a sub-optimal temperature perform better in field-grown-wheat rhizosphere. *Biol. Fertil. Soils* 35:92-95.
- Kozdrój, J., Trevors, J.T. and Van Elsas, J.D. 2004. Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 36:1775-1784.
- Levanony, H. and Bashan, Y. 1990. Avidin-biotin complex incorporation into enzyme-linked immunosorbent assay (ABELISA) for improving the detection of *Azospirillum brasilense* Cd. *Curr. Microbiol.* 20:91-94.
- Lilly, S.S. and Santhanakrishnan, P. 1999. Granulation of VA mycorrhizal inoculum. *Madras Agric. J.* 86:256-259.
- Mantelin, S. and Touraine, B. 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55:27-34.
- Mrkovaki, N., Cacic, N., Mezei, S., Kovaev, L. and Nagl, N. 2009. Effect of biofertilizer application in sugar beet. *Zbornik Radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 46:175-179.
- Neyra, C.A., Atkinson, A. and Olubayi, O. 1995. Coaggregation of *Azospirillum* with other bacteria: basis for functional diversity. *In: Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology*. Fendrik, I., Del Gallo, M., Vanderleyden, J., De Zamaroczy, M. (eds). Springer Verlag, Nato ASI Series/Ecological Sciences. Berlin, Heidelberg.
- Paul, E., Fages, J., Blanc, P., Goma, G. and Pareilleux, A. 1993. Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:34-39.

- Pedraza, R.O, Bellone, C.H., de Bellone, S.C., Sorte, P.M.F.B. and Teixeira, K.R.S. 2009. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *Eur. J. Soil Biol.* 45:36-43.
- Ramey, E.B., Koutsoudis, M., von Bodman, B.S. and Fuqua, C. 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr. Op. Microbiol.* 7:602-609.
- Reynders, L. and Vlassak, K. 1982. Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. *Plant Soil* 66:217-223.
- Sabaratnam, S. and Traquair, J.A. 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biol. Control* 23:245-253.
- Sadasivan, K.V., Negi, M. and Tilak, K.V.B.R. 1986. Survival of *Azospirillum brasilense* and *Azotobacter chroococcum* in organic-amended soil-based carriers. *Zentralbl. Mikrobiol.* 141:567-570.
- Saleh, S.A., Mekhemar, G.A.A., Abo El-Soud, A.A., Ragab, A.A. and Mikhaeel, F.T. 2001. Survival of *Azorhizobium* and *Azospirillum* in different carrier materials: inoculation of wheat and *Sesbania rostrata*. *Bull. Fac. Agric. Univ. Cairo* 52:319-338.
- Saubidet, I.M., Fatta, N. and Barneix, A.J. 2002. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant Soil* 245:215-222.
- Schulze, J. and Pöschel, G. 2004. Bacterial inoculation of maize affects carbon allocation to roots and carbon turnover in the rhizosphere. *Plant Soil* 267:235-241.
- Shaheen, A.M., Fatma, A., Rizk, O., Sawan, M. and Ghoname, A.A. 2007. The integrated use of bio-inoculants and chemical nitrogen fertilizer on growth, yield and nutritive value of two Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) cultivars. *Aust. J. Bas. Appl. Sci.* 1:307-312.
- Smith, B.E. and Eady, R.R. 1992. Metalloclusters of the nitrogenases. *Eur. J. Biochem.* 205:1-15.
- Smith, R.L., Schank, S.C. and Littell, R.C. 1984. The influence of shading on associative N₂ fixation. *Plant Soil* 80:43-52.
- Trevors, J.T. 1996. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *J. Microbiol. Met.* 26:53-59.
- Van Dommelen, A., Keijers, V., Wollebrants, A. and Vanderleyden, J. 2003. Phenotypic changes resulting from distinct point mutations in the *Azospirillum brasilense* glna gene, encoding glutamine synthetase. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5699-5701.

Van Elsas, J.D., Dijkstra, A.F., Govaert, J.M. and Van Veen, H.A. 1986. Survival of *Pseudomonas fluoresces* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots. FEMS Microbiol. Ecol. 38:150-160.

Capítulo 8

Uso de *Trichoderma* como Agente Promotor del Crecimiento Vegetal

Juan Manuel González Prieto y Victor Hugo Reséndiz Arvizu
Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro de Biotecnología Genómica
Instituto Politécnico Nacional
Boulevard del Maestro S/N esq. Elías Piña, Col. Narciso
Mendoza, Cd. Reynosa, Tam. C.P. 88710

*Autor de correspondencia

email: jmgonzalezp@ipn.mx; jumagopr@yahoo.com.mx

Tel: (899)9243627 ext. 87737

Los microorganismos asociados a las plantas son importantes para un crecimiento vegetal saludable (Harman, 2006). Adicionalmente, estos microorganismos incrementan la tolerancia al estrés de las plantas, proveen resistencia a enfermedades y ayudan a incrementar la disponibilidad y adquisición de nutrientes a las plantas.

La promoción del crecimiento vegetal mediada por los microorganismos está basada en el incremento en la disponibilidad de nutrientes y la estimulación hormonal de la planta. La zona de acción de los microorganismos asociados a la planta es la rizósfera, o la zona del suelo aledaña a las raíces de la planta, donde existe un flujo de compuestos orgánicos que sirven como fuente de carbono para los microorganismos, y éstos, a su vez, hacen disponibles nutrientes, minerales y agua a las plantas (Morgan *et al.*, 2005). En la rizósfera existen diferentes tipos de relaciones entre los microorganismos, como la competencia, la simbiosis y el parasitismo. Los microorganismos que establecen relaciones benéficas con las plantas son utilizados para la formulación de biofertilizantes (Aguirre-Medina *et al.*, 2009)

Los biofertilizantes son productos que poseen microorganismos vivos, que se aplican al suelo, semillas o superficies de plantas; colonizan la raíz de la planta, o el interior de ésta, y estimulan el crecimiento vegetal al aumentar la disponibilidad de nutrientes, minerales y agua.

Entre los organismos que son utilizados como biofertilizantes se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria), además de especies fúngicas como los hongos micorrizogénos y otras especies.

Los biofertilizantes basados en microorganismos constituyen una estrategia importante para disminuir el uso de los insumos químicos y su impacto nocivo en el ambiente, además de posibilitar la obtención de importantes ahorros económicos, incrementar el rendimiento de los cultivos, mejorar la sanidad de las plantas y restablecer las características fisicoquímicas y biológicas de los suelos (Peralta-Díaz, 2007). Estos productos son más seguros, reducen el riesgo potencial a la salud humana, poseen una actividad específica, muestran efectividad en dosis pequeñas, su multiplicación está controlada por la planta y la microflora nativa, sufren una descomposición más rápida que los compuestos químicos y pueden usarse en combinación con estos últimos para lograr sinergismos en la productividad agrícola y reducir la contaminación ambiental. Actualmente existen en el mercado una amplia gama de biofertilizantes, y su utilización ha aumentado: El interés por investigar a fondo los mecanismos de acción que dan como resultado un incremento de la productividad vegetal tiene la finalidad de aumentar la efectividad y consistencia de estos productos (Thakore, 2006; Berg, 2009).

Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal mediados por microorganismos

Algunos mecanismos como el control de fitopatógenos están indirectamente relacionados con el crecimiento de las plantas (Punja y Utkhede, 2003; Reséndiz-Arvizu, 2009). Dependiendo de su mecanismo de acción o función, los microorganismos pueden ser utilizados como bioestimulantes, bioplaguicidas o biofertilizantes, o en algunos casos para más de uno de estos propósitos (Fig. 1).

En la mayoría de los casos el efecto de la promoción del crecimiento vegetal es difícil de diferenciar de la supresión de la enfermedad, sin embargo,

en cualquier condición la colonización de la superficie vegetal es primordial. El tejido radical es importante para la colonización puesto que en este lugar se lleva a cabo la comunicación mediante señales químicas entre la planta y los microorganismos (Bais *et al.*, 2006; Berg, 2009).

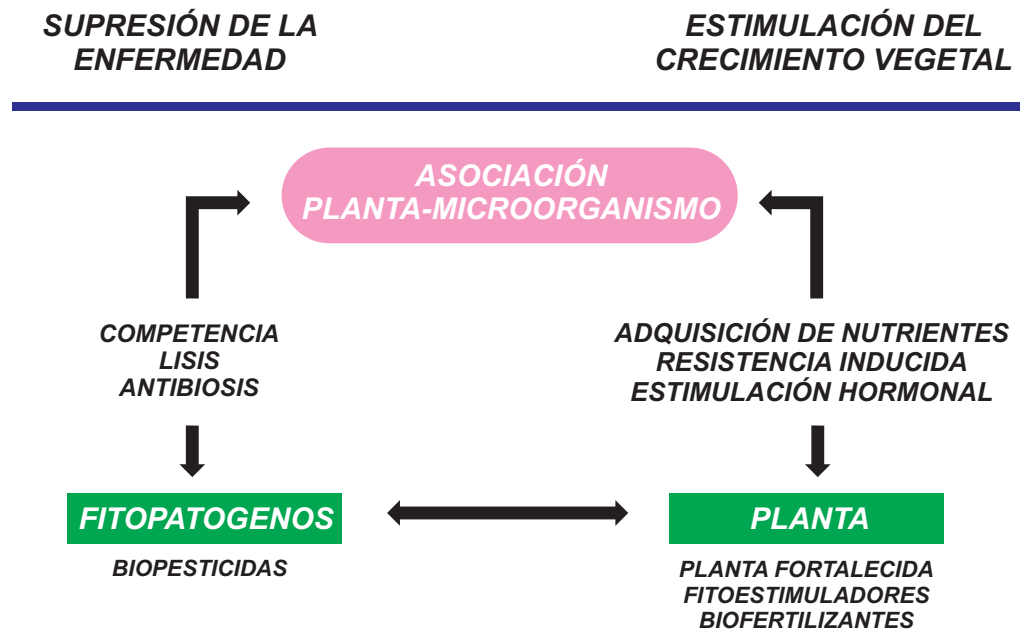


Figura 1. Mecanismos de acción de los microorganismos en la relación planta-microorganismo, promoción del crecimiento vegetal y salud de la planta. Modificado de Berg (2009).

Biofertilizantes de origen fúngico

Existen diversas especies de hongos que colonizan el sistema radicular de las plantas sin ocasionar enfermedad, entre ellos están las micorrizas y diversas especies del género *Trichoderma* (Punja y Utkhede, 2003; Harman, 2011a). Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) establecen una simbiosis mutualista con la mayoría de las plantas, angiospermas, gimnospermas y briofitas. La asociación con la planta es muy estrecha e implica la penetración de las células corticales de la raíz para formar arbusculos, donde se intercambian nutrientes y fuentes de carbono. Los HMA son biótrosfos obligados y se han descrito cerca de 150 a 200 especies (Morgan *et al.*, 2005). El empleo

de HMA en cultivos agrícolas, optimiza la nutrición, el crecimiento de las plantas y les permite superar situaciones de estrés biótico y abiótico. Los HMA son compatibles con bacterias fijadoras de nitrógeno y con algunos fertilizantes químicos (Mena-Violante *et al.*, 2007).

El género *Trichoderma*

La primera descripción del género *Trichoderma* fue realizada por Persoon en 1794 y posteriormente en 1865 Tulasne sugirió la fase sexual de este género (Schuster y Schmoll, 2010). El género *Trichoderma* incluye diversas especies de vida libre que están presentes en suelos y raíces de plantas, y que pueden ser oportunistas, avirulentas, productoras de antibióticos y vivir como endófitos simbioses de plantas o parásitos de otros hongos (Harman *et al.*, 2004; Harman, 2011a, 2011b). Este grupo de hongos está conformado por más de 100 especies bien definidas (Druzhinina *et al.*, 2006). Desde la década de 1930, se reconocen diversas especies del género *Trichoderma* como agentes biocontroladores de microorganismos fitopatógenos (Weindling, 1932), y a partir de la década de 1990 su comercialización y empleo en la agricultura aumentó con éxito (Harman, 2011b).

Debido a que colonizan el sistema radicular de las plantas es conocido que este grupo de hongos tienen la capacidad de producir compuestos que desencadenan respuestas de resistencia local y sistémica en la planta. Además, dicha colonización promueve el crecimiento de la raíz, estimula el desarrollo de la planta e induce resistencia a estrés de tipo biótico y abiótico, facilitando la captación y uso de nutrientes, lo que se ve reflejado en un incremento de la producción y rendimiento de los cultivos (Harman *et al.*, 2004).

Trichoderma spp. como bioestimulante del crecimiento vegetal

En la década de 1980, se realizaron experimentos con especies de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma koningii* para examinar la promoción del crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Incrementos en la tasa de germinación de las semillas

de ambas plantas fueron observadas cuando se trataron con las especies de *Trichoderma*. Resultados similares fueron obtenidos al analizar el peso seco de las raíces y la altura de plantas, obteniéndose incrementos cercanos al 300% en comparación con las plantas no tratadas con los hongos. Los resultados del experimento no se vieron alterados al incorporar algunas especies fúngicas como *Aspergillus* sp., *Fusarium* spp., *Mucor* sp., *Penicillium* spp. o *Rhizopus* sp. Paralelamente cuando fueron utilizados filtrados que contenían metabolitos producidos por aislados de *Trichoderma* spp. para examinar su efecto sobre la germinación de semillas de tomate, tabaco y maíz (*Zea mays* L.), el tiempo de germinación se acortó de 1 a 3 días en las semillas expuestas a los filtrados. Los autores concluyeron que los aislados de *Trichoderma* produjeron un factor regulador del crecimiento que incrementó la germinación de las semillas, así como el peso seco de la raíz y de la planta (Windham *et al.*, 1986). Este hallazgo constituyó el primer acercamiento para establecer el mecanismo por el cual *Trichoderma* spp. estimula el crecimiento de las plantas.

Posteriormente, Kleifeld y Chet en 1992, determinaron la promoción del crecimiento vegetal mediado por un aislado de *T. harzianum* sobre semillas y plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.), tomate (*L. esculentum* L.), chile (*Capsicum annum* L.) y pepino (*Cucumber sativus* L.). El experimento fue realizado utilizando diversos medios (suelo y salvado de trigo) y bajo diferentes esquemas de aplicación (agregando una suspensión de conidias al medio o recubriendo las semillas con conidias). El aislado fúngico empleado incrementó la germinación de las semillas, el tamaño y área de las hojas, particularmente cuando se usó suelo franco-arenoso como soporte. A partir de la comparación de estos resultados con los encontrados en suelo estéril se sugiere que el efecto de promoción del crecimiento radica en la habilidad del hongo para colonizar la raíz de la planta, más que la protección contra patógenos. Adicionalmente, y a semejanza de lo que acontece en los hongos micorrízicos, los autores confirmaron la presencia del hongo dentro de la epidermis de la raíz, lo que lleva a proponer que existe más de un mecanismo involucrado en actividad benéfica del hongo y que la estimulación del crecimiento en la planta puede ser más benéfica que su utilidad como agente de biocontrol.

Dos años más tarde, el grupo de Chet realizó un experimento similar bajo condiciones comerciales de invernadero utilizando plantas de pepino y chile. En comparación con las plantas control no tratadas, estos investigadores obtuvieron un aumento de aproximadamente del 20% en la altura de las plantas, 96 y 50% de incremento en el área foliar de las plantas de pepino y chile, respectivamente, y 25% más de peso seco en las plántulas de ambos cultivos. Además, estos autores encontraron un aumento en las actividades enzimáticas de la β -1,3 glucanasa y la quitinasa, sugiriendo que *Trichoderma* estimula los mecanismos de defensa de la planta (Inbar *et al.*, 1994). Ousley *et al.* (1994) experimentaron con seis cepas de *Trichoderma* spp. para evaluar su capacidad de estimular el crecimiento de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) y encontraron que el efecto en el crecimiento no sólo depende de la especie empleada, sino también de la concentración del inóculo.

A finales del siglo pasado, se dio un paso importante para entender los mecanismos de acción a través de los cuales *Trichoderma* promueve el crecimiento vegetal y controla organismos fitopatógenos. Para ello, la cepa *T. harzianum* T-22 fue evaluada para determinar su capacidad de solubilizar algunos minerales insolubles considerando tres posibilidades: acidificación del medio, producción de agentes quelantes y actividad redox. Los resultados demostraron que la cepa T-22 produjo un metabolito difundible capaz de reducir Fe^{+3} y Cu^{+2} y solubilizar fosfato. Este constituyó el primer reporte de la capacidad de solubilizar minerales insolubles por *Trichoderma* y explicó parcialmente su función en la promoción del crecimiento vegetal al aumentar la disponibilidad de los minerales para la planta (Altomare *et al.*, 1999).

Es importante comentar que otros estudios fueron realizados en esa época para tratar de entender el mecanismo de acción de *Trichoderma* como agente de control biológico y promotor del crecimiento de las plantas (Naseby *et al.*, 2000). Harman en el 2000, realizó una recopilación bibliográfica para explicar ambos procesos en *Trichoderma*. Encontró que el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia por nutrientes y espacio, estaban ampliamente documentados y aceptados. Aunque el autor obtuvo evidencia relacionada con

actividades del hongo que incrementan la tolerancia al estrés por medio de la colonización de la raíz y un desarrollo saludable de la planta, la inducción de resistencia en la misma, solubilización y secuestro de nutrientes inorgánicos e inactivación de enzimas patogénicas, cabía la posibilidad de que existieran otros mecanismos aún por descubrir (Harman, 2000; Harman, 2011b).

Una evidencia de la inducción de la resistencia en la planta fue obtenida por Yedidia *et al.* en 1999 al evaluar la capacidad de *T. harzianum* T-203 para desencadenar respuestas de defensa en plántulas de pepino inoculadas en la raíz con este hongo en un sistema aséptico e hidropónico. Las plantas tratadas con *Trichoderma* se desarrollaron más que las no tratadas y la penetración de *Trichoderma* estuvo restringida a la epidermis y la corteza externa de las raíces. Además, la inoculación con este hongo aumentó las actividades enzimáticas de peroxidasas y quitinasas. Estos resultados fueron observados en las raíces y las hojas de las plantas tratadas proporcionando evidencia de que *T. harzianum* es capaz de inducir un mecanismo de resistencia en la planta. Al año siguiente, este autor demostró que las raíces de las plantas de pepino con *Trichoderma*, producen una serie de proteínas relacionadas con la patogénesis, así como enzimas hidrolíticas; estos resultados fueron semejantes a los obtenidos cuando las plantas fueron adicionadas con un compuesto que activa el sistema de defensa de las plantas (Yedidia *et al.*, 2000; Howell, 2003).

Existen diversos reportes de la inducción de la resistencia local y sistémica a patógenos en las plantas mediada por *Trichoderma*, que incluyen la primera publicación por Bigirimana *et al.* (1997) hasta una serie de resultados que refieren la inducción de la resistencia de las plantas a hongos, oomicetos, bacterias y virus (Harman *et al.*, 2004; Harman, 2006). La naturaleza de los compuestos de *Trichoderma* que inducen los mecanismos de defensa de la planta son de tres clases: a) enzimas como una xilanasa de 22kDa que induce la producción de etileno y péptidos que oscilan entre los 6.2 y 42 kDa y que son producidos por *T. virens* para inducir la síntesis de fitoalexinas (terpenoides) y actividades de peroxidasa en algodón, b) proteínas codificadas por los genes *Avr4* y *Avr9* de *Cladosporium fulvum* y que son sintetizadas por las cepas T-22

y P1 de *T. atroviride* y c) oligosacáridos y compuestos de bajo peso molecular que son secretados por *Trichoderma* en presencia de paredes celulares de patógenos y plantas (Harman *et al.*, 2004).

Recientemente, Jyotsna *et al.* (2008) obtuvieron un incremento considerable en el crecimiento de plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) tratadas con una cepa de *T. harzianum* en términos de distintas variables evaluadas en invernadero que incluyeron altura y peso seco de planta, longitud y área de la raíz, así como contenido de clorofila. Los autores atribuyeron estos efectos a la capacidad del hongo para producir fitohormonas y vitaminas, concluyendo que estas actividades de promoción de crecimiento, en adición a su capacidad para controlar al patógeno *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid causante de la pudrición del tallo, hacían factible la explotación comercial de esta cepa de *Trichoderma*.

Se han empleado diversas técnicas moleculares, como la proteómica, para estudiar la interacción de *Trichoderma* con la raíz de las plantas. Como resultado se han identificado algunos de los genes que son expresados en los brotes de las plantas de maíz cuando son inoculados en la raíz con la cepa T-22. Los resultados indican que la mayoría de los genes regulados corresponden a los relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, respuesta a estrés, metabolismo de ácidos nucleicos, metabolismo de la pared celular y con la resistencia a patógenos (Shoresh y Harman, 2008).

Algunas cepas de *Trichoderma* proveen beneficios tales como el incremento de la tolerancia de las plantas al estrés abiótico como la sequía. Bae *et al.* (2009) probaron los efectos de la inoculación de *Trichoderma hamatum* en plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en respuesta a déficit hídrico. En presencia o ausencia del factor estresante, la colonización por *T. hamatum* promovió la germinación y crecimiento de las plántulas e incrementó el peso fresco y peso seco de la raíz, así como los contenidos de agua en este órgano. Resultados semejantes, aunque con algunos síntomas diferentes, fueron observados cuando las plantas fueron regadas con 75 mM de NaCl (Harman, 2011b).

Como se mencionó anteriormente, la colonización del sistema radicular y la comunicación entre la planta y el hongo son pasos determinantes para el establecimiento de una relación simbiótica exitosa. Vargas *et al.* (2009) demostraron que la sacarosa proveniente de la planta es una fuente importante y crítica para la colonización de la raíz por parte de *T. virens*; una invertasa del hongo es la clave para iniciar el proceso de colonización de la raíz. La hidrólisis de la sacarosa es necesaria para la activación del gen *Sm1* que codifica una molécula inductora que activa sistemáticamente los mecanismos de defensa en las hojas. Una proteína de *T. asperellum* importante en la colonización fue caracterizada como una swollenina que contiene un motivo de unión a celulosa en la región amino terminal, mientras que en el extremo carboxilo posee un dominio tipo expansina. Mutantes de *T. asperellum* que sobreexpresan esta proteína tienen la capacidad de colonizar raíces de plantas de pepino a pocas horas de su inoculación. La región amino terminal, o dominio de unión a celulosa, fue suficiente para estimular los mecanismos de defensa de la planta en raíz y hojas, confiriendo resistencia a la infección por los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, lo que indica que este dominio es reconocido por la planta como una señal molecular en su interacción con *T. asperellum* (Brotman *et al.*, 2008).

Las auxinas son fitohormonas que están relacionadas con el crecimiento de células vegetales. *T. virens* estimula la producción de biomasa y promueve el crecimiento de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana* mediante un mecanismo dependiente de auxinas (ácido indolacético, indol-3-acetaldehído e indol-3-etanol). Cuando se crecen plántulas de *A. thaliana* en presencia de este hongo se observa un crecimiento similar al que inducen las auxinas. Contrariamente, cuando mutantes de *A. thaliana* afectadas en los genes que codifican para la señalización y transporte de auxinas son puestas en contacto con este hongo se observa una disminución en el crecimiento de la plántula y el desarrollo de la raíz (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009).

Durante la asociación de *Trichoderma* con la raíz, el hongo modula la expresión genética de la planta, originando una alteración en la respuesta a su

ambiente. Entre los beneficios que otorga esta asociación a la planta se pueden mencionar un incremento del crecimiento vegetal, especialmente en la raíz bajo condiciones de estrés, inducción de la resistencia sistémica a enfermedades (las vías del jasmonato y salicilato pueden estar involucradas), incremento del vigor en semillas de baja calidad y el mejoramiento del uso de fuentes nitrogenadas por las plantas (la cantidad de fertilizante aplicado a los cultivos puede reducirse entre 40-50% en presencia de *Trichoderma*). Está claro que los beneficios anteriores sólo se pueden alcanzar si las raíces de las plantas están colonizadas por cepas de *Trichoderma* altamente efectivas (Harman, 2011a).

Respecto al empleo de diversas especies de *Trichoderma* como agentes biocontroladores de patógenos, se reconoce que la mayor parte esta actividad está más ligada con su capacidad para inducir en las plantas una respuesta sistémica que con sus capacidades de micoparasitismo y antibiosis. Al utilizar ciertos mutantes de este hongo se ha encontrado que el efecto de biocontrol es debido a la inducción de resistencia en las plantas y ahora se sabe que esta respuesta está extendida tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (Shoresh *et al.*, 2010; Harman, 2011b).

Una gran ventaja del uso de *Trichoderma* como bioestimulante del crecimiento vegetal, es que la resistencia inducida a la planta es de larga duración, incluso meses después de su aplicación, además de que este hongo es resistente a la mayoría de los pesticidas lo cual facilita las prácticas de control integrado en los cultivos. Para lograr lo anterior, una buena estrategia consiste en el uso de semilla tratada con una cepa efectiva de *Trichoderma* y la aplicación de un pesticida; el producto químico proveerá protección a corto plazo contra microorganismos dañinos, mientras *Trichoderma* colonizará la rizósfera y proveerá beneficios de largo plazo a la planta.

Aunque los efectos inducidos en la planta por *Trichoderma* requieren de energía y este gasto, en teoría, conllevaría a una reducción en el crecimiento de la planta, los resultados muestran lo contrario, un incremento del crecimiento vegetal. La única fuente de energía para las plantas es la luz solar y *Trichoderma* tiene la capacidad de incrementar la eficiencia de la fotosíntesis (Vargas *et al.*, 2009; Harman, 2011b).

Otra ventaja más del empleo de cepas de *Trichoderma* para la promoción del crecimiento vegetal se relaciona con capacidad para vivir en la rizósfera de las plantas y las cantidades tan pequeñas que se requieren de este hongo para proveer beneficios de largo plazo. Para el tratamiento de la semilla tan sólo bastan 500 mg ha⁻¹ de un concentrado comercial, mientras que para la inoculación de suelos en experimentos en invernadero sólo son necesarias 10⁴-10⁵ unidades formadoras de colonia o esporas por mililitro (Harman, 2011b).

Utilizando prácticas estándar de producción en el cultivo de maíz en Estados Unidos, el rendimiento promedio es de 820 kg ha⁻¹ con un costo de producción de \$442 dólares. Empleando este hongo en los estados de Ohio e Illinois se alcanzaron rendimientos de 2,500 kg ha⁻¹, mientras que en Pensilvania y Iowa estos valores fueron de 1,500 kg ha⁻¹ y 1,200 kg ha⁻¹, respectivamente. Considerando estos aumentos en el rendimiento y que el precio del inóculo de *Trichoderma* por hectárea en Estados Unidos es de \$8 dólares, son claras las ventajas del empleo de *Trichoderma* en este importante cultivo (Harman, 2011b).

Finalmente, es importante enfatizar que los beneficios de *Trichoderma* sobre las plantas son generalmente específicos de cada cepa, por lo que no es posible generalizar sobre sus capacidades y asumir que distintas cepas de este hongo funcionarán igual o darán los mismos resultados para un mismo cultivo en un ambiente determinado.

Con el fin de tipificar cepas efectivas de *Trichoderma*, en nuestro grupo de trabajo se implementó una estrategia basada en el análisis *in silico* de la región ITS del DNA ribosomal para desarrollar huellas genéticas mediante la técnica de ARDRA (análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado). Con esta metodología y el uso de tres endonucleasas, se pudo asignar un patrón de restricción único para cada una de las secuencias de las regiones ITS de las especies de *Trichoderma* e *Hypocrea* (la fase sexual del hongo) que están disponibles en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y del GenBank. Con base en esta estrategia se pudieron identificar de forma práctica las especies de *Trichoderma* que experimentalmente han

sido utilizadas con fines de biocontrol o de promoción del crecimiento vegetal (Hernández-Ramos, 2010). El trabajo anterior fue galardonado con el premio AgroBio 2010 a la mejor tesis de licenciatura en el área de la Biotecnología en México.

Un ejemplo de que las capacidades estimuladoras del crecimiento vegetal por *Trichoderma* son específicas de cada cepa es ilustrado por el trabajo realizado por Hoyos-Carvajal *et al.* (2009). En esta investigación se analizó la habilidad de 101 aislados de *Trichoderma* para producir diversos metabolitos (producción de sideróforos, síntesis de auxinas y actividad de solubilización de fosfatos) y su relación con el incremento en el crecimiento de plantas de frijol. Los autores concluyeron que no existe relación entre los metabolitos producidos con el desarrollo de la raíz y la parte aérea de la planta en el estado fisiológico V3. La capacidad de síntesis de los metabolitos estudiados fue muy variable entre aislados de una misma especie. Siete aislados promovieron el crecimiento de la planta, pero no mostraron correlación con los metabolitos producidos e incluso algunas de las cepas no sintetizaron estos compuestos (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009).

Existen diversos ejemplos en los cuales ciertas especies de *Trichoderma* han sido empleadas para controlar diferentes patógenos fúngicos que afectan el sistema radical de diferentes cultivos y como promotores del crecimiento vegetal. Tal es el caso en el que Dubey *et al.* (2006) utilizaron aislamientos nativos de *T. viride*, *T. virens* y *T. harzianum* para controlar *F. oxysporum* en garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Los resultados reportados por estos autores muestran que al tratar las semillas con una suspensión de esporas (10^6 esporas ml^{-1} por cada 10 g semillas) en combinación con carboxina (2 g kg^{-1} semilla) la germinación de las semillas fue mejorada entre 12 y 14%, mientras que el rendimiento de grano fue incrementado entre 42.4% y 72.9%; además se observó una reducción de 44.1% a 60.3% en la incidencia de la pudrición causada por *F. oxysporum*.

Identificación de aislados de *Trichoderma* con actividad de promoción de crecimiento en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Biotecnología Genómica-IPN

En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Biotecnología Genómica del IPN se está llevando a cabo en los últimos dos años un proyecto de investigación para aislar especies de *Trichoderma* nativas del estado de Durango con actividad de biocontrol contra los patógenos que causan la pudrición de la raíz del frijol y con actividad de promoción de crecimiento vegetal (Reséndiz-Arvizu, 2009). Para ello, se identificaron molecularmente los aislados de *Trichoderma* y los microorganismos patogénicos a estudiar (Fig. 2).

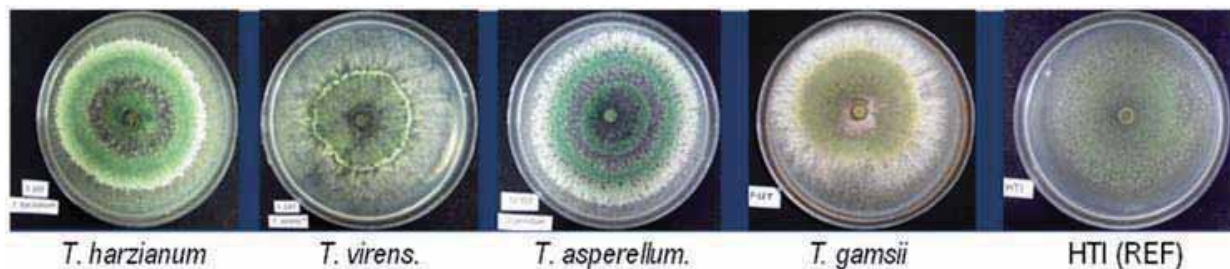


Figura 2. Aislamientos de *Trichoderma* spp. caracterizados molecularmente. La cepa HTI de *Trichoderma* sp. fue utilizada como referencia.

Pruebas de promoción del crecimiento de la planta en invernadero

Experimentos de antagonismo y promoción del crecimiento vegetal por *Trichoderma* fueron realizados bajo condiciones de invernadero. Los aislamientos del antagonista correspondieron a las especies *T. virens*, *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. gamsii*; como referencia se usó una cepa de *T. harzianum* proporcionada por el Dr. Alfredo Herrera del CINVESTAV-LANGEBIO Irapuato. Los hongos confrontados fueron *M. phaseolina*, *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, puesto que fueron los patógenos de mayor incidencia asociados a la pudrición de la raíz en frijol en el estado de Durango. El sustrato empleado para los experimentos consistió en una mezcla de 75% de suelo y 25% de vermiculita y en la parte superior de la maceta se agregó ½ kg de suelo estéril para inocular el patógeno. El suelo agrícola utilizado se obtuvo de un

cultivo de sorgo del ejido Alfredo V. Bonfil del municipio de Reynosa. La variedad de frijol correspondió a Pinto Saltillo. Cada semilla se inoculó con una solución de esporas del antagonista a una concentración de 1×10^6 esporas/ml.

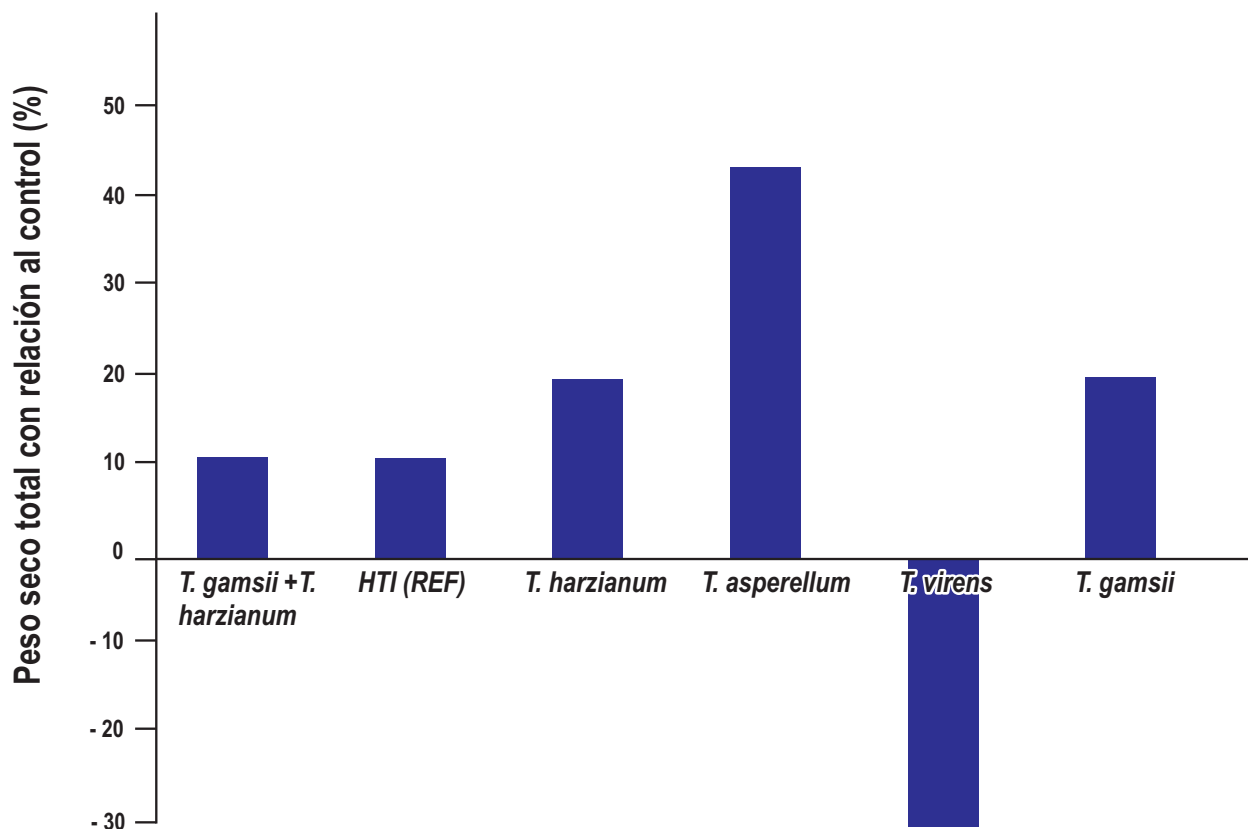


Figura 3. Efecto de la inoculación de distintos aislados de *Trichoderma* sobre el peso seco total de las plantas de frijol con relación a plantas control no inoculadas.

Para el caso de los fitopatógenos el suelo se inoculó con 1×10^6 esporas de *Fusarium* o 4 discos de 5 mm de diámetro de un cultivo de *M. phaseolina* crecido en PDA. Cada unidad experimental consistió en una maceta con 4 semillas y para el arreglo de las macetas se consideró un diseño completamente al azar. Los tratamientos fueron: planta + patógeno, planta + *Trichoderma*, sólo planta y planta + *Trichoderma* + patógeno, con 6 repeticiones. Las variables evaluadas fueron porcentaje de establecimiento, peso seco de vástago y raíz, altura de planta y área foliar.

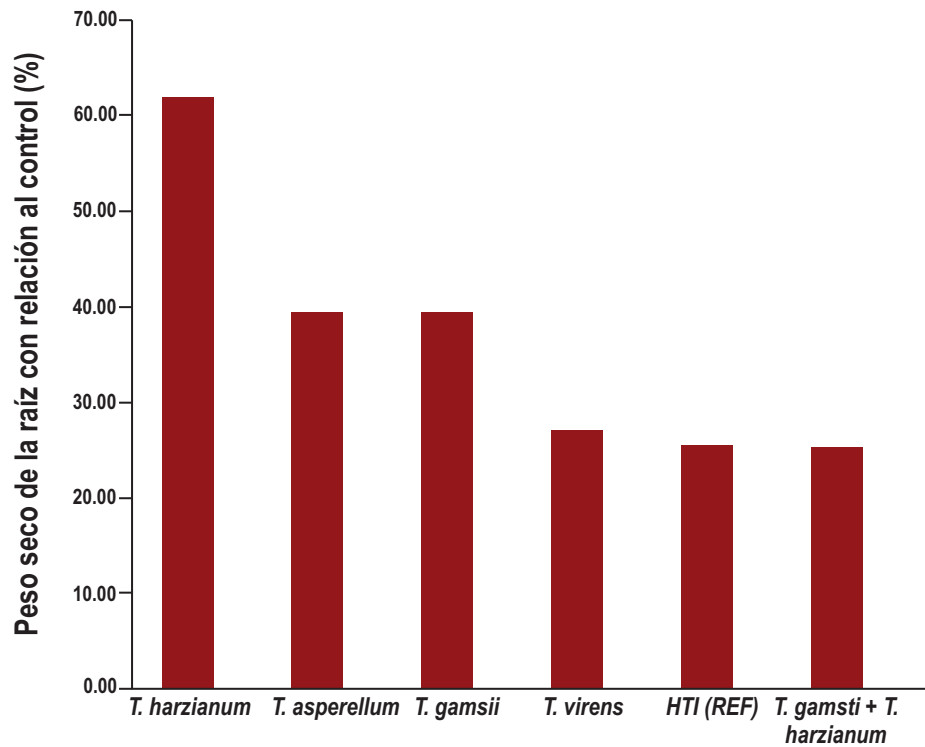


Figura 4. Efecto de la inoculación de distintos aislados de *Trichoderma* sobre el peso seco de la raíz de las plantas de frijol con relación a plantas control no inoculadas.

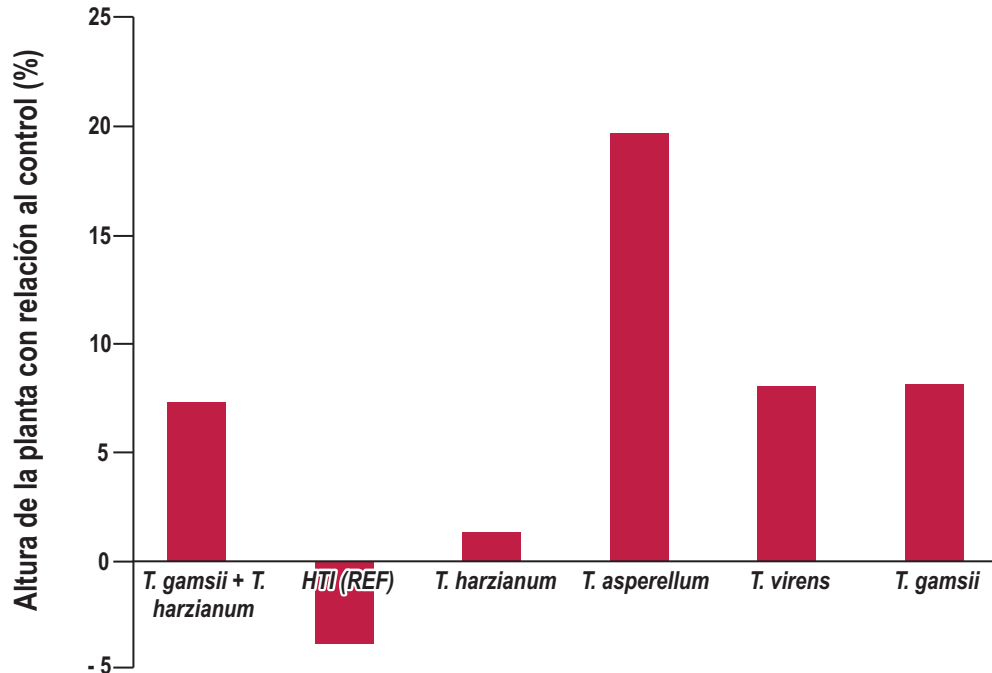


Figura 5. Efecto de la inoculación de distintos aislados de *Trichoderma* sobre la altura de plantas de frijol con relación a plantas control no inoculadas.

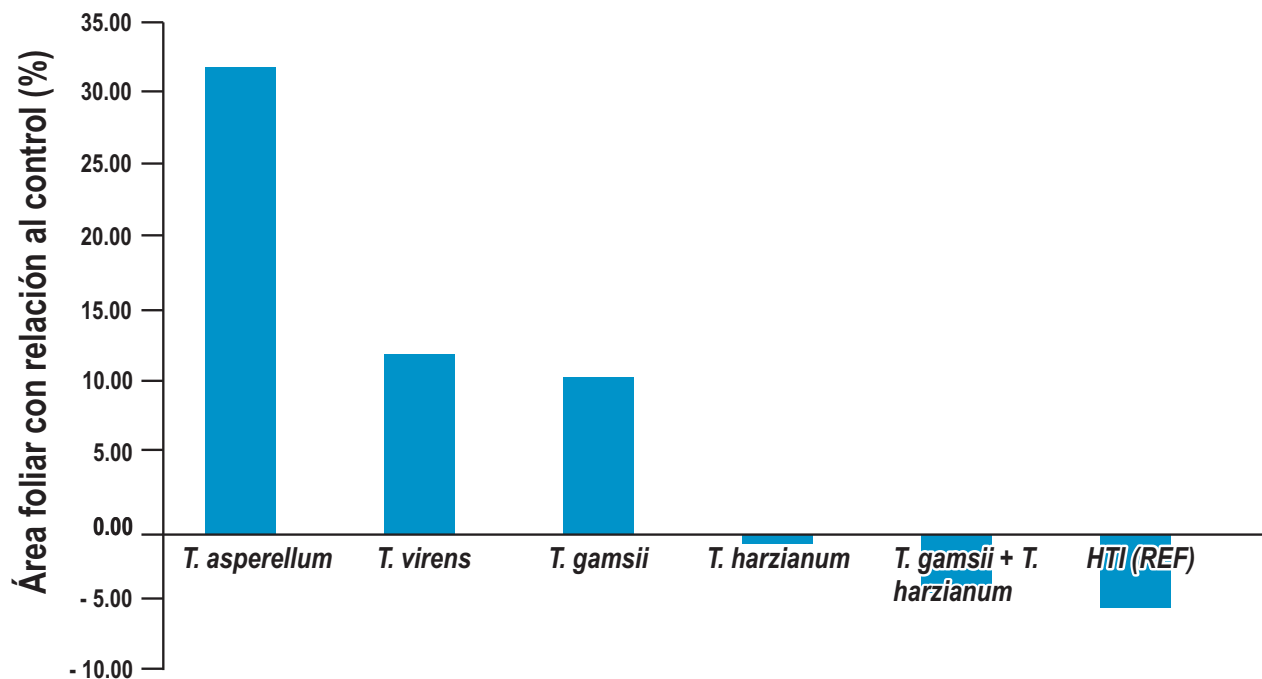


Figura 6. Efecto de la inoculación de distintos aislados de *Trichoderma* sobre el área foliar de plantas de frijol con relación a plantas control no inoculadas.

Con relación a las plantas control no inoculadas, *T. asperellum* promovió el crecimiento de la planta expresado en términos de peso seco total y peso seco de raíz en más del 40%, mientras que *T. gamsii* mejoró estas variables en 25 y 35%, respectivamente (Figs. 3 y 4). Es notable observar que *T. harzianum* estimuló en más del 50% el desarrollo de la raíz (Fig. 4) con relación a las plantas control.

Con respecto a la altura de la planta, se pudo observar que *T. asperellum* incrementó en más del 20% esta variable con respecto a las plantas control, mientras que *T. virens* y *T. gamsii* lo favorecieron en 8 y 7%, respectivamente (Fig. 5). Con respecto al testigo, el desarrollo de las hojas, cuantificado en términos de área foliar, se incrementó en 32% mediante la inoculación con *T. asperellum*, y en 12 y 9% a través del efecto de *T. virens* y *T. gamsii*, respectivamente (Fig. 6).

Al final del experimento se pudo observar que la formación de vainas (número de vainas por planta) fue mayor en las plantas inoculadas con *T. asperellum* (3 en promedio). Al igual que en las variables analizadas previamente *T. virens* y *T. gamsii* ocuparon el segundo lugar con casi el doble de vainas que las plantas control (Fig. 7).

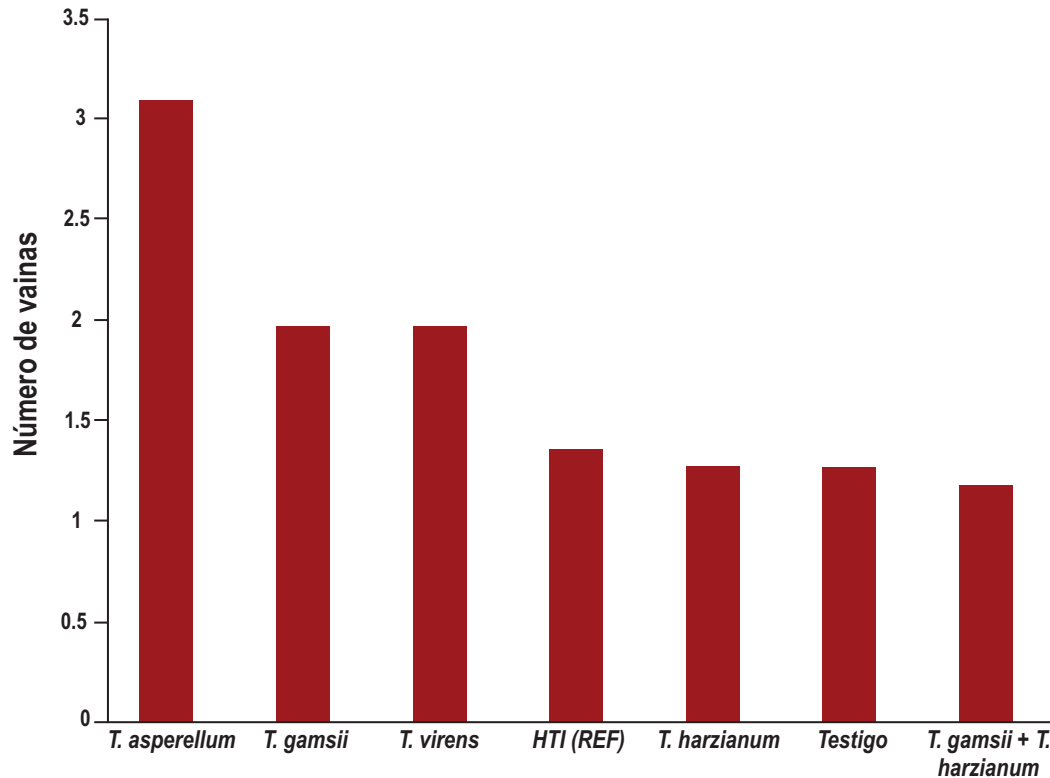


Figura 7. Efecto de la inoculación de distintos aislados de *Trichoderma* sobre el número de vainas de plantas de frijol con relación a plantas control no inoculadas.

Al cuantificar el porcentaje de establecimiento a 30 días en plantas de frijol confrontadas a los patógenos *F. oxysporum* y *F. solani* se pudo observar que el tratamiento con *T. asperellum* alcanzó niveles equiparables a las plantas control, superando al tratamiento donde solamente se inoculó el patógeno (Fig. 8).

Asimismo, en presencia de *M. phaseolina*, *T. asperellum* incrementó el establecimiento de más plantas que las otras cepas de *Trichoderma*; este porcentaje fue, sin embargo, aproximadamente 25% menor que el encontrado en las plantas testigo crecidas sin inoculación de microorganismos (Fig. 8).

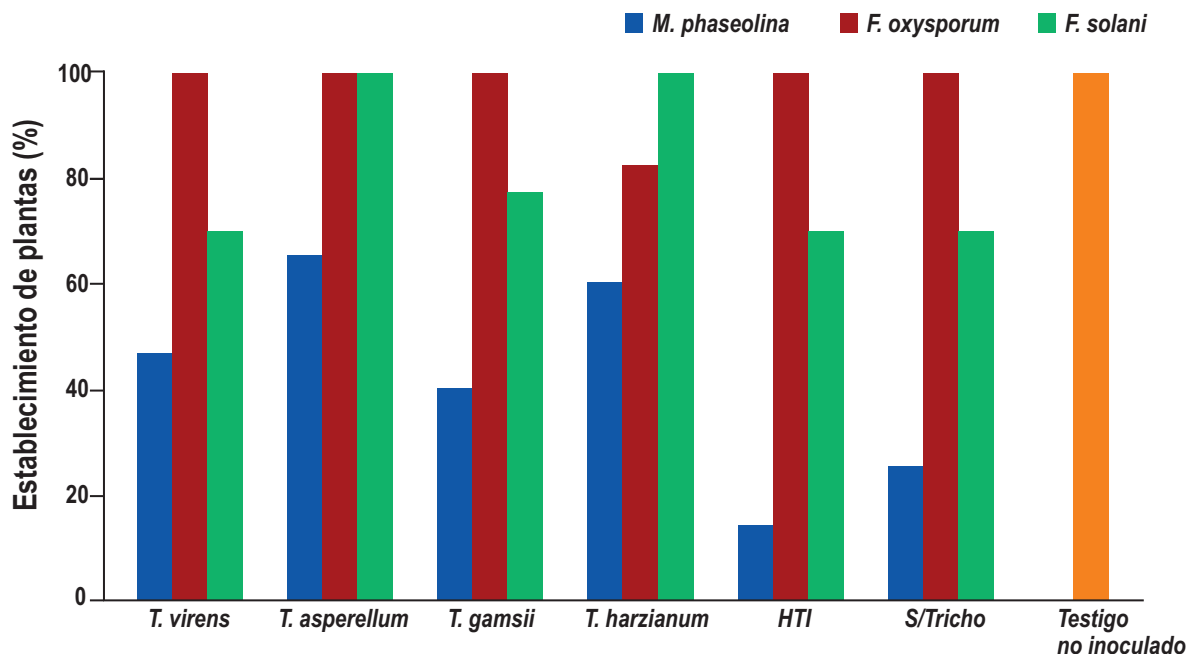


Figura 8. Porcentaje de establecimiento en plantas de frijol coinoculadas con diferentes aislamientos de *Trichoderma* y hongos fitopatógenos.

Con base en los resultados mostrados anteriormente se concluye que las cepas de *T. asperellum* y *T. virens* mostraron un mejor desempeño en las variables evaluadas bajo condiciones de invernadero, lo que indica la necesidad de validar estos resultados en campo para poder establecer su potencial como agentes promotores del crecimiento y desarrollo del frijol, así como posibles biocontroladores de hongos fitopatógenos en este importante cultivo.

Productos comerciales empleados como bioestimulantes basados en especies de *Trichoderma*

Existen en el mercado mundial una amplia gama de inoculantes microbianos que son utilizados paralelamente en el control biológico y la bioestimulación del crecimiento y sano desarrollo de los cultivos (Berg, 2009).

Cuadro 1. Productos comerciales elaborados con base en cepas de *Trichoderma* que son empleados como bioestimulantes.

Compañía	Producto	Cepa	País
Bioworks	“RootShield”	<i>Trichoderma harzianum</i> T-22	Estados Unidos
PHC	“T-22”	<i>T. harzianum</i> T-22	México
PHC	“RootMate”	<i>T. virens</i> G-41	México
AGRI Nova	“BioTrich”	<i>T. harzianum</i>	España
Agronutrición Ibérica	“Stimulase”	<i>T. harzianum</i>	España
Insubiol	“SuBiol”	<i>T. harzianum</i> T-35	Venezuela
Litar biotecnológica	“Saniplant-MI”	<i>Trichoderma</i> spp.	Chile
Bioinsumos nativa	“Biomongen”	Cepas de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp.	Chile
Bioinsumos nativa	“ <i>Trichonativa</i> ”	<i>T. virens</i> , <i>T. harzianum</i> y <i>T. parceanamosum</i>	Chile
Biopacific		<i>Trichoderma</i> spp	Chile
Biocultivos S.A.		<i>Trichoderma viride</i>	Colombia
AMC chemical	“SaniRoot”	<i>Trichoderma</i> spp	España
Trichodex	“Trichomic”	<i>Trichoderma harzianum</i>	España

En lo que respecta a los bioestimulantes basados en especies del género *Trichoderma* sobresalen los productos denominados “RootShield”, “PlantShield”, “Planter box” y “PHC T-22”, éste último de la compañía Bioworks con distribución nacional, los cuales están formulados con base en la cepa de *T. harzianum* T-22 ampliamente caracterizada y exitosamente utilizada (Cuadro 1). Esta cepa también se utiliza para la formulación del producto “PHC T-22” que es distribuido y comercializado en México por la compañía PHC (Plant Health Care) de México, la cual también ofrece otro bioestimulante llamado “RootMate”, formulado con base en la cepa de *T. virens* “G-41”; estas dos cepas son compatibles y pueden ser utilizadas conjuntamente en los cultivos.

Existe evidencia de la eficacia del uso de diversas especies de *Trichoderma* para el biocontrol y la promoción del crecimiento de múltiples especies vegetales como algodón, frijol, tomate, chile, tabaco, lechuga, pepino, arroz, maíz, entre otros (Harman *et al.*, 2004). Diversas compañías internacionales ofertan productos formulados con base en *Trichoderma* spp. que poseen actividad bioestimulante en el desarrollo de las plantas (Cuadro 1).

Perspectivas

Debido a su potencial, las herramientas moleculares serán de gran ayuda para la detección, identificación y análisis de nuevos agentes bioestimulantes del crecimiento vegetal y biocontroladores de fitopatógenos que impulsen la actividad agrícola de nuestro país. El enfoque de esta búsqueda deberá centrarse no solamente en los microorganismos que están íntimamente relacionados con los cultivos de interés agrícola, sino también con especies que conforman la flora natural del suelo. Asimismo, de especial interés será el analizar y comprender las relaciones que establecen los microorganismos con las plantas, y para tal fin, técnicas de vanguardia derivadas de la genómica (“omics”) se ofrecen como una alternativa factible y obligada.

Los beneficios del uso de los microorganismos en los cultivos deberán contemplar, asimismo, un análisis de riesgo sobre la salud humana y animal. El campo de la agricultura y la alimentación, sin duda representa un gran reto para la humanidad que puede solventarse con la ayuda de la biotecnología y la genómica.

Finalmente, y no por ello menos importante, es necesario remarcar que la bioestimulación del crecimiento vegetal mediada por microorganismos depende en gran medida de las capacidades genéticas, fisiológicas y bioquímicas que posean las microorganismos (cepas) empleados para tal fin, ya que al igual que la selección de microorganismos con capacidades de biocontrol, deben ser “trajes hechos a la medida” de la problemática a resolver. Es importante estudiar todos los aspectos relacionados con la interacción entre la planta y el microorganismo para seleccionar la cepa más efectiva en términos de redituabilidad, pero que represente el menor riesgo en el ambiente y la salud humana y animal.

Bibliografía Citada

- Aguirre-Medina, J.F., Irizar-Garza, M.B., Durán-Prado, A., Grageda-Cabrera, O.A., Peña del Río, M.A., Loredó-Osti, C. y Gutiérrez-Baeza, A. 2009. Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Rosario Izapa. Tlaxtla Chico, Chiapas.
- Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T. and Harman, G.E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2926-2933.
- Bae, H. Sicher, R.C., Kim, M.S., Kim, S.H, Strem, M.D., Meinick, R.L. and Bailey, B.A. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J. Exp. Botany.* 11:3279-3295.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. and Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:234-266.
- Berg, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84:11-18.
- Bigirimana, J., De Meyer, G., Poppe, J. and Hoefte, M. 1997. Induction systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* 62:1001-1007.
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A. and Chet, I. 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol.* 147:779-789.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. and López-Bucio, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149:1579-1592.
- Druzhinina, I.S., Kopchinsky, A.G. and Kubicek, C.P. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47:55-64.
- Dubey, C., Suresh, M., and Singh, B. 2006. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biol. Control.* 40:118-127.

- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84:377-391.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanism and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Harman, G.E. 2011a. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytol.* 189:647-649.
- Harman, G.E. 2011b. *Trichoderma*-not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica* 39:103-108.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43-56.
- Hernández-Ramos, M.D. 2010. Identificación de especies de *Trichoderma* con capacidad biocontroladora de hongos fitopatógenos mediante ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tamaulipas Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Rhode. 43 p.
- Howell, C.R. 2003. Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87:4-10.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S. and Bissett, J. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biol. Control.* 51:409-416.
- Inbar, J., Abramsky, M., Cohen, D. and Chet, I. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 100:337-346.
- Jyotsna, Srivastava, A., Singh, R.P., Srivastava, A.K., Saxena, A.K. and Arora, D.K. 2008. Growth promotion and charcoal rot management in chickpea by *Trichoderma harzianum*. *J. Plant Protect. Res.* 48:81-92.
- Kleifeld, O. and Chet, I. 1992. *Trichoderma harzianum*-interaction with plants and effect on growth response. *Plant Soil* 144:267-272.
- Mena-Violante, H.G., León-Martínez, G.D., Jiménez-Delgadillo, R., Serrato-Flores, R., Valdés-Rodríguez, S. y Olalde-Portugal, V. 2007. Fundamentos para utilizar hongos micorrícicos arbusculares como biofertilizantes. *In: Agricultura sustentable y biofertilizantes.* Lira-Saldivar, R.H. y Medina-Torres, J.G (eds). CIQA, UAAAN. México.

- Morgan, J.A.W., Bending, G.D. and White, P.J. 2005. Biological cost and benefits to plant-microbe interactions in the rizosphere. *J. Exp. Bot.* 56:1729-1739.
- Naseby, D.C., Pascual, J.A. and Lynch, J.M. 2000. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Phytophthora ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *J. Appl. Microbiol.* 88:161-169.
- Ousley, M.A., Lynch, J.M. and Whipps, J.M. 1994. Potential of *Trichoderma* spp. as consistent plant growth stimulators. *Biol. Fertil. Soils* 17:85-90.
- Peralta-Díaz, H. 2007. *Azospirillum, Micorrizas y Rhizobium*. Biofertilizantes Microbianos para una agricultura sustentable. *In: Agricultura sustentable y biofertilizantes*. Lira-Saldivar, R.H. y Medina-Torres, J.G (eds). CIQA, UAAAN. México.
- Punja, Z.K. and Utkhede, R.S. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol.* 21:400-407.
- Reséndiz-Arvizu, V.H. 2009. Uso de *Trichoderma* spp. como agente biocontrolador de algunos agentes causales de la pudrición de raíz en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en el estado de Durango. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica. Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Ciudad Reynosa, Tam.
- Schuster, A. and Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:787-799.
- Shoresh, M. and Harman, G.E. 2008. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant Physiol.* 147:2147-2163.
- Shoresh, M., Mastouri, F. and Harman, G.E. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:21-43.
- Thakore, Y. 2006. The biopesticide market for global agricultural use. *Ind. Biotechnol.* 2:194-208.
- Vargas, W.A., Mandawe, J.C. and Kenerley, C.M. 2009. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol.* 151:792-808.
- Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathol.* 22:837-845.

- Windham, M.T., Elad, Y. and Baker, R. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76:518-521.
- Yedidia, I., Benhamou, N. and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativa* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1061-1070.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y. and Chet, I. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization.

Capítulo 9

Micorriza INIFAP: Biofertilizante para el Campo Mexicano

Juan Francisco Aguirre-Medina^{1*}, Arturo Durán-Prado², Ángeles Peña del Río³,
Oscar Grageda-Cabrera⁴ y Martha B.G. Irizar-Garza⁵

¹C.E. Rosario Izapa-INIFAP, Km 18 Carretera Tapachula-Cacaohatan, Col. Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas C.P. 30870

²C.E. Cotaxtla-INIFAP, Km 34.5 Carretera Federal Veracruz-Córdoba, Medellín de Bravo, Veracruz, Veracruz C.P. 94270

³C.E. General Terán-INIFAP, Km 31 Carretera Montemorelos-China, Col. Ex-Hacienda las Anacuas, General Terán, Nuevo León C.P. 67413

⁴C.E. Bajío-INIFAP, Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende, Celaya, Gto. C.P. 38010

⁵C.E. Valle de México-INIFAP, Km 38.5 Carretera México-Veracruz, Chapingo, Edo. México C.P. 56230

*Autor de correspondencia

email: aguirre.juan@inifap.gob.mx, juanf56@prodigy.net.mx

Los hongos micorrízico-arbusculares (HMA) forman asociaciones simbióticas con la mayoría de las plantas de interés agronómico. Se encuentran presentes en casi todos los ecosistemas y han sido un importante soporte de la evolución de las plantas en el sistema radical (Remy *et al.*, 1994).

Las raíces producen una amplia variedad de compuestos orgánicos solubles en agua y compuestos volátiles que pueden ser asimilados directamente por los organismos rizosféricos (Koide y Schreiner, 1992) y la asociación de las micorrizas con las plantas implica un proceso sucesivo de intercambios de sustancias nutritivas y de metabolitos (Trappe, 1987), la creación de nuevas estructuras (Hayman, 1983) y la síntesis de hormonas (Allen, 1982). Este tipo de asociación está regida fundamentalmente por los genomas de la planta y el hongo, modelada a su vez por el ambiente (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1989). Los compuestos pueden servir como atrayentes, señales genéticas y fuentes nutritivas previas a la infección de las micorrizas.

El ciclo de vida de los hongos micorrízicos inicia con la germinación en el suelo de sus propágulos o esporas que crecen al azar en busca de una raíz

susceptible a ser colonizada (Olalde y Serratos, 2004). Durante la germinación de la espora, el costo energético del crecimiento fúngico es sustentado por las reservas del hongo (Becard y Piché, 1989).

En ausencia de la planta huésped, el crecimiento del hongo es relativamente corto (20-30 días) y se generan diversas modificaciones en la morfología fúngica, tales como retracción del citoplasma del ápice, formación de septos, desarrollo de ramificaciones laterales e hinchazón del ápice. La presencia de la raíz, en cambio, permite el desarrollo de un micelio vegetativo que puede colonizar del 60 al 90% del sistema radical en condiciones favorables (Bonfante-Fassolo y Perotto, 1995). Hayman (1983), cita que las raíces se mantienen funcionales por más tiempo cuando están micorrizadas.

La asociación es considerada multifuncional y los beneficios van más allá de los aspectos nutricionales. Existe un aumento de la superficie absorbente del sistema radical mediante el incremento en la raíz (Bowen y Rovira, 1999), como en maíz, sorgo y cebada (Irizar *et al.*, 2003), aunque en otras plantas, como frijol (Aguirre-Medina y Kohashi-Shibata, 2002) y cafeto (Aguirre-Medina *et al.*, 2011), esto no sucede.

Las hifas externas del hongo absorben nutrientes del suelo y los transportan a la parte aérea de la planta (Crowley *et al.*, 1991; Bolan, 1991), además de que también proporcionan cierta protección contra patógenos de la raíz (Van Peer *et al.*, 1991; Borowicz, 2001), como los nemátodos (De la Peña *et al.*, 2006) en los cuales se manifiesta una inhibición de su crecimiento (Utkhede *et al.*, 1999). Por otro lado, mejoran la estructura del suelo mediante la producción de glomalina, que es una proteína que actúa como adherente y aglutinante de las partículas del suelo para formar agregados más estables (Wright y Upadhyaya, 1998; Rillig y Mummey, 2006) y de esta forma contribuyen al control de la erosión (Rillig y Mummey, 2006). En otros casos, la micorriza muestra sinergismos benéficos con otros microorganismos del suelo (Bashan *et al.*, 1996), como por ejemplo cuando interacciona con *Rhizobium* o *Azospirillum* para promover el desarrollo vegetal de *Leucaena leucocephala* (guaje blanco; Aguirre-Medina y Velazco-Zebadúa, 1994) o cacao y cafeto (Aguirre-Medina,

2009a), respectivamente. Asimismo favorece un mejor aprovechamiento del agua en especies anuales (Augé *et al.*, 2001; Aguirre-Medina *et al.*, 2005), mediante la generación de una menor resistencia al transporte de agua en las plantas (Allen, 1982).

Todos estos beneficios deben ser aprovechados para el mejoramiento de las actividades agropecuarias y forestales en virtud del hábito micotrófico de la mayoría de las especies de interés económico. Los hongos formadores de micorrizas arbusculares son considerados como un recurso biológico multipropósito, ya que además de sus efectos sobre la productividad vegetal, esta asociación genera beneficios ambientales al mejorar las condiciones físico-químicas y biológicas del suelo y disminuir la erosión de los mismos (Bethlenfalvay, 1992).

El principal elemento que se transporta a la planta mediante las hifas de estos hongos es el fósforo, un nutriente de baja movilidad en el suelo, por lo que la biofertilización de los cultivos con hongos micorrízicos resulta en una mejoría del estatus nutricional de las plantas. El incremento en la absorción de fósforo, parece ser de naturaleza física. En comparación con un sistema radical no micorrizado, las hifas externas de la asociación exploran un mayor volumen de suelo y con mayor eficiencia, absorbiendo el fósforo de la solución de suelo mediante un gradiente de potencial químico generado por una mayor concentración de fósforo que puede llegar a ser de dos a tres veces mayor en la hifa que en la solución del suelo (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). De esta manera, el fósforo es convertido en gránulos de polifosfatos en las vacuolas y transportado por la corriente citoplasmática hacia las vesículas donde puede ser almacenado temporalmente o ir directamente hacia los arbusculos (Clarkson, 1985).

También se ha consignado el transporte de otros nutrientes del suelo a la planta a través de los hongos micorrízicos, como el nitrógeno; el cual puede ser absorbido por las hifas y las raicillas micorrizadas en diferentes formas y posteriormente ser transferido a la planta. Los hongos absorben NH_4^+ a concentraciones más bajas que las raíces y lo asimilan más rápidamente (Baath y Spokes, 1989).

Declerck (1993) cita que la micorriza incrementa la cantidad de K^+ en los brotes de plantas de plátano en comparación con las no micorrizadas. Habte y Aziz (1985) consignan el aumento de la absorción de nutrientes tales como K^+ , S, Mg^{+2} , Cu^+ , Fe^{3+} y Zn^{2+} en plantas de *Sesbania grandiflora* inoculadas con *Glomus fasciculatum* y *Glomus mosseae*. Manjunath y Habte (1988) encontraron incrementos en la absorción de Cu^{2+} y Zn^{2+} en *Leucaena leucocephala*, producto de la inoculación con hongos micorrízicos. Aguirre-Medina *et al.* (2007) refieren incrementos de N, P y Ca^{2+} en plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) y Moroyoqui y Aguirre-Medina (2002) en *Coffea arabica*.

Existen diversos estudios que consignan los beneficios de los hongos micorrízicos con respecto a un incremento en la productividad (Miller y Jastrow, 2000; Aguirre-Medina, 2006). Las combinaciones de hongos y bacterias en diferentes plantas tienen efectos sinérgicos en la nutrición de la planta huésped y un beneficio concomitante en el desarrollo vegetativo y reproductivo, como es el caso de la simbiosis doble con *Rhizobium-Glomus* en *Leucaena* (Aguirre-Medina y Velazco-Zebadúa, 1994), *Azospirillum-Glomus* en cacao (Aguirre-Medina *et al.*, 2007), *Azospirillum-Glomus* y *Rhizobium-Glomus* en diversos cultivos anuales, o mediante una simbiosis triple como la de *Rhizobium-Glomus-Azospirillum* en frijol (Irizar-Garza *et al.*, 2003; Aguirre-Medina, 2006). La interdependencia existente entre la nodulación y la micorrización de leguminosas parece contribuir a alcanzar un alto grado de micotrofismo en este grupo de plantas, especialmente en los trópicos.

Las aplicaciones de hongos micorrízico-arbusculares en el campo mexicano tuvieron su mayor impulso a partir del programa masivo desarrollado a partir de 1999 por el INIFAP y la Colaboración de la FUMIAF, A.C.; a través del Programa Alianza Para el Campo de la SAGARPA. Este programa se desarrolló en respuesta a los costos crecientes de los fertilizantes químicos y a la necesidad de incrementar la producción de alimentos, además de la creciente preocupación de los consumidores acerca del impacto de los agroquímicos en el medio.

Para tal fin se desarrolló un método para el incremento de inóculo micorrízico en suelo estéril (Durán-Prado *et al.*, 2001). El producto contiene esporas, micelio y restos de raíces micorrizadas, y se presenta en bolsas de 1 kg con las características de calidad de 95% de infección en el sistema radical de la planta hospedera y al menos 40 propágulos por gramo de suelo. Las fuentes de inóculo son las esporas, hifas, fragmentos de cuerpos fructíferos y raíces colonizadas. Estos biofertilizantes se pueden aplicar en casi todos los cultivos de interés económico para el país.

A este producto biológico se le ha denominado “Biofertilizante de Micorriza” o “Micorriza INIFAP”. El término “biofertilizante” ha tenido diversas definiciones, pero en este caso utilizaremos el propuesto por la Red Iberoamericana de Fertilizantes Biológicos para la Agricultura y el Medio Ambiente (BIOFAG) como “productos que contienen microorganismos vivos no patógenos y que al asociarse en forma natural con las raíces de las plantas o endofíticamente aportan algún nutriente o favorecen la absorción de nutrientes del suelo promoviendo el crecimiento de las plantas y mejorando el rendimiento de los cultivos”. Esta descripción define la función del hongo micorrízico en el transporte de nutrientes a la planta.

La producción de micorrizas requiere de un sistema radical vivo para completar su ciclo biológico. Por ello, la fuente de inóculo proviene de hongos asociados a raíces de plantas “nodriza”. Los hongos micorrízicos se pueden incrementar en diversos sustratos, además del suelo, y mediante diversos procedimientos. La supervivencia de estos hongos usados como biofertilizante dependerá de su capacidad para competir con la microbiota del suelo o de complementarse en sus funciones y poder establecerse y multiplicarse abundantemente en las raíces de las plantas.

La micorriza INIFAP contiene principalmente el hongo *Glomus intraradices* Schenk *et* Smith y se ha aplicado sola, o en combinación con otros microorganismos al momento de la siembra, mezclándose con la semilla. Se han validado los resultados favorables de su aplicación en los cultivos de maíz, frijol, soya, avena, cebada, trigo, sorgo, arroz, principalmente en condiciones de

temporal y en algunos casos bajo riego. También se ha evaluado en cultivos perennes como cacao, cafeto, mango, rambután, caña de azúcar, limonero, palma de coco, vainilla, *Jatropha curcas* y *Cybistax donnell-smithii*.

Esta tecnología nos permite disminuir los costos de producción mediante la disminución de los fertilizantes químicos y fomentar una producción sustentable con incrementos en la producción similares a los obtenidos mediante la fertilización química.

El producto tiene una presentación de 1 kg y se empaca en cajas de 25 kg (Fig. 1).



Figura 1. Presentación de la Micorriza INIFAP.

Es un biofertilizante de grano fino que puede incorporarse fácilmente a las semillas de siembra, o bien, en algunos casos aplicarse en el material vegetal antes de la siembra, como en el caso de las estacas enraizadas o los estolones de algunas plantas forrajeras tropicales.

Este producto no tiene caducidad inmediata como es el caso de los biofertilizantes a base de bacterias los cuales tienen una caducidad promedio

de seis meses. La Micorriza INIFAP conserva su viabilidad por tres años o más, bajo condiciones de almacenamiento a 25°C de temperatura. También tienen la ventaja de poder ser transportado sin la necesidad de refrigeración en comparación con los biofertilizantes que contienen bacterias. Estas ventajas facilitan su transporte y comercialización. En la actualidad muchos productores reconocen la marca INIFAP como tecnologías de apoyo a sus procesos productivos.

Formas de aplicación y cantidades

La Micorriza INIFAP puede aplicarse a la semilla, al material vegetativo o al suelo. La forma más precisa de inoculación es mediante su adhesión a las semillas, por medio de un adherente. Los biofertilizantes que utilizan como acarreador suelo o turba, utilizan frecuentemente carboximetil celulosa al 0.5% p/p como adherente. El procedimiento general de inoculación para semillas consiste de dos operaciones sencillas. Una de ellas se relaciona con la dilución del adherente en agua. Si viene en presentación líquida se deben agregar 250 ml de agua limpia y mezclar posteriormente (esta cantidad es la equivalente a una botella de refresco pequeña). Si tiene la presentación sólida, lo mejor es diluirlo una noche antes en la misma cantidad de agua. Si no se realizó esta práctica, se deposita el producto en la botella al momento que se necesita y se agita sin parar por 4-5 minutos. De esta forma se logra la mayor solubilización de carboximetil celulosa.

La otra parte del proceso consiste en la aplicación del adherente a la semilla. Para tal fin, se sugiere extender la semilla en un plástico, depositarla en una carretilla para facilitar su traslado al sitio de siembra o a una revolvedora, dependiendo de la cantidad de semilla a biofertilizar. Entonces se asperja sobre la misma el adherente y se mezcla. La mezcla puede hacerse con la mano, si es poca la semilla, o con una pala si la cantidad es superior a los 40 kg. Es importante verificar que toda la semilla adquiera una consistencia “pegajosa”. Si no adquiere esta consistencia, el proceso de adherencia se puede mejorar agregando cuatro cucharadas soperas de azúcar disueltas en un vaso de agua mediano. Una vez realizada la operación anterior se agrega el biofertilizante y se mezcla perfectamente (Fig. 2).

La aplicación a material vegetativo de plantas como estacas enraizadas de café *Coffea arabica* L., *Coffea canephora*, *Theobroma cacao* L. o estolones de gramíneas forrajeras tropicales como el zacate estrella de África, *Cynodon plectostachyus* (K. Schum) Pilger, o los del género *Brachiaria* spp. Griseb y *Digitaria* spp. Haller, consiste en la aspersión del adherente sobre el material vegetativo y el espolvoreo posterior del biofertilizante, de preferencia sobre los nudos de los tallos (Fig. 3).

En algunos cultivos como los pastos del género *Pennisetum*, o caña de azúcar, puede ser aplicado en los tallos reproductivos cuando están distribuidos sobre el surco, asperjando el biofertilizante con una fertilizadora o mediante una botella de plástico perforada. El producto debe dirigirse hacia el nudo del tallo el cual debe ser tapado inmediatamente con el suelo.

La Micorriza INIFAP tiene la cantidad de inóculo suficiente en la presentación de 1 kg para aplicarse en una hectárea de un cultivo de semilla de tamaño mediano, como maíz y frijol, cuya recomendación de siembra es de 20 a 25 kg ha⁻¹. En cultivos de semilla pequeña que emplean hasta 50 kg de semilla por hectárea, como sorgo, trigo, cebada y avena, se recomienda utilizar tres bolsas de 1 kg de la Micorriza INIFAP por hectárea.



Figura 2. Aplicación de la Micorriza INIFAP a la semilla.

En semillas para viveros o semilleros, como jitomate, chile o cebolla, la cantidad de producto máxima es de medio kilo y siempre se debe cuidar que la semilla quede cubierta con el adherente y el biofertilizante. En otros cultivos que requieren etapas de vivero o semillero, como cacao, cafeto, mango o rambután, la cantidad de biofertilizante a aplicar es variable y depende del número de semillas a inocular. En todos los casos se debe cubrir la superficie de la semilla con el biofertilizante. Alternativamente, al momento de depositar la semilla en las bolsas de vivero se puede agregar en el fondo del agujero de siembra hasta 5 g del biofertilizante que puede ser de un microorganismo o la mezcla de dos ó más.

En el caso de las aplicaciones al suelo, o bien al material vegetal de caña de azúcar, las cantidades del producto se incrementan notablemente. En promedio, en una hectárea con siembras a 1.50 m de separación entre surcos, se recomienda una aplicación de hasta 65 kg ha⁻¹ de micorriza-INIFAP.

Como una recomendación general podemos considerar una proporción de biofertilizante a base de suelo estéril del 6 al 8%, y de turba del 4%, del peso de la semilla.



Figura 3. Semilla y raíces inoculadas con la Micorriza INIFAP.

En cultivos anuales los beneficios de la simbiosis se expresan en plazos muy breves (20-30 días después de la biofertilización), mientras que en cultivos perennes en vivero, como en cacao y cafeto, los efectos se observan hasta después de tres meses (Aguirre-Medina, 2009b).

En condiciones especiales, como en el caso de suelos ácidos en el trópico, es posible adicionar además del biofertilizante a la semilla, algún mejorador del suelo, como carbonato de calcio, el cual cumple la función de proteger a los microorganismos en la etapa inicial de colonización radical.

Experiencias en campos de productores

La Micorriza INIFAP se ha aplicado en diferentes cultivos bajo condiciones de campo. En general, ha sido utilizado solo y en combinación con algún microorganismos, como *Azospirillum brasilense* o *Rhizobium etli*, además de alguna dosis de fertilización.

En frijol, en el ciclo agrícola PV 1999 se desarrollaron once parcelas de validación en la región de Coahuila y Tamaulipas con un rendimiento promedio del testigo de 674 kg ha⁻¹ y el tratamiento con micorriza de 833 kg ha⁻¹ (Covarrubias *et al.*, 2000); esta diferencia representa 23% de ganancia utilizando la Micorriza INIFAP.

En el Pacífico Sur, en los estados de Chiapas, Guerrero y Oaxaca se desarrollaron nueve parcelas de validación en terrenos de productores con rendimientos de 910 kg ha⁻¹ en las parcelas testigo y 1,335 kg ha⁻¹ en las parcelas tratadas con *Glomus intraradices* (Camas, 2000; Cruzaley, 2000; Arredondo y Luévanos, 2000); en este caso la diferencia representó 46% de ganancia a favor del tratamiento con este hongo. Como un tratamiento adicional en la misma parcela, estos mismos autores evaluaron la coinoculación *Glomus intraradices-Rhizobium etli* más la adición de una dosis de 40 kg de N ha⁻¹ y el rendimiento de frijol se incrementó a 1,870 kg ha⁻¹

En el Centro de México, en el estado de Guanajuato, Grageda-Cabrera (2008) estableció dos parcelas de validación con frijol. Una de ellas bajo condiciones de riego en Celaya y la otra en el sistema punta de riego en

Pénjamo. En Celaya reporta un rendimiento de 2,844 kg ha⁻¹ para el testigo y de 3,115 kg ha⁻¹ para el tratamiento con micorriza, con una diferencia de 10%. En el caso de Pénjamo, el rendimiento del testigo fue de 1,435 kg ha⁻¹ y para el hongo micorrízico de 1,621 kg ha⁻¹, con una diferencia del 13%.

En la Región Central de Chiapas, Cruz-Chávez (2009) estableció cuatro parcelas de validación de frijol en condiciones de humedad residual durante el ciclo O/I y obtuvo un rendimiento promedio de 370 kg ha⁻¹ para el testigo y de 413 kg ha⁻¹ para el tratamiento con micorriza, con una diferencia de 11%.

En la Región Selva y Centro de Chiapas, Cruz-Chávez (2010) estableció diez parcelas de frijol sin la utilización de fertilizante químico. Los resultados promedio que encontró fueron de 314 kg ha⁻¹ para las parcelas testigo y de 345 kg ha⁻¹ para parcelas micorrizadas con *Glomus intraradices*, con una diferencia de 9% en los rendimientos.

Román-Reyes (2010), estableció dos parcelas de frijol en Tabasco y siete en Veracruz con los mismos tratamientos anteriores. La siembra en la primera localidad se estableció bajo condiciones de temporal, considerando parcelas a las que se les aplicó la dosis de fertilización 46-46-00 y otras parcelas en las cuales se inoculó el hongo micorrízico y además se usó la dosis de fertilización 46-23-00. Los rendimientos encontrados fueron de 860 kg ha⁻¹ para el testigo y 1,493 kg ha⁻¹ para el tratamiento con el biofertilizante. En Veracruz, durante el ciclo OI, los rendimientos promedio fueron de 762 kg ha⁻¹ en el testigo y 1,007 kg ha⁻¹ en el tratamiento con micorriza, con una diferencia de 32% en los rendimientos.

En maíz, durante los ciclos agrícolas PV 1999 y 2000 se realizaron a nivel nacional 29 parcelas de validación con maíces criollos comparando el tratamiento testigo con *Glomus intraradices*. Los rendimientos promedio fueron de 1,534 kg ha⁻¹ para el testigo y de 1,875 kg ha⁻¹ para las parcelas con micorriza. En este caso la diferencia entre ellos fue de 22%; la coinoculación de *Glomus intraradices*-*Azospirillum brasilense* produjo 1,891 kg ha⁻¹ (Aguirre-Medina, 2006). En Oaxaca, Arredondo *et al.* (2003) encontraron incrementos del 11% en el rendimiento de grano de maíz con la biofertilización de *A. brasilense* y *Glomus intraradices* en comparación con el testigo.

Cruz-Chávez (2007) en la Depresión Central de Chiapas encontró rendimientos medios de dos parcelas de maíz criollo de 2,990 kg ha⁻¹ en el testigo y de 3,646 kg ha⁻¹ en las parcelas tratadas con *G. intraradices*, con una diferencia de 21%.

En Celaya Guanajuato, en condiciones de riego Grageda-Cabrera (2008) cita rendimientos de maíz de 9,336 kg ha⁻¹ en el tratamiento testigo y de 10,069 kg ha⁻¹ para parcelas biofertilizadas con micorriza, con una diferencia del 8%. Este mismo autor en condiciones de temporal estableció dos parcelas de validación con maíz, una en Celaya y la otra en Pénjamo. Los rendimientos promedio fueron de 3,832 kg ha⁻¹ para el testigo y de 4,314 kg ha⁻¹ para el tratamiento con Micorriza INIFAP, con una diferencia de 12%.

González-Camarillo (2010) en el estado de Guerrero estableció dos parcelas de validación con el híbrido de maíz H 565 y la dosis de fertilización de 90-60-00 aplicada al testigo y a parcelas tratadas con Micorriza INIFAP, y reporta rendimientos promedio de 6,900 kg ha⁻¹ para el testigo y 7,700 kg ha⁻¹ para el tratamiento con micorriza; esta diferencia representa 11% más de rendimiento mediante el empleo de la Micorriza INIFAP.

Román-Reyes (2010) estableció dos parcelas de maíz en el ciclo OI en Tabasco, y dos más en Puebla, considerando un tratamiento testigo más la dosis de fertilización de 146-46-00 y el tratamiento de micorriza más 138-23-00. En Tabasco obtuvo rendimientos promedio de 4,263 kg ha⁻¹ para el testigo y de 4,941 kg ha⁻¹ para el tratamiento con micorriza, mientras que en el estado de Puebla, el rendimiento para el testigo fue de 4,051 kg ha⁻¹ y para el tratamiento con micorriza de 4,452 kg ha⁻¹. Este mismo autor cita los resultados promedios de 11 parcelas de validación desarrolladas en Veracruz con los mismos tratamientos anteriores, pero durante el ciclo PV. Los rendimientos promedios encontrados en dichos experimentos fueron de 4,095 kg ha⁻¹ para el testigo y de 5,201 kg ha⁻¹ para las parcelas inoculadas con micorriza; la diferencia en rendimiento entre ellos fue de 27%.

En otros cultivos, como sorgo, Grageda-Cabrera (2008) estableció dos parcelas de validación en Guanajuato bajo condiciones de riego. En Celaya, reporta rendimientos de 9,357 kg ha⁻¹ para el testigo y de 9,738 kg ha⁻¹ para parcelas micorrizadas, con una diferencia del 4%. En Salamanca, el rendimiento del testigo fue de 5,988 kg ha⁻¹, mientras que el obtenido en las parcelas inoculadas con micorriza fue de 6,347 kg ha⁻¹, con una diferencia del 6%.

Román-Reyes (2010) estableció una parcela de validación de arroz en Veracruz con los tratamientos testigo más la fertilización de 198-46-00 y la Micorriza INIFAP más la fertilización de 138-23-00 y reporta rendimientos de 3,695 kg ha⁻¹ en el testigo y 4,250 kg ha⁻¹ en las parcelas tratadas con micorriza, con una diferencia en el rendimiento de 15%.

En el Ejido J.M. Gutiérrez Chiapas se estableció una parcela con la variedad de soya Huasteca 100 considerando diferentes tratamientos de fertilización química y *Glomus intraradices*. En las parcelas tratadas con *G. intraradices* se logró el mayor rendimiento (2,400 kg ha⁻¹) en comparación con el testigo, en el que se obtuvo un rendimiento de 2,200 kg ha⁻¹ (Alonso y Aguirre-Medina, 2002).

En nuestra experiencia, la aplicación de *G. intraradices* y/o *A. brasilense* ha sido exitosa para lograr una disminución, en diferentes grados, de las dosis recomendadas de fertilizantes químicos sintéticos.

En parcelas de maíz V 537 establecidas en Campeche, De Alba (2000) encontró rendimientos similares utilizando la dosis de fertilización completa recomendada (82-92-00) y la dosis 27-30-00 más *Glomus intraradices* y *A. brasilense*.

Resultados similares son referidos por Irizar-Garza *et al.* (2003) en el Valle de México con la variedad de maíz H 40. En este caso se logró disminuir la dosis de 140-60-00 a 46-20-00 mediante el empleo de microorganismos benéficos.

Aguirre-Medina (2010) estableció tres parcelas de validación de maíz en la región del Soconusco, Chiapas. Se validaron los tratamientos testigo más 100-40-00 y Micorriza INIFAP más 50-20-00. Los rendimientos promedio fueron de 3,330 kg ha⁻¹ para el testigo y de 3,866 kg ha⁻¹ para las parcelas inoculadas, con una diferencia en rendimiento de 15% y disminución de los costos de fertilización química en 50%.

Considerando estos mismos tratamientos en tres parcelas de validación en la Región Centro de Chiapas, Cruz-Chávez (2010) reportan rendimientos promedio de 3,320 kg ha⁻¹ para el testigo más 100-50-00 y de 3,873 kg ha⁻¹ para el tratamiento con Micorriza INIFAP más 50-20-00; la diferencia entre ambos tratamientos fue de 16%.

En frijol Negro INIFAP cultivado en OI en Veracruz, Durán-Prado (2000) encontró rendimientos similares entre un tratamiento que consideró una simbiosis doble *Glomus intraradices-Rhizobium etli* y la dosis 13-13-00 y la dosis de fertilización química 40-40-00 sin los microorganismos.

Resultados obtenidos en sorgo por los productores de Pénjamo Guanajuato (comunicación personal del C. Miguel Iriarte Martínez, Presidente de la Red Estatal del Campo) en un oficio fechado del 20 de Noviembre de 2009 se cita que se aplicaron 2.5 kg de micorriza por bulto de semilla ha⁻¹ más una primera aplicación de fertilizante a razón de 350 kg ha⁻¹ de una mezcla de sulfato triple y 300 kg ha⁻¹ de urea para la segunda aplicación; ambas dosis representan el 50% de las dosis que los productores aplican normalmente. Se enfatiza el ahorro del 50% y el incremento de 30% de rendimiento, de modo tal que los productores que no aplicaron Micorriza INIFAP tuvieron rendimientos de 7 a 8 ton ha⁻¹ y los que sí lo hicieron obtuvieron rendimientos de 11.5 ton ha⁻¹.

En trigo, la empresa Gruma (comunicación personal del M.C. Luis Miguel Rolón González, Gerente Corporativo de Planeación Agrícola de esta empresa), informa en oficio con fecha 9 de Noviembre de 2009 que durante el ciclo agrícola PV promovieron la inoculación de trigo de gluten fuerte Rayón y Kronstad con Micorriza INIFAP en 980 ha en la zona de influencia de Río

Grande Zacatecas en condiciones de temporal. Reportan 50% de incremento en el crecimiento radical de las plantas micorrizadas en comparación con las plantas testigo y un rendimiento promedio que fue superior en 30% (2.3 vs. 3.0 ton ha⁻¹).

La respuesta positiva de las plantas a la micorriza se atribuye al crecimiento externo del micelio, el cual actúa como una extensión de la superficie de absorción de la raíz y le facilita a la planta el transporte de nutrimentos y agua.

Además de los cultivos anuales, la Micorriza INIFAP ha sido aplicada en diversos cultivos en invernadero o vivero con especies perennes como cacao (*Theobroma cacao* L.), cafeto (*Coffea arabica* y *C. canephora*), mango (*Mangifera indica*), rambután (*Nephelium lappaceum*), vainilla (*Vanilla planifolia*), primavera (*Cybistax donnell-smithii*) y otras especies forestales. La interacción de la micorriza con algunos de estos materiales está siendo ya evaluada en campo.

Disponibilidad

La tecnología y el producto Micorriza INIFAP se encuentra disponible en el Campo Experimental Rosario Izapa, en Chiapas. Además el INIFAP produce y tiene disponible este biofertilizante en tres sitios de producción más: C.E. Valle de México en Texcoco, Edo. de México, C.E. Bajío en Celaya, Gto. y C.E. General Terán en Nuevo León y también se comercializa en otros campos experimentales del INIFAP.

Beneficios

Los beneficios de utilizar las micorrizas en los cultivos anuales y perennes se enmarcan en una asociación simbiótica que favorece el transporte de nutrientes, especialmente fósforo y agua a la planta huésped. Se aumenta el desarrollo del sistema radical y de los pelos radicales, lo cual contribuye a reducir el impacto del estrés hídrico en las plantas. Además, estos microorganismos contribuyen a la solubilización de minerales para facilitar el

aprovechamiento de los fertilizantes químicos sintéticos aplicados; propician el mantenimiento y la regeneración de los suelos, ayudan en el control de patógenos y pueden reducir 50% las dosis de fertilización química recomendadas, sin pérdida en los rendimientos potenciales. Cuando se aplica en combinación con otros microorganismos, como *Azospirillum* o *Rhizobium*, las ganancias en los rendimientos son aún mayores.

Conclusiones y perspectivas

Los resultados de investigación y validación realizados en las parcelas de productores confirman que la simbiosis planta-Micorriza INIFAP favorece la nutrición de los cultivos.

Glomus intraradices en combinación con dosis bajas de fertilización química resultaron en los mayores rendimientos en cultivos anuales y perennes. Además se altera favorablemente la respuesta en el desarrollo y la asignación de materia seca de los componentes morfológicos y fisiológicos del rendimiento.

Se establece que la práctica de utilizar biofertilizantes a base Micorriza INIFAP mejora el rendimiento de grano de los cultivos anuales y el desarrollo vegetal de los perennes en vivero así la relación beneficio/costo al reducir los costos asociados a la fertilización química sintética.

Los biofertilizantes tienen un enfoque agroecológico ya que favorecen el balance microbiológico de los suelos y permiten reducir las aplicaciones de fertilizantes químicos sintéticos.

Bibliografía Citada

- Aguirre-Medina, J. F. 2006. Biofertilizantes microbianos: Experiencias agronómicas del programa nacional del INIFAP en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo Experimental Rosario Izapa. Libro Técnico Núm. 2. Tuxtla Chico, Chiapas.
- Aguirre-Medina, J.F. 2009a. Rendimiento y desarrollo de cultivos anuales y perennes con biofertilizantes en campos de productores. *In: Seminario sobre los biofertilizantes y su importancia en la agricultura y el medio ambiente.* Coordinadora de Fundaciones Produce (COFUPRO). México.
- Aguirre-Medina, J. F. 2009b. Rendimiento y desarrollo de cultivos anuales y perennes con biofertilizantes microbianos en Chiapas. *In: Primer Encuentro Estatal de Productores Exitosos.* Publicación Especial No. 4. Cadena, I.P., López, B.W. y Morales, G.M. (eds). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo Experimental Centro de Chiapas. Ocozocuatla de Espinosa, Chiapas.
- Aguirre-Medina, J.F. 2010. Informe final del proyecto: Validación de Productos Orgánicos en Módulos en la Región Sur Sureste de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo Experimental Rosario Izapa. Tuxtla Chico, Chiapas.
- Aguirre-Medina, J.F. y Kohashi-Shibata, J. 2002. Dinámica de la colonización micorrízica y su efecto sobre los componentes del rendimiento y el contenido de fósforo en frijol común. *Agr. Téc. Méx.* 28:23-33.
- Aguirre-Medina, J.F. y Velazco-Zebadúa, E. 1994. Componentes morfológicos y fisiológicos del rendimiento en *Leucaena leucocephala* al inocularse con micorriza VA y/o *Rhizobium loti*. *Agr. Téc. Méx.* 20:43-45.
- Aguirre-Medina, J.F., Kohashi-Shibata, J., Trejo-López, C., Acosta-Gallegos, J.A. y Cadena-Iñiguez, J. 2005. La inoculación de *Phaseolus vulgaris* L. con tres microorganismos y su efecto en la tolerancia a la sequía. *Agr. Téc. Méx.* 31:125-137.
- Aguirre-Medina, J.F., Mendoza-López, A., Cadena-Iñiguez, J. y Avendaño-Arrazate, C. 2007. La biofertilización del cacao (*Theobroma cacao*) L. en vivero con *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et Döbereiner y *Glomus intraradices* Schenk et Smith. *Interciencia* 32:1-6.

- Aguirre-Medina, J.F., Moroyoqui-Ovilla, D.M., Mendoza-López, A., Cadena-Iñiguez, J., Avendaño-Arrazate, C.H. y Aguirre-Cadena, J.F. 2011. Aplicación de *A. brasilense* y *G. intraradices* a *Coffea arabica* en vivero. *Agron. Mesoam.* 22:1-10.
- Allen, M. F. 1982. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on water movement through *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud. *New Phytol.* 91:191-196.
- Alonso, B.M. y Aguirre-Medina, J.F. 2002. Respuesta de la fertilización química y la biofertilización de la soya *Glycine max* L. Merr var. Huasteca 100 en el Soconusco Chiapas. Informe de Labores del Programa de Soya del Campo Experimental Rosario Izapa. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Centro de Investigación Regional del Pacífico Sur. Tuxtla Chico, Chiapas.
- Arredondo, V.C. y Luévanos, A. 2000. Inoculación con *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices* en maíz de temporal en los Valles Centrales de Oaxaca. *In: Memoria XVIII Congreso Nacional de Fitogenética.* Sociedad Mexicana de Fitogenética. Irapuato, Gto. México.
- Arredondo, V.C., Luévanos, A. y Aguirre-Medina, J.F. 2003. *Azospirillum* y micorriza, complementos a la fertilización del maíz en los Valles Centrales de Oaxaca. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigaciones Regionales del Pacífico Sur. Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca. Folleto Técnico Núm. 3. Oaxaca, México.
- Augé, R.M., Stadola, A.J., Tims, J.E. and Saxton, M. 2001. Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant Soil* 230:87-97.
- Baath, E. and Spokes, J. 1989. The effect of added nitrogen and phosphorus on mycorrhizal growth response and infection in *Allium schoenoprasum*. *Can. J. Bot.* 67:3221-3232.
- Bashan, Y., Holguin, G. y Ferrera-Cerrato, R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*. *Terra Latinoam.* 14:159-194.
- Becard, G. and Piché, Y. 1989. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *New Phytol.* 112:77-83.
- Bethlenfalvay, G.J. 1992. Mycorrhizae in the agricultural plant-soil system. *Symbiosis* 14:413-425.

- Bolan, N.S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil* 134:189-207.
- Bonfante-Fassolo, P. and Perotto, S. 1995. Strategy of arbuscular mycorrhizal fungus when infecting host plant. *New Phytol.* 130:13-21.
- Borowicz, V.A. 2001. Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations?. *Ecol.* 82:3057-3068.
- Bowen, G.D. and Rovira, A.D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66:1-102.
- Camas, G.R. 2000. Programa de Validación de Biofertilizantes en Chiapas. Informe anual de labores PV 1999, OI 1999-2000 del Campo Experimental Centro de Chiapas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Sur. Ocozocuautla de Espinoza, Chiapas.
- Clarkson, D.T. 1985. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36:77-115.
- Covarrubias, R.J.M., Sánchez, V.I. y Rodríguez, C.E. 2000. Biofertilizantes: Simbiosis doble *Azospirillum*-Micorriza-Arbuscular y *Rhizobium*-Micorriza en trigo, maíz y frijol en Coahuila. Informe Anual de Labores del Campo Experimental Zaragoza, Coahuila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Norte Centro. Zaragoza, Coah.
- Crowley, D.E., Wang, Y.C., Reid, C.P. and Szaniszlo, P.J. 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil* 130:179-198.
- Cruzaley, S.R. 2000. Validación de biofertilizantes en cultivos básicos en el estado de Guerrero. Informe Anual de Labores de la Dirección de Vinculación del INIFAP en el Estado de Guerrero. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo Experimental Chilpancingo. Chilpancingo, Gro.
- Cruz-Chávez, F.J. 2007. Informe de Transferencia de Tecnología en Biofertilizantes. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Pecuarias. Centro de Investigación Regional de Pacífico Sur. Campo Experimental Centro de Chiapas. Ocozocuautla de Espinoza, Chiapas.
- Cruz-Chávez, F.J. 2009. Informe Final del Proyecto Validación de Productos Organicos en Módulos en la Región Sur Sureste de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional de Pacífico Sur. Campo Experimental Centro de Chiapas. Ocozocuautla de Espinoza, Chiapas.

- Cruz-Chávez, F.J. 2010. Informe del Proyecto Transferencia de Tecnología en Biofertilizantes-SAGARPA-FIRCO. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Pecuarias. Centro de Investigación Regional de Pacífico Sur. Campo Experimental Centro de Chiapas. Ocozocuaula de Espinoza, Chiapas. México.
- De Alba, R. 2000. Programa de Validación de Biofertilizantes en el CIRSE. Informe Anual de Labores PV 1999, OI 1999-2000. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Sureste. Campo Experimental Edzná. Campeche, Campeche.
- De la Peña, E., Echeverría, S.R., van der Putten, W.H., Freitas, H. and Moens M. 2006. Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. *New Phytol.* 169:829-840.
- Declerck, S. 1993. Comparative effects of two strain of VAM on growth and nutrition of micropropagated banana plants (*Musa acuminata colla* c.v. Giant Cavendish). 9th North American Conference on Mycorrhizae. Guelph, Canada.
- Durán-Prado, A., Aguirre-Medina, J.F., González-Cu, G., Peña del Río, M.A. y Schonhoven-Cordero, E. 2001. Producción *in vivo* de micorriza-arbuscular *Glomus intraradices* con *Brachiaria brizantha* como hospedero en camas reproductoras. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Cotaxtla. Folleto Técnico 29. Cotaxtla, Veracruz.
- Durán-Prado, A. 2000. Validación de biofertilizantes en el cultivo de frijol de humedad residual. Informe de Avances y Resultados del ciclo OI 1999-2000. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Golfo Centro. Campo Experimental Cotaxtla. Cotaxtla, Veracruz.
- Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S. 1989. Cellular and genetics aspects of interactions between host and fungal symbionts in mycorrhizae. *Genome* 31:336-341.
- González-Camarillo, M. 2010. Informe del Proyecto Transferencia de Tecnología en Biofertilizantes-SAGARPA-FIRCO. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional de Pacífico Sur. Campo Experimental Iguala. Iguala, Gro.

- Grageda-Cabrera, O. 2008. Desarrollo de manejo de suelo y prácticas de conservación para la producción agrícola sostenible y protección del ambiente. Informe Anual de Labores del Programa de Biofertilizantes. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro. Campo Experimental Bajío. Celaya, Gto.
- Habte, M. and Aziz, T. 1985. Responses of *Sesbania grandiflora* to inoculation of soil with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:701-703.
- Hayman, D.S. 1983. The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Can. J. Bot.* 50:944-963.
- Irizar-Garza, M.B.G., Vargas-Vázquez, P., Garza-García, D., Tut y Couoh, C., Rojas-Martínez, I., Trujillo-Campos, A., García-Silva, R., Aguirre-Montoya, D., Martínez-González, J.C., Alvarado-Mendoza, S., Grageda-Cabrera, O., Valero-Garza, J. y Aguirre-Medina, J.F. 2003. Respuesta de cultivos agrícolas a los biofertilizantes en la región central de México. *Agr. Téc. Méx.* 29:213-225.
- Koide, R.T. and Schreiner, R.P. 1992. Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 43:557-581.
- Manjunath, A. and Habte, M. 1988. Development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and the uptake of immobile nutrients in *Leucaena leucocephala*. *Plant Soil* 106:97-103.
- Miller, R.M. and Jastrow, J.D. 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. *In: Arbuscular mycorrhizas: physiology and function.* Kapulnik, Y. and Douds, D. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Moroyoqui-Ovilla, D.M. y Aguirre-Medina, M.J.F. 2002. Avances en el desarrollo vegetativo del café var. Oro Azteca con diferentes sustratos y dos microorganismos en vivero. *In: Memorias del Primer Congreso Internacional de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria Chiapas 2002.* Fundación Chiapas Produce. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- Olalde, P.V. y Serratos, R. 2004. Biofertilizantes: Micorrizas y bacterias promotoras del crecimiento vegetal. *In: Simposio de Biofertilización.* INIFAP/Centro de Biotecnología Genómica-IPN. Campo Experimental Río Bravo-INIFAP. Río Bravo, Tamaulipas.

- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H. and Kerp, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhiza. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:11841-11843.
- Rillig, M.C. and Mummey, D.L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. New Phytol. 171:41-53.
- Román-Reyes, J. 2010. Informe final del proyecto: Validación de Productos Orgánicos en Módulos en la Región Sur Sureste de Mexico. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacifico Centro. Campo Experimental Cotaxtla. Cotaxtla, Veracruz.
- Smith, S.E. and Gianinazzi-Pearson, V. 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39:221-244.
- Trappe, J.M. 1987. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: Safir, G.R. (ed). Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants. CRC Press. Boca Raton.
- Utkhede, R.S., Koch, C.A. and Menzies, J.G. 1999. Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Phytium aphanidermatum*. Can. J. Plant Pathol. 21:265-271.
- Van Peer, R., Niemann, G.J. and Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. Phytopathol. 81:728-734.
- Wright, S.F. and Upadhyaya, A. 1998. A survey for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil 198:97-107.

Capítulo 10

Inoculantes Microbianos como Promotores de la Producción Sostenible de Maíz en Condiciones Semiáridas

Arturo Díaz Franco^{1*}, Catarina Loredo Osti², Jesús García Olivares³, Héctor Manuel Cortinas Escobar¹, María de los Ángeles Peña del Río⁴

¹Campo Experimental Río Bravo, INIFAP, Km 61 Carretera Matamoros-Reynosa, Río Bravo, Tam. C.P. 88900.

²Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Anayansi 208, Col. Himno Nacional, 2ª. Sección, San Luis Potosí, S.L.P. C.P. 78369.

³Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Blvd. del Maestro s/n esquina Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tam. C.P. 77810.

⁴Campo Experimental General Terán, INIFAP, Km 31 Carretera Montemorelos-China, Col. ex-Hacienda Las Anacuas, General Terán, N.L. C.P. 67400.

*Autor de Correspondencia
email: diaz.arturo@inifap.gob.mx
Tel: (899) 9244181

En México el maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo de mayor importancia alimentaria y socioeconómicamente. Cada año se destinan 8.5 millones de hectáreas para la siembra de esta gramínea, lo que representa el 65% de la producción total de cereales. En el noreste de México, el maíz es el cultivo más sobresaliente en el ciclo primavera-verano, principalmente para las áreas de temporal, con una producción que representa el 6.8% de participación nacional. En particular, en los estados de San Luis Potosí, Nuevo León y Tamaulipas se estima que se destinan alrededor de 354 mil hectáreas para el cultivo de maíz, principalmente para autoconsumo, con rendimientos de grano que oscilan de 0.97 para San Luis Potosí y 1.09 a 4.61 t ha⁻¹ en Tamaulipas y Nuevo León. Tamaulipas tiene la mayor superficie de maíz de riego (75 mil ha) y el 60% se concentra particularmente en el norte del estado (SAGARPA, 2010). La fertilización química es una práctica agronómica común en parcelas de riego y cuya inversión representa alrededor del 30% de los costos de la producción. Contrariamente en áreas de temporal esta labor es menos usual y puede representar hasta el 60% de los costos de producción (Aguado-Santacruz, 2011). Este porcentaje tal alto, en conjunción con los altos costos de los fertilizantes químicos, ocasionan que los productores no utilicen estos insumos, particularmente en sistemas de producción de temporal (SAGARPA, 2009).

Es claro el interés que se ha puesto en la aplicación del manejo de prácticas que mejoren la sustentabilidad de los agroecosistemas. La inoculación microbiana es una práctica ecológica conocida durante años, principalmente a través del uso de *Rhizobium* en leguminosas. No obstante, en las últimas décadas el desarrollo de otros microorganismos benéficos como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) han representado una alternativa biotecnológica con un gran potencial en la producción agrícola (Bashan, 2008). En México se le ha dado seguimiento a diferentes estudios con inoculantes microbianos o 'biofertilizantes' para establecer el valor práctico de su manejo en condiciones de campo (Irizar *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2008b; García *et al.*, 2008; Aguirre, 2006). La 'biofertilización' constituye un componente tecnológico importante que incrementa la sostenibilidad de la producción agrícola, promueve la sanidad y la nutrición de los cultivos y reduce el uso de fertilizantes inorgánicos (Ferrera y Alarcón, 2008; Olalde y Serratos, 2008; Holguín *et al.*, 2003). Los HMA y las BPCV tienen la capacidad de incrementar la tolerancia de las plantas a deficiencias nutrimentales y otros factores abióticos y bióticos. Su importancia se fundamenta en la asociación simbiótica que se establece en las raíces de las plantas, la cual afecta profundamente las interacciones que se presentan entre el suelo, las plantas, patógenos y otros microorganismos del suelo. Los beneficios en la productividad se sustentan a través de diversos mecanismos como la fijación de N₂ atmosférico, producción de fitohormonas y sideróforos, mineralización de materia orgánica, solubilización de ortofosfatos y filosilicatos, transporte de nutrimentos y agua a la planta y biocontrol de fitopatógenos, factores que tienen un impacto ecológico y económico muy relevante (Jeffries *et al.*, 2003; Glick *et al.*, 1999; Holguín *et al.*, 2003).

En maíz, las plantas inoculadas con HMA aumentan su biomasa total y proteína soluble (Boucher *et al.*, 1999) y la asimilación de N, P, K, Ca, Cu, Mg y Zn (Khalil *et al.*, 1994; Kothari *et al.*, 1990), así como la biomasa radical y el rendimiento de grano o forraje (Arihara y Karasawa, 1999; Loredó *et al.*, 2007a). Por otra parte, la inoculación con la BPCV *Azospirillum brasilense*, ha mostrado un efecto benéfico en el rendimiento de diversos genotipos de maíz

(Arsac *et al.*, 1990; Dobbelaere *et al.*, 2002). También en maíz se ha encontrado un sinergismo con la inoculación combinada entre *A. brasilense* y HMA que induce mayor crecimiento y asimilación de P, Fe y Mn (Bashan, 1998; Hernández *et al.*, 2000; Robles y Baera, 2004), así como una mayor producción de biomasa aérea y radical (Vázquez *et al.*, 2000).

Son múltiples los factores edafoclimáticos que pueden afectar la funcionalidad de los HMA y BPCV en las plantas, lo que origina que se puedan seleccionar microorganismos aptos para tolerar condiciones ambientales adversas, además de que pueden ser sujetos de manipulación en laboratorio para optimizar sus efectos sobre la productividad de los cultivos. Es por lo tanto el objetivo del presente libro informar sobre los avances y experiencias del INIFAP sobre la efectividad de HMA *Glomus intraradices* y *A. brasilense* como microorganismos promotores del crecimiento de maíz en algunas regiones áridas y semiáridas del noreste de México.

Manejo de los inoculantes microbianos en la semilla de maíz

Los microorganismos descritos en el presente estudio son el HMA *G. intraradices* y la BPCV *Azospirillum brasilense*. La cepa regional de *G. intraradices* (INIFAP) es propagada en el Campo Experimental 'General Terán' del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en General Terán, N. L., mediante el sistema de camas reproductoras (Durán *et al.*, 2001) en invernadero, utilizando como planta hospedera el pasto Sudán (*Sorghum vulgare* var. *sudanensis*).

El acarreador, sustrato a base de suelo y raíces colonizadas, es triturado y molido para asegurar que el producto contenga no menos de 40 esporas g⁻¹ al momento de su empaquetado. También se utilizó la cepa regional de *A. brasilense* (CBG-497) del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, ubicado en Reynosa, Tam. Esta cepa es preparada en turba para contener una concentración no menor a 1 x 10⁶ UFC (Mendoza *et al.*, 2008). La inoculación de semilla de maíz con *G. intraradices* se hizo a razón de 0.5 kg de inoculante por hectárea. Para llevar a cabo la adhesión del biofertilizante a la

semilla requerida para una hectárea se utilizaron 60 ml de carboximetil celulosa y 500 ml de agua (Díaz *et al.*, 2008b). En el caso de *A. brasilense*, se utilizaron 0.4 kg del producto para la misma cantidad de semilla (Mendoza *et al.*, 2008).

Maíz forrajero en temporal

En los agostaderos del Altiplano Potosino la producción de forraje es deficiente, lo cual plantea serios problemas para la alimentación del ganado. El establecimiento de forrajes de corte se ve limitado por la escasa precipitación y la baja fertilidad del suelo. Asimismo, la aplicación de fertilizantes químicos no es viable porque incrementa los costos de producción, además de que los resultados son erráticos debido a la deficiente humedad (Loredo *et al.*, 2007a; Loredo *et al.*, 2004). Por lo anterior, en dos localidades de temporal de San Luis Potosí se realizó un estudio con maíz para la producción de forraje fresco en el cual se evaluaron los siguientes tratamientos: a) fertilización química con 40 y 20 kg ha⁻¹ de nitrógeno y fósforo, respectivamente; b) inoculación de la semilla con *G. intraradices*, en combinación o no con *A. brasilense*; y c) testigo absoluto. Dentro de estos tratamientos se hicieron mediciones de contenido de nitrógeno foliar, altura de planta, volumen de raíz y rendimiento de forraje fresco.

En comparación con el testigo, se observó que, en general, los mayores incrementos en las variables cuantificadas correspondieron a los tratamientos que incluyeron fertilización química e inoculación con el HMA. La inoculación combinada de *G. intraradices* y *A. brasilense*, no tuvo un efecto sinérgico. Estos resultados demuestran que la inoculación micorrízica fue una práctica competitiva, por su actividad simbiótica, con relación a la fertilización química (Cuadro 1). Además, representa una práctica ecológica y económica, que reduce los costos de producción de maíz y que posee potencial para ser utilizada en las regiones áridas del estado de San Luis Potosí.

Maíz para elote y grano en temporal

Para la producción bajo condiciones de temporal de maíz para grano o elote normalmente se utilizan dosis bajas de fertilización mineral. En condiciones del

temporal semiárido del norte de Tamaulipas se realizó un estudio en dos localidades en las que no se utilizó fertilización química; en una de ellas se utilizó el híbrido de maíz HV1 (para grano) y en la otra el Asgrow 7573 (para elote). La semilla de estos dos materiales se inoculó con *G. intraradices* y *A. brasilense*, en forma independiente o combinada, y se cuantificó la producción de elote y grano.

Los microorganismos benéficos, solos o combinados, incrementaron el rendimiento de elote en los dos híbridos de maíz con relación al testigo. Los simbiontes no tuvieron impacto sobre el rendimiento de grano del híbrido HV1, pero sí en el híbrido Asgrow 7573; en el rendimiento promedio de ambos cultivares el efecto no fue significativo. Aunque no se potencializó la producción con la inoculación dual de los microorganismos, la inoculación individual o combinada resultó en una promoción de rendimiento similar en este estudio (Cuadro 2). Alvarado y Díaz (2003), igualmente, reportaron aumento en la producción de elote con los mismos simbiontes.

Maíz para grano en riego

Contrariamente a las condiciones de temporal, la producción de maíz en las regiones irrigadas del noreste de México implica fertilización inorgánica. Por lo que era de interés conocer la respuesta de maíz (DK2020Y) a los simbiontes *G. intraradices* y *A. brasilense*, solos o en combinación, bajo condiciones de riego y en suelo fertilizado con 160 y 60 kg ha⁻¹ de nitrógeno y fósforo, respectivamente. Particularmente, para este estudio se midieron el índice de clorofila, altura de planta y rendimiento de grano.

Cuadro 1. Efecto de la fertilización química e inoculación de *Glomus intraradices* y *Azospirillum brasilense* sobre distintas variables fisiológicas y rendimiento de forraje fresco de maíz en dos áreas de temporal (modificado de Loredo et al., 2007a).

Tratamiento	Nitrógeno foliar (%)	Altura de planta (m)	Volumen raíz (cm ³)	Rendimiento forraje (kg ha ⁻¹)
		San Pedro		
<i>G. intraradices</i> (G)	3.51 a ^{1/}	1.26 a	155 a	18027 a
<i>A. brasilense</i> (A)	3.04 b	0.84 b	65 c	8616 d
G + A	3.34 ab	1.19 ab	130 b	12439 c
40-20-00	3.44 a	1.34 a	130 b	15675 b
Testigo	2.48 c	0.99 b	40 d	6459 e
		Cerritos		
<i>G. intraradices</i> (G)	2.65 a	1.82 a	--	14989 ab
<i>A. brasilense</i> (A)	2.06 b	1.47 ab	--	11263 c
G + A	2.50 ab	1.64 ab	--	13518 b
40-20-00	2.53 ab	1.70 ab	--	16851 a
Testigo	2.40 ab	1.37 b	--	10282 c

^{1/} Valores seguidos por la misma letra en cada variable son significativamente iguales de acuerdo a pruebas de Tukey (P<0.05).

Cuadro 3. Clorofila y rendimiento de grano de maíz inoculado con dos microorganismos benéficos. Río Bravo, Tam.

Tratamiento	Índice de clorofila ^{1/}	Altura de planta (cm)	Rendimiento (kg ha ⁻¹)
<i>Glomus intraradices</i> (G)	44.4 a ^{2/}	217	8869 a
<i>Azospirillum brasilense</i> (A)	41.3 b	219	8018 ab
A + G	40.0 bc	210	7878 b
Testigo	37.6 c	207	7520 b

^{1/} Unidades SPAD

^{2/} Valores seguidos por la misma letra en cada variable son significativamente iguales de acuerdo a pruebas de diferencia mínima significativa (P<0.05)

Cuadro 4. Efecto de la inoculación con *A. brasilense* sobre el rendimiento de forraje seco y grano de maíz de riego en distintas localidades del centro-norte de Tamaulipas (García et al., 2008).

Municipio	Híbrido	Grano (t ha ⁻¹)		Forraje (t ha ⁻¹)	
		<i>A. brasilense</i>	Testigo	<i>A. brasilense</i>	Testigo
Abasolo	Asgrow Tigre	4.9*	4.4	7.5*	7.0
Díaz Ordaz	Asgrow Tigre	7.8	7.6	6.0	6.0
Valadeces	Asgrow Tigre	10.2	10.0	7.2	7.0
Reynosa	Dekalb-2003	7.4*	6.1	4.6	5.2
Río Bravo	Garst-8222	7.9	7.6	3.0	2.8

*Diferencias significativas (P<0.05) entre tratamientos para cada variable con base a pruebas de t-student.

Se observó que tanto el índice de clorofila en el estado de floración como el rendimiento final de grano fue superiores en los tratamientos que incluyeron las inoculaciones individuales con *G. intraradices* o *A. brasilense* (Cuadro 3), encontrándose una correlación positiva entre el contenido de clorofila y el rendimiento ($r=0.98$). Por el contrario, ninguno de los tratamientos tuvo influencia sobre la altura de planta. Estos resultados muestran que aún bajo un manejo más tecnificado, con riego y fertilización química, los microorganismos pueden incrementar los rendimientos de maíz. Tal como se indicó en el estudio de temporal árido, el rendimiento obtenido con la combinación de los dos microorganismos, fue inclusive inferior a la acción independiente de cada uno de estos por separado (Cuadro 3). Diferentes estudios (Montaño *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2008c) indican que los HMA tienen efectividad aún en suelos fertilizados. Johnson y Pflieger (1992) concluyen que *G. intraradices* es particularmente insensible a la fertilización química, mientras que Díaz y Garza (2007) reportan que este mismo HMA promovió el crecimiento de sorgo y cártamo (*Carthamus tinctorius*) en un suelo de baja fertilidad.

Respuesta a la inoculación con *Azospirillum brasilense* en parcelas comerciales de riego

Para conocer la respuesta del maíz a la inoculación de *A. brasilense*, se desarrollaron trabajos en diferentes localidades irrigadas del centro y norte de Tamaulipas con manejo comercial de maíz. La semilla se sembró mecánicamente después de la inoculación. En cada localidad se sembró el híbrido de maíz preferido por el productor en suelo fertilizado con 140 y 40 kg ha⁻¹ de nitrógeno y fósforo, respectivamente; en una hectárea se estableció la rizobacteria y en otra hectárea no se inoculó (testigo). Se estimó el rendimiento de grano y de forraje en términos de biomasa seca (Cuadro 4).

Los resultados de este estudio indicaron un incremento consistente en el rendimiento de grano con la inoculación de *A. brasilense* en las distintas localidades. Con el híbrido Asgrow Tigre el promedio de aumento fue de 300 kg ha⁻¹, mientras que en las parcelas sembradas con Dekalb-2003 y Garst-8222 se registró un incremento en el rendimiento medio de 600 kg ha⁻¹.

Por el contrario, la producción de forraje seco promedio aumentó en 233 y 200 kg ha⁻¹ para los materiales de maíz Asgrow Tigre y Garst-8222, respectivamente, mientras que en Dekalb-2003 se encontró una reducción de 600 kg ha⁻¹ (Cuadro 4). Por lo anterior, se concluye que es posible mejorar la producción de maíz con el uso de *A. brasilense* bajo condiciones de riego y fertilización química. En un estudio de 20 años con inoculación de *A. brasilense* en campo (Okon y Labandera, 1994), se demostró la factibilidad de la aplicación de esta BPCV como inoculante para la agricultura.

Comparación de la efectividad de distintos biofertilizantes comerciales

En los últimos años han surgido en el mercado diferentes inoculantes o productos comercializados como biofertilizantes para la agricultura. Con el propósito conocer la efectividad de algunos biofertilizantes comerciales se realizó un estudio con maíz (P3025W) en Río Bravo, Tam., en el cual se consideró solamente un riego de auxilio debido a las restricciones para el uso de agua de riego impuestas por la Comisión Nacional de Agua (Díaz *et al.*, 2011). Los tratamientos de inoculación a la semilla fueron: a) *Glomus intraradices* INIFAP a razón de 0.5 g ha⁻¹, b) 1 kg ha⁻¹ de Flower Saver[®] [mezcla de HMA, rizobacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo y promotoras de crecimiento, extractos de yuca (*Yucca schidigera*) y algas marinas (*Ascophyllum nodosum*)], c) 60 g ha⁻¹ de Burize TS[®] (*G. intraradices*) y d) CIDEF-4[®] (producto que contiene bioestimulantes de origen vegetal conocidos como brasinoesteroides) asperjado al follaje en dos aplicaciones de 100 mL ha⁻¹. Los tratamientos testigo fueron la parcela fertilizada (120 y 40 kg ha⁻¹ de nitrógeno y fósforo, respectivamente) y testigo absoluto. Se cuantificaron la producción de elote y grano, así como el contenido de proteína cruda en el grano (Cuadro 5).

Aunque tanto la fertilización química como los distintos tratamientos con biofertilizantes superaron la producción del testigo absoluto, las parcelas inoculadas con el biofertilizante de *G. intraradices* producido por el INIFAP obtuvieron los mayores rendimientos de elote y grano.

Se observó que la fertilización química mostró rendimientos de elote cercanos a los obtenidos en las parcelas inoculadas con el biofertilizante micorrícico del INIFAP, mientras que la combinación del biofertilizante de *G. intraradices* INIFAP más CIDEF-4, no resultó en un efecto sinérgico sobre la productividad de maíz. Estos resultados muestran la efectividad relativamente mayor del biofertilizante elaborado por el INIFAP a base de *G. intraradices* con relación a otros biofertilizantes comerciales y la fertilización química en condiciones de riegos limitado. El contenido de proteína en el grano fue semejante entre los tratamientos evaluados (Cuadro 5). Otros estudios con sorgo de temporal y riego, también han demostrado el impacto de los biofertilizantes sobre la productividad de diversos cultivos (Pecina *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2008a).

Cepas de microorganismos experimentales

Biofertilizantes experimentales elaborados a base de microorganismos potencialmente benéficos para los cultivos de regiones áridas y semiáridas del noreste de México (Loredo *et al.*, 2007a; Peña del Río *et al.*, 2007; Aguado-Santacruz *et al.*, 2009; Aguado-Santacruz *et al.*, 2010) se sometieron a evaluación de campo. Los microorganismos evaluados incluyeron seis cepas experimentales de HMA (códigos 3, 20, 32, 35, 39 y 55) y un biofertilizante bacteriano elaborado a base de un consorcio de diferentes cepas de la bacteria promotora de crecimiento *Pseudomonas*. La efectividad de estas cepas experimentales se comparó con el biofertilizante comercial del INIFAP elaborado a base de *G. intraradices* y un testigo fertilizado con la dosis de 120 y 40 kg ha⁻¹ de nitrógeno y fósforo, respectivamente (Cuadro 6). Este estudio se llevó a cabo con maíz (P3025W) en condiciones de riego. Se midió el índice de clorofila, la colonización micorrízica radical y el rendimiento de grano.

El contenido de clorofila en el estado de floración fue mayor con la inoculación de la micorriza INIFAP. La mayor colonización micorrízica radical en madurez la alcanzaron las cepas de HMA 55, 32, 20 e INIFAP. Se observó mayor biomasa foliar con *Pseudomonas* spp., el HMA INIFAP y la fertilización

química (120-40-00). El mayor rendimiento de grano se registró en el testigo fertilizado, seguido por el HMA INIFAP. Los resultados indicaron que la efectividad de los microorganismos experimentales en maíz fue inferior a la manifestada por la cepa INIFAP (Cuadro 6). Es importante continuar con la búsqueda e identificación de microorganismos que incrementen la productividad de cultivos como maíz y que puedan ser empleados para la formulación de nuevos biofertilizantes.

***Glomus intraradices* y fertilización inorgánica**

Esta investigación se desarrolló en Río Bravo, Tam. para comparar el efecto de la fertilización química y la inoculación con *G. intraradices* sobre la productividad de maíz (P3025W) y sorgo (P83G63), ambos como monocultivos anuales, tanto en condiciones de riego como de temporal durante cinco años ininterrumpidos. En condiciones de riego, la fertilización química para maíz fue de 120-40-00 y para sorgo de 100-30-00, mientras que en condiciones de temporal se utilizó la dosis 60-20-00 para ambos cultivos. Durante la conducción del estudio, los tratamientos fueron repetidos tres veces, se establecieron en el mismo sitio y la siembra fue mecanizada y con humedad residual (Cuadro 7). Al término del estudio, se determinó el rendimiento de grano y la rentabilidad de la producción a través de la relación beneficio-costo: $B/C = RG \times P/C$ (RG, rendimiento de grano; P, precio; C, costo).

Cuadro 5. Productividad en maíz inoculado con diferentes biofertilizantes comerciales (Pecina et al., 2008).

Tratamiento	Rendimiento (kg ha ⁻¹)		Proteína en grano (%)
	Eloje	Grano	
G. intraradices (G)	13450 a ^{1/}	3896 a	8.03
CIDEF-4® (B)	12175 b	3370 ab	7.56
G + B	12425 b	2972 b	7.62
FQ (120-40-00)	12748 ab	3481 ab	7.22
Flower Saver®	12075 b	3314 b	8.24
Burize TS®	12500 b	3526 ab	8.26
Testigo absoluto	11225 c	3277 b	7.26

^{1/} Valores seguidos por la misma letra en cada variable son significativamente iguales de acuerdo a pruebas de diferencia mínima significativa (P<0.05).

Cuadro 6. Efecto de la inoculación a la semilla de cepas de microorganismos experimentales sobre distintas variables agronómicas y rendimiento de maíz cultivado bajo condiciones de riego. Río Bravo, Tam.

Tratamiento	Índice clorofila ^{1/}	Colonización		Biomasa (g)		Rendimiento (kg ha ⁻¹)
		(%)	Radical	Foliar	Radical	
<i>Gigaspora</i> sp. (20)	41.8 b ^{2/}	83.0 a	14.2 b	269.6 ab	14.2 b	8304 bc
<i>Glomus mosseae</i> (3)	44.4 b	68.3 abc	13.7 b	253.2 ab	13.7 b	7859 c
<i>G. mosseae</i> (32)	44.5 b	90.3 a	10.8 b	267.2 ab	10.8 b	8175 bc
<i>G. mosseae</i> (35)	44.0 b	77.6 ab	15.9ab	267.2 ab	15.9ab	8829 bc
<i>G. mosseae</i> (39)	43.0 b	78.3 ab	12.2 b	284.4 ab	12.2 b	8207 bc
<i>G. mosseae</i> (55)	43.3 b	87.3 a	13.1 b	197.2 b	13.1 b	7630 c
<i>Pseudomonas</i> spp.	44.5 b	51.3 bc	14.7 b	330.0 a	14.7 b	7986 bc
<i>G. intraradices</i> (INIFAP)	50.1 a	88.0 a	20.4 a	356.4 a	20.4 a	9620 ab
FQ (120-40-00)	45.1 ab	39.6 c	14.0 b	304.0 a	14.0 b	11364a

^{1/} Unidades SPAD.

^{2/} Valores seguidos por la misma letra en cada variable son significativamente iguales de acuerdo a pruebas de Tukey (P<0.05).

Cuadro 7. Influencia de la fertilización química y la inoculación con *Glomus intraradices* sobre el rendimiento de grano y la rentabilidad (beneficio/costo) de los cultivos de maíz y sorgo cultivados bajo condiciones de riego o temporal. Resultados promedio de cinco años de evaluación (Salinas, 2006).

Cultivo	Fertilización química (t ha ⁻¹) ^{1/}	Beneficio/costo	<i>G. intraradices</i> (t ha ⁻¹)	Beneficio/costo
<i>Riego</i>				
Maíz	6.47 a ^{2/}	2.6	5.50 b	2.9
Sorgo	5.52 a	2.5	4.81 b	2.9
<i>Temporal</i>				
Maíz	3.50 a	1.9	3.14 a	2.0
Sorgo	3.90 a	2.8	3.72 a	3.4

^{1/} Las dosis de fertilización fueron: riego, 120-40-00 y 100-30-00 para maíz y sorgo, respectivamente; temporal, 60-20-00 para ambos cultivos.

^{2/} Valores seguidos por la misma letra en cada variable son significativamente iguales de acuerdo a pruebas de diferencia mínima significativa (P<0.05).

Los resultados demostraron que bajo condiciones de riego y en ambos cultivos, el rendimiento de grano fue mayor en las parcelas con fertilización inorgánica que en aquellas que fueron biofertilizadas con HMA. Bajo condiciones de temporal, en contraste, la producción de grano fue estadísticamente similar entre ambos tratamientos tanto para maíz como sorgo. No obstante, el tratamiento con HMA impactó favorablemente la rentabilidad de ambos cultivos y bajo las dos condiciones de humedad al mejorar la relación beneficio-costo. Este resultado deriva tanto del incremento en productividad provocado por *G. intraradices* como de la reducción de costos asociados a los fertilizantes químicos (Cuadro 7). Los resultados obtenidos sugieren que el HMA puede ser

utilizado como una alternativa viable para reducir los costos de producción y aumentar la relación beneficio-costos en maíz y sorgo, indistintamente de la condición de humedad.

Un estudio posterior realizado bajo condiciones de riego con un productor cooperante confirmó este hallazgo. En esta investigación se comparó el efecto de la inoculación micorrízica en maíz (Tech Ag 8535) bajo diferentes dosis de fertilización. Los tratamientos evaluados incluyeron el tratamiento de fertilización química utilizado por el productor (fertilización química completa o FQ 100%= 100, 60 y 40 kg ha⁻¹ de nitrógeno, fósforo y azufre, respectivamente), la mitad de la dosis aplicada por el productor (50% de la fertilización química o FQ 50 %), las combinaciones de FQ 100% y 50% con la inoculación de *Glomus intraradices*, y la inoculación del HMA sin fertilización química. El manejo del cultivo fue mecanizado y cada tratamiento ocupó una hectárea. En floración se midió el índice de clorofila, y al final del ciclo del cultivo se determinaron la biomasa fresca foliar y radical y el rendimiento de grano (Cuadro 8).

El mayor contenido de clorofila en floración se registró en el tratamiento que incluyó la fertilización completa (FQ 100%) más *G. intraradices*. La biomasa foliar fue superior con la FQ 50% más *G. intraradices*, mientras que la mayor biomasa radical se registró con el HMA. Con relación al rendimiento de grano, los mayores valores se obtuvieron en las parcelas que incluyeron la mitad de la fertilización química y *G. intraradices* (Cuadro 8). Estos resultados reflejan, por un lado, que es posible reducir la dosis de fertilización química cuando la semilla se inocula con el HMA, y por otro, se repiten los resultados mencionados anteriormente que indican que a pesar de los menores rendimientos obtenidos empleando únicamente la micorriza INIFAP, los indicadores económicos se inclinan a favor del empleo de esta tecnología. Estos datos reflejan la posibilidad de establecer un manejo agronómico más sostenible de los cultivos mediante el uso de biofertilizantes.

Cuadro 8. Características de planta y rendimiento de grano de maíz relacionadas con la fertilización química y la inoculación de HMA. Reynosa, Tam.

Tratamiento	Índice clorofila ^{1,2}	Biomasa fresca (g) Foliar Radical	Rendimiento (kg ha ⁻¹)
1) 100-60-00 + 40 S (FQ 100 %)	50.7 b ^{2,1}	600 b	6333 ab
2) FQ 100 % + <i>G. intraradices</i>	53.3 a	684 ab	6493 ab
3) 50-30-00 + 20 S (FQ 50 %) + <i>G. intraradices</i>	49.9 b	731 a	6699 a
4) <i>G. intraradices</i>	48.6 c	621 b	6132 b

^{1,2} Unidades SPAD.

^{2,1} Valores seguidos por la misma letra en cada variable son significativamente iguales de acuerdo a pruebas de diferencia mínima significativa (P<0.05).

***Glomus intraradices* en sistemas de labranza**

Se ha dirigido una gran atención a la implementación de prácticas culturales que incrementen la transformación y la retención de materia orgánica en el suelo para ayudar a la sostenibilidad de los agroecosistemas (Bayer *et al.*, 2001; Roldán *et al.*, 2005). Particularmente en la agricultura de temporal el manejo del suelo es una consideración prioritaria y debe tener como propósito, entre otros factores, la conservación de la humedad (Roldán *et al.*, 2006). La pudrición carbonosa del tallo (*Macrophomina phaseolina*) es una enfermedad importante del maíz en condiciones cálidas y secas, que aunque se presenta al final de su ciclo, puede causar graves daños por acame de las plantas en presencia de fuertes vientos o por la susceptibilidad del genotipo a la enfermedad (Girón, 1993; Doubrava y Blake, 2004). Considerando estas premisas se llevó a cabo un estudio en condiciones de temporal durante el periodo 2003-2005 para determinar el efecto, individual y combinado, del empleo de distintos sistemas de labranza y la inoculación con *Glomus intraradices* sobre la incidencia y severidad de la pudrición carbonosa y el rendimiento de maíz (P3025W). Los sistemas de labranza consistieron en barbecho, subsuelo-bordeo, destronque-bordeo y labranza cero, y se utilizaron dos tipos de fertilización, inoculación del HMA a la semilla y testigo fertilizado a razón de 60 y 20 kg ha⁻¹ de nitrógeno y fósforo, respectivamente (Cuadro 9) La pudrición carbonosa se midió por su incidencia (porcentaje de plantas) y por la severidad (entrenudos infectados).

La menor incidencia y severidad de *M. phaseolina* se observó en la labranza cero (Cuadro 9). Este efecto benéfico también fue constatado por Claflin y Giorda (2002) quienes utilizando labranza cero lograron reducir a un mínimo (11%) la pudrición carbonosa de sorgo en comparación con los sistemas de labranza mínima y convencional. Al parecer con el sistema de labranza cero se favorece un microclima y una mayor actividad microbiana en el suelo que son factores desfavorables para el patógeno (Roldán *et al.*, 2005; Sturz *et al.*, 1997; Almeida *et al.*, 2003). Sin embargo, se puede inferir que la enfermedad no tuvo impacto en el rendimiento (no se observó acame) ya que,

sin mostrar diferencias significativas entre ellos, los mayores rendimientos de grano fueron observados en los sistemas de barbecho, subsoleo-barbecho y destronque-bordeo con un promedio de 4050 kg ha⁻¹, comparado con el menor rendimiento obtenido con labranza cero (3226 kg ha⁻¹; Cuadro 9). Salinas (2004) menciona que estos resultados son el producto del rompimiento de las capas compactas del suelo, antes de la aparición de las lluvias, lo cual conlleva a un incremento en la tasa de infiltración de agua en el perfil del suelo y, por tanto, a un mejor desarrollo de los cultivos de temporal. Los sistemas de labranza no influyeron en la colonización micorrízica y el índice de clorofila (Cuadro 9).

La inoculación de la semilla de maíz con *G. intraradices* resultó semejante que el testigo fertilizado en cuanto al contenido de clorofila, incidencia y severidad de pudrición carbonosa y rendimiento de grano, aunque hubo mayor colonización radical en el tratamiento inoculado (Cuadro 10). Lo anterior concuerda con lo reportado por Salinas (2006) (Cuadro 7), sobre la eficiencia comparativa del HMA con relación a la fertilización química; otra ventaja es en el contexto de agricultura ecológica, ya que esta práctica no impacta en la contaminación del suelo y agua como sucede en la fertilización inorgánica (Bashan, 2008; Aguirre, 2006; Olalde y Serratos, 2008). Se encontraron correlaciones positivas entre el contenido de clorofila y el rendimiento de grano ($r=0.93$), así como entre la incidencia y la severidad de la pudrición carbonosa ($r=0.94$).

Cuadro 9. Valores de clorofila, incidencia y severidad de pudrición carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), colonización micorrízica y rendimiento de maíz de temporal cultivado bajo condiciones de distintos sistemas de labranza, utilizando fertilización química e inoculación micorrízica. Promedio de tres años de evaluación (Díaz et al., 2008c).

Labranza	Índice clorofila ^{1/}	Pudrición carbonosa (%)	Entrenudos infectados (no.)	Colonización micorrízica (%)	Rendimiento grano (kg ha ⁻¹)
Barbecho	44.6	68.8 a ^{2/}	1.54 a	38.1	4150 a
Subsoleo-barbecho	43.9	81.0 a	1.61 a	37.8	4043 a
Destronque-bordeo	42.8	67.5 a	1.51 a	42.3	3957 a
Labranza cero	41.3	29.1 b	1.00 b	44.4	3226 b

^{1/} Unidades SPAD.

^{2/} Valores seguidos por la misma letra en cada variable son significativamente iguales de acuerdo a pruebas de Tukey (P<0.05).

Cuadro 10. Valores de clorofila, incidencia y severidad de *Macrophomina phaseolina*, colonización micorrizica y rendimiento de grano de maíz relacionados con la inoculación de *Glomus intraradices* (Díaz et al., 2008c).

Labranza	Índice clorofila ^{1/}	Pudrición carbonosa (%)	Entrenudos infectados (no.)	Colonización micorrizica (%)	Rendimiento grano (kg ha ⁻¹)
<i>G. intraradices</i>	43.1	57.7	1.41	46.3 a ^{2/}	3696
Testigo (60-20-00)	43.6	59.2	1.48	36.1 b	3973

^{1/} Unidades SPAD.

^{2/} Valores seguidos por la misma letra en cada variable son significativamente iguales de acuerdo a pruebas de Tukey (P<0.05)

Conclusiones

La inoculación de la semilla de maíz con *G. intraradices* o *A. brasilense*, en condiciones de temporal o riego resultó en un incremento en la productividad y en la rentabilidad del cultivo en comparación con las parcelas sin biofertilizantes. En nuestra experiencia de campo no hemos logrado detectar efectos sinérgicos con la inoculación simultánea de ambos simbiontes. Nuestros resultados muestran que *A. brasilense* promovió incrementos consistentes en los rendimientos de grano pero no significativos, con respecto al no inoculado en parcelas comerciales con híbridos de maíz. La micorriza INIFAP, elaborada con base en *G. intraradices*, registró la mayor efectividad cuando fue comparada con biofertilizantes comerciales o cepas de microorganismos benéficos experimentales. Los rendimientos promedio obtenidos durante una evaluación de cinco años en los cultivos de maíz y sorgo de riego fertilizados con las dosis 120-40-00 y 100-30-00, respectivamente, superó ($p < 0.05$) de 13-15% a la inoculación con *G. intraradices*. Por el contrario, los rendimientos de ambos cultivos obtenidos bajo condiciones de temporal con fertilización química (60-20-00) y HMA fueron semejantes. No obstante, en las dos condiciones de humedad y en los dos cultivos, la relación beneficio-costos fue superada por el HMA. Utilizando *G. intraradices* fue posible reducir la dosis de fertilización química en maíz. La mejor respuesta en función a la biomasa foliar y al rendimiento de grano se obtuvo aplicando el 50% del fertilizante químico recomendado (50-30-00 + 20S) y el HMA.

La micorrización del maíz no fue influenciada por el método de labranza implementado en temporal. Los rendimientos obtenidos con *G. intraradices* fueron semejantes a los del testigo fertilizado (60-20-00). No se observó un efecto protector de *G. intraradices* contra la pudrición carbonosa ocasionada por *M. phaseolina*.

Bibliografía Citada

- Aguado-Santacruz, G.A. 2011. Biofertilización de maíz: práctica redituable, factible y necesaria para la agricultura de nuestro país. *Rev. Claridades Agrop.* 214:42-47.
- Aguado-Santacruz, G.A., Moreno-Gómez, B., Amado-Álvarez, J., Ramírez-Valle, O., Hernández-Muela, V.M. y Galván-Lamas, R. 2010. Desarrollo del biofertilizante bacteriano INI2709 y análisis de su impacto inicial en la agricultura del estado de Guanajuato. *In: XXII Semana Internacional de Agronomía.* Martínez, R.J.J., Berúmen, P.S., Martínez, T.J., Martínez, R.A. y Vázquez, N.M. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Venecia, Durango.
- Aguado-Santacruz, G.A. Moreno-Gómez, B., Velázquez-Ordinola, A. y Gámez-Vázquez, F.P. 2009. Biofertilizante bacteriano INI2709. Desplegable para productores No. 11. Campo Experimental Bajío-INIFAP. Celaya, Gto.
- Aguirre, M.J.F. 2006. Biofertilizantes Microbianos: Experiencias Agronómicas del Programa Nacional del INIFAP en México. Campo Experimental Rosario Izapa, INIFAP. Libro Técnico No. 2. México.
- Almeida, A.M., Amorim, L., Filho, A.B., Torres, E., Farias, J.R., Benato, L.C., Pinto, M.C. y Valentín, N. 2003. Progress of soybean charcola rot under tillage and no-tillage system in Brazil. *Fitopat. Brasileira* 28:131-135.
- Alvarado, C.M. y Díaz, F.A. 2003. Efectividad de la biofertilización en la productividad de elote y okra. *Biotam* 14:19-28.
- Arihara, J. and Karasawa, T. 1999. Effect of previous crops on arbuscular mycorrhizal foemation and growth of succeeding maize. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46:43-51.
- Arsac, J.F., Lamothe, C., Mulard, D. and Fages, J. 1990 Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum* inoculations. *Agronomie* 10:640-654.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotech. Adv.* 16:729-770.
- Bashan, Y. 2008. El uso de inoculantes microbianos como una importante contribución al futuro de la agricultura mexicana. *In: La Biofertilización como Tecnología Sostenible.* Díaz, F.A. y Mayek, P.N. (eds). Plaza y Valdés/CONACYT. México.

- Bayer, C., Martín-Nieto, L., Mielniczuk, J., Pillon, C.N. and Sangoid, L. 2001. Changes in soil organic matter fractions under subtropical no-tillage cropping systems. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 65:1473-1478.
- Boucher, A., Dalpe, Y. and Charest, C. 1999. Effect of arbuscular mycorrhizal colonization of four species of *Glomus* on physiological responses of maize. *J. Plant Nut.* 22:783-797.
- Claflin, L.E. and Giorda, L.M. 2002. Stalk rots of sorghum. *In: Sorghum and Millets Diseases.* Leslie, J.F. (ed.). Iowa State Press. USA.
- Díaz, F.A., Alvarado, C.M., Cantú, A.M. y Garza, C.I. 2005. Fertilización biológica y producción de maíz en la región semiárida del norte de Tamaulipas, México. *Agr. Téc. Méx.* 31:153-163.
- Díaz, F.A. y Garza, C.I. 2007. Crecimiento de genotipos de sorgo y cártamo asociados a la colonización micorrízica arbuscular en suelo con baja fertilidad. *Univ. Cien.* 23:15-20.
- Díaz, F.A., Garza, C.I., Pecina, Q.V. y Magallanes, E.A. 2008b. Micorrización del sorgo (*Sorghum bicolor*): impacto en la productividad en Tamaulipas. *In: La Biofertilización como Tecnología Sostenible.* Díaz, F.A. y Mayek, P.N. (eds). Plaza y Valdés/CONACYT. México.
- Díaz, F.A., Pecina, Q.V., Montes, G.N., Jacques, H.C. y Garza, C.I. 2011. Impacto de inoculantes microbianos en sorgo cultivado bajo déficit de humedad en el suelo. *In: Retos de la Investigación del Agua en México.* Oswald, U. (ed.). CRIM-UNAM, CONACYT. México. (En prensa).
- Díaz, F.A., Peña, R.M. y Montes, N.G. 2008a. Respuesta de sorgo para grano a inoculantes micorrízicos comerciales. *In: III Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal.* INIFAP. Mérida, Yucatán.
- Díaz, F.A., Salinas, G.J., Garza, C.I. y Mayek, P.N. 2008c. Impacto de labranza e inoculación micorrízica arbuscular sobre la pudrición carbonosa y rendimiento de maíz en condiciones semiáridas. *Rev. Fitotec. Mex.* 31:257-263.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y. and Vanderleyden, J. 2002. Effects of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biol. Fert. Soils* 36:284-297.
- Doubrava, N. and Blake, J.H. 2004. Sweet Corn Diseases. Clemson Extension. Clemson University. Publ. HGIC-2204.

- Durán, P.A., Aguirre, M.J., González, C.G., Peña del R.M. y Schonhoven, E.V. 2001. Producción *in vivo* de micorriza arbuscular *Glomus intraradices* con *Brachiaria bryzantha* como hospedero en camas reproductoras. Campo Experimental Cotaxtla, INIFAP. Folleto Técnico No. 29. México.
- Ferrera, C.R. y Alarcón, A. 2008. Biotecnología de los hongos micorrízicos arbusculares. *In: La Biofertilización como Tecnología Sostenible*. Díaz, F.A. y Mayek, P.N. (eds). Plaza y Valdés/CONACYT. México.
- García, O.J., Moreno, M.V., Rodríguez, L.I., Mendoza, H.A. y Mayek, P.N. 2008. Efecto de la biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo y maíz en la región semiárida de Tamaulipas, México. *In: La Biofertilización como Tecnología Sostenible*. Díaz, F.A. y Mayek, P.N. (eds). Plaza y Valdés/CONACYT. México.
- Girón, C.R. 1993. Maíz. *In: Enfermedades Infecciosas de los Cultivos*. Díaz, F.A. (ed.). Trillas, México.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguín, G. and Penrose, D.M. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial Collage Press. London, England.
- Hernández, M.L., Trejo, A.D., Quinto, T.Y. y Escalona, A.M. 2000. Interacción entre *Azospirillum brasilense* y hongos micorrízicos en el rendimiento de maíz en condiciones de campo. *In: Memorias de la Reunión Iberoamericana y III Simposio Nacional sobre Simbiosis Micorrízica*. Comité Nacional de la Investigación y Enseñanza de la Micorriza. Guanajuato, México.
- Holguín, G., Bashan, Y., Puente, E., Carrillo, A., Bethlenfalvay, G., Rojas, A., Vázquez, P., Toledo, G., Bacilio, M., Glick, B., González, L., Lebsky, V., Moreno, M. y Hernández, J. 2003. Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizósfera. *Agr. Téc. Méx.* 29:201-211.
- Irizar, G.M., Vargas, P., Garza, D., Tut, C., Rojas, M., Trujillo, A., García, R., Aguirre, D., Martínez, J., Alvarado, S., Grageda, O., Valero, J. y Aguirre, J. 2003. Respuesta de cultivos agrícolas a los biofertilizantes en la región central de México. *Agr. Téc. Méx.* 29:213-225.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K. and Baera, J.M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fert. Soils* 37:1-16.
- Johnson, C.N. and Pflieger, F.L.. 1992. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae and Cultural Stresses. *In: Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. Bethlenfalvay, G.L. and Linderman, R.G. (eds). American Society Agronomy. Special Publ. No. 54.

- Khalil, S., Loynochan, T. and Tabatabai, M. 1994. Mycorrhizal dependency and nutrient-uptake by improved and unimproved corn and soybean cultivars. *Agron. J.* 86:949-958.
- Kothari, S.K., Marschner, H. and Romheld, V. 1990. Direct and indirect effects of VA mycorrhizal fungi and rizosphere microorganisms on acquisition of mineral nutrients by maize (*Zea mays* L.) in calcareous soil. *New Phytol.* 116:637-645.
- Loredo, O.C., Beltrán, L.S. y Peña del Río, M. 2007a. Uso de biofertilizantes para la producción de maíz forrajero en condiciones de temporal. Campo Experimental San Luis, INIFAP. Folleto Científico No. 2.
- Loredo, O.C., López, R.L. y Espinosa, V.D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. *Terra Latinoamer.* 22:225-239.
- Mendoza, H.A., Cruz, H.A. y Jacques, H.C. 2008. Aislamiento, selección y evaluación de un inoculante basado en cepas nativas de *Azospirillum* en el norte de Tamaulipas. *In: La Biofertilización como Tecnología Sostenible.* Díaz, F.A. y Mayek, P.N. (eds). Plaza y Valdés/CONACYT. México.
- Montaño, A.N., Quiroz, G.F. y Cruz, G. 2001. Colonización micorrízica arbuscular y fertilización mineral de genotipos de maíz y trigo cultivados en un andisol. *Terra Latinoamer.* 19:337-344.
- Okon, Y. and Labandera, G.C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26:1591-1601.
- Olalde, P.V. y Serratos, R. 2008. Biofertilizantes: Micorrizas y bacterias promotoras de crecimiento. *In: La Biofertilización como Tecnología Sostenible.* Díaz, F.A. y Mayek, P.N. (eds). Plaza y Valdés/CONACYT. México.
- Pecina, Q.V., Díaz, F.A. y Garza, C.I. 2008. Respuesta del maíz y sorgo a la fertilización biológica. *In: La Biofertilización como Tecnología Sostenible.* Díaz, F.A. y Mayek, P.N. (eds). Plaza y Valdés/CONACYT. México.
- Peña del Río, A., Díaz, F.A. y Montes, G.N. 2007. Aislamiento e identificación de hongos micorrízicos arbusculares de la región semiárida de Tamaulipas, México. Libro II Foro Internacional Biológico Agropecuario. Universidad Veracruzana, Tuxpan, Ver.

- Robles, C. y Baera, M.J. 2004. Respuesta de la planta y del suelo a inoculación con *Glomus intraradices* y rizobacterias en maíz en cultivo intensivo. *Terra Latinoamer.* 22:59-69.
- Roldán, A., Salinas, J.R., Alguacil, M.M. and Caravaca, F. 2006. Soil sustainability indicators following conservation tillage practices under subtropical maize and bean crops. *Soil Till. Res.* 93:273-282.
- Roldán, A., Salinas, J.R., Alguacil, M.M., Díaz, E. and Caravaca, F. 2005. Soil enzyme activities suggest advantages of conservation tillage practices in sorghum cultivation under subtropical conditions. *Geoderma* 129:178-185.
- SAGARPA. 2009. Producción regional de maíz. www.agricultura/publicaciones/sistema_producto/lists/maíz.
- SAGARPA. 2010. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.siap.gob.mx/index.
- Salinas, G.J. 2004. Labranza de conservación en sorgo de riego y temporal en el norte de Tamaulipas. *Campo Experimental Río Bravo, INIFAP. Publ. Esp. No. 28.*
- Salinas, G.J. 2006. Fertilización química y biológica con micorriza en maíz, sorgo y frijol en riego y temporal. *Campo Experimental Río Bravo, INIFAP. Publ. Esp. No. 30.*
- Sturz, A.V., Carter, M.R. and Johnson, H.W. 1997. A review of plant disease, pathogen interactions and microbial antagonism under conservation tillage in humid agriculture. *Soil Till. Res.* 41:169-189.
- Vázquez, M.M., César, S., Azcón, R. and Barea, J.M. 2000. Interactions between mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial populations and enzyme activities in the rizosphere of maize plants. *Appl. Soil Ecol.* 15:261-272.

Capítulo 11

Micorriza INIFAP y el Incremento de la Productividad de Avena y Maíz en el Estado de Chihuahua

Jesús Pilar Amado Álvarez*, Mario René Ávila Marioni y
Orlando Ramírez Valle.

C.E. Sierra de Chihuahua-INIFAP, Calle Hidalgo # 1213, Zona Centro
Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua C.P. 31500

Autor de correspondencia

email: amado.jesus@inifap.gob.mx; jesusaa@colpos.mx

Tel: (625) 5822258

La materia orgánica es descompuesta por la actividad de diferentes especies de bacterias y hongos que liberan los nutrientes del suelo, dejándolos disponibles para que sean absorbidos por las plantas. La absorción puede ser directa a través de las raíces o indirecta a través de las hifas de algunos hongos que forman simbiosis con las raíces de las plantas (Martínez y Pugnaire, 2009).

Las plantas modifican el suelo en el que se instalan por el crecimiento radical y la absorción de nutrimentos, pero también a través de los exudados de la raíz que son una fuente primaria de energía para las redes tróficas edáficas. Por su parte, los organismos del suelo ejercen efectos que pueden ser específicos para cada especie vegetal, además de participar en la descomposición de la materia orgánica y el reciclaje de nutrientes (Batten *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2009; De la Peña, 2009).

La microbiota del suelo juega un papel fundamental en la regulación de los ecosistemas terrestres, influyendo en la productividad, diversidad y estructura de las comunidades vegetales (Van der Heijden *et al.*, 1998). Entre los organismos que habitan en el suelo cabe destacar por su función ecológica las endomicorrizas u hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Una micorriza es la simbiosis que se establece entre un HMA y las raíces de una planta. Los HMA se encuentran ampliamente extendidos por toda la superficie terrestre y establecen simbiosis con al menos el 80% de las plantas vasculares (Trappe, 1987). Aguilera *et al.* (2008) mencionan que el uso de las endomicorrizas ha

aumentado en la última década debido a numerosos reportes de efectos benéficos sobre las plantas que van desde incrementos en la absorción de nutrimentos en el suelo, una influencia positiva sobre las relaciones hídricas y la protección contra agentes patógenos, hasta un importante papel ecológico en la sucesión de especies de las comunidades vegetales naturales.

Moncayo (2009) comenta que los HMA le proporcionan a la planta algunos nutrientes provenientes del suelo, y ésta, a su vez, le suministra al hongo los carbohidratos necesarios para su supervivencia. Las micorrizas tienen como principal función extender la exploración de las raíces en el suelo, lo cual hace más eficiente la absorción de agua y nutrientes, proceso especialmente importante en ambientes desfavorables. Se ha descubierto y probado que la superficie de absorción de las raíces colonizadas con micorrizas se incrementa hasta en 1000 veces (Aguirre *et al.*, 2009).

Las plantas cuyas raíces han sido colonizadas por HMA presentan una mayor tolerancia frente a la sequía, altas temperaturas, metales pesados y otros compuestos tóxicos, salinidad y acidez del suelo. Aguirre *et al.* (2009) afirma que la micorriza permite a la planta incrementar la exploración de la raíz con un aumento en la absorción y transporte de nutrientes como P, N, Co, Zn y agua del suelo, proporcionándole mayores ventajas para su desarrollo y productividad. Pruebas de validación realizadas por el INIFAP han mostrado las bondades del uso de micorriza en la agricultura con incrementos de rendimiento en maíz (11.5%), sorgo (10.8%), cebada (20.7%) y frijol (22.1%).

Huerta *et al.* (2008) reportan que dentro de los biofertilizantes se agrupan aquellos productos que tienen como base microorganismos que viven normalmente en el suelo en poblaciones bajas y que al aumentar sus poblaciones por medio de la inoculación artificial son capaces de poner a disposición de las plantas una parte importante de elementos nutritivos mediante su actividad biológica.

Aguirre *et al.* (2010) reportaron que los microorganismos benéficos para la agricultura son muchos y que la mayoría desarrollan sus funciones bajo la

influencia de las raíces de las plantas. Dependiendo del tipo de relación con la planta los microorganismos pueden ser benéficos o nocivos; en el caso de los microorganismos benéficos utilizados como biofertilizante la relación es mutualista y es conocida como simbiosis. Los biofertilizantes son recomendados en la agenda 21, como resultado de la llamada Cumbre de la Tierra, firmada en Río de Janeiro en 1992.

Los biofertilizantes de acción directa, como los HMA, habitan parcialmente o de forma total en los tejidos vegetales y por ello su acción se realiza en el vegetal y no en el medio circundante. Parker *et al.* (2006) indican que los biofertilizantes elaborados con HMA son productos benéficos que se asocian a las raíces de las plantas y favorecen su nutrición. Esta asociación se presenta de forma natural en prácticamente en todos suelos agrícolas y es benéfica tanto para la planta como para los HMA debido al intercambio de sustancias nutritivas que se presenta entre estos organismos.

Aunque los estudios sobre los beneficios de los microorganismos del suelo asociados al buen desempeño de los diferentes vegetales, se remonta a los años del siglo XVIII, en Europa, en nuestra región de la ‘Sierra de Chihuahua’ los primeros estudios se iniciaron en el año 2000, por lo que el objetivo del presente capítulo es mostrar los avances obtenidos a nivel regional con la aplicación de biofertilizantes, básicamente en avena y maíz, bajo condiciones de temporal y riego. Los resultados publicados demuestran la importancia de seguir impulsando el uso de estos productos biológicos.

Fertilizantes biológicos y químicos en avena de secano-Ciclo 2000

El presente estudio se inició durante el ciclo Primavera-Verano de 2000, en dos localidades ubicadas dentro del área de influencia del Campo Experimental del INIFAP Sierra de Chihuahua (Amado y Ortíz, 2003) para evaluar los efectos de la inoculación con *Azospirillum* y micorriza bajo dos dosis distintas de fertilización química y la aplicación de la hormona esteroideal CIDEF-4 sobre el rendimiento de avena. El nitrógeno fue aplicado en forma de urea y el potasio en forma de superfosfato triple de calcio y, en total, el experimento constó de siete tratamientos establecidos en las dos localidades de estudio (Cuadro 1).

Considerando los dos sitios de evaluación, el uso del *Azospirillum* en el cultivo de avena de temporal incrementó significativamente la producción de materia seca total en un 18 y 22% con relación a las plantas sin fertilizar, con y sin la aplicación de la fitohormona, respectivamente. Con relación a rendimiento de grano, las diferencias entre las parcelas biofertilizadas y no biofertilizadas fueron de 40 y 33% con y sin la aplicación del esteroide, respectivamente.

También se produjo más grano usando *Azospirillum* que a través del empleo de la dosis 60-40-00 de N-P₂O₅-K₂O, con y sin el uso de fitohormonas (1,034.9 vs 1,032.0; 826.3 vs 824.0; Cuadro 1). Lo anterior demuestra la utilidad de los microorganismos fijadores de nitrógeno como un medio para reducir las dosis de fertilización química y su compatibilidad con los fines de la agricultura sostenible (Linderman, 1992). Alternativamente, la adición de nutrimentos a los sistemas agrícolas mediante la aplicación de abonos orgánicos puede mejorar la fertilidad del suelo. La fracción de N orgánico mineralizable contenido en residuos orgánicos, tales como estiércoles y residuos de cosecha, varía de 30 a 90%. No obstante que existen grandes cantidades de N orgánico en el suelo, solamente una pequeña fracción se encuentra disponible para los microorganismos, misma que se conoce como N orgánico potencialmente mineralizable, el cual constituye menos del 10% del N orgánico total del suelo. El aporte por mineralización no se toma en cuenta en el diagnóstico de deficiencia de nitrógeno y su estimación permitiría ajustar las recomendaciones de fertilización (Salazar *et al.*, 2007). Por otro lado, la aplicación de diferentes tipos de abonos orgánicos genera cambios específicos en las propiedades del suelo ya que tienen características propias que deben tenerse en cuenta dentro de las estrategias para un manejo integral de la materia orgánica del suelo (Giulietti *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Rendimiento de grano (kg ha⁻¹) en avena de temporal tratada con biofertilizantes, la fitohormona esterooidal CIDEF-4 y fertilizantes inorgánicos (Amado y Ortiz, 2003).

Santo Tomás, Guerrero, Chih. Campo 26, Cuauhtémoc, Chih.

Tratamientos	Santo Tomás, Guerrero, Chih.		Campo 26, Cuauhtémoc, Chih.	
	Con CIDEF-4	Sin CIDEF-4	Con CIDEF-4	Sin CIDEF-4
	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio
<i>Azospirillum</i> + Micorriza + 40-26-00	935.0	776.3	806.5	1,165.8
60-40-00	1,032.0	824.0	826.5	1,252.5
0-0-0	652.8	576.8	655.0	1,013.0
<i>Azospirillum</i> + Micorriza + 20-13-00	754.0	837.0	697.0	1,005.3
<i>Azospirillum</i> + Micorriza	753.0	554.3	619.3	1,000.3
<i>Azospirillum</i>	1,034.9	826.3	798.8	1,283.0
Micorriza	850.0	592.3	812.8	1,113.8
Media	859.8 a	711.1 b	745.1 b	1,119.1 a

Santo Tomás, DMS α 0.05 = fitohormonas = 145.01 **, Tukey (0.05) = fertilizantes =249.1**.

Campo 26, DMS α 0.05 = fitohormonas = 232.83 **, Tukey (0.05) = fertilizantes =211.52**.

El uso de fertilizantes inorgánicos en la agricultura actual resulta imprescindible para producir en cantidades suficientes los alimentos requeridos por la población, pero el abuso en la utilización de estos insumos, particularmente los nitrogenados, afecta la calidad ambiental y la economía del productor. En este contexto la sociedad está asumiendo un papel más responsable en la agricultura, lo que significa que en lo sucesivo no solo se generarán los alimentos y materias primas necesarias para una población en constante crecimiento, sino que esta actividad se desarrollará con el deterioro mínimo a los recursos agua y suelo.

Biofertilización con Micorriza INIFAP en avena de temporal-Ciclo 2009.

Los resultados obtenidos con el uso de esta tecnología indican incrementos netos promedio en la producción de grano y forraje de 55% en comparación con el testigo del productor (Cuadro 2). De acuerdo con los resultados, tanto de investigación como de las parcelas demostrativas, indican que la aplicación del biofertilizante micorrízico aumentó la producción y productividad del cultivo de avena bajo condiciones de temporal en el Estado de Chihuahua. Lo anterior establece las bases técnicas para disminuir en un futuro la dependencia del uso de fertilización química en éste y otros cultivos, con beneficios económicos y ecológicos para el productor y la sociedad en general.

La Micorriza INIFAP es un inoculante producido por el INIFAP que contiene al hongo micorrízico *Glomus intraradices* en una base de suelo estéril. Amado *et al.* (2010a) refieren las actividades de transferencia de tecnología relacionadas con el empleo de la Micorriza INIFAP que fueron financiadas por SAGARPA, Fundación Produce Chihuahua y la AGI-Granos Básicos y coordinadas por personal técnico del INIFAP que asesoró a los productores en la siembra de las parcelas demostrativas en las diferentes regiones agroecológicas del Estado de Chihuahua.

Cuadro 2. Incremento de la producción de forraje de avena en diferentes municipios del Estado de Chihuahua. Ciclo Primavera-Verano (Fernández *et al.*, 2009).

Municipios	Producción de Forraje		Incremento (%)
	Sin Micorriza INIFAP	Con Micorriza INIFAP	
	kg ha ⁻¹		
Gómez Farías	4,306	7,048	63.7
Guerrero	2,310	4,010	73.6
Namiquipa	2,335	3,342	43.1
Riva Palacio	3,210	4,500	40.2

Biofertilización con Micorriza INIFAP en avena de temporal. Parcelas piloto-Ciclo 2009.

Los resultados obtenidos en cinco parcelas piloto mostraron indicadores de rendimiento (grano-forraje), ingreso e índice de rentabilidad a favor de utilizar el biofertilizante Micorriza INIFAP. En la figura 1 se puede apreciar que los mayores beneficios en términos del rendimiento de materia seca total (RMST) de avena se lograron combinando el biofertilizante micorrízico con la dosis de fertilización química 60-40-00.

Asimismo, es posible observar como la disponibilidad de agua de lluvia también ejerció un efecto determinante sobre los resultados de la interacción micorriza-fertilizante químico. A excepción de la localidad de Bachiniva donde se obtuvieron los mayores rendimientos de avena (5,720 kg ha⁻¹) con 269 mm de precipitación, los rendimientos aumentaron gradualmente en función de esta variable climática. General Trías (4,263 kg ha⁻¹, 160 mm de lluvia), Santa Clara Namiquipa (4,795 kg ha⁻¹, 179 mm de lluvia), Campo 35 (4,895 kg ha⁻¹, 229 mm de lluvia), Satevo (6,107 kg ha⁻¹, 242 mm de lluvia; Fig. 1).

Sitio 1. El Faro Satevo

Los resultados obtenidos en este sitio (Cuadro 3), indican que en general las mayores producciones se lograron mediante el uso de fertilizantes químicos, solos o combinados con los biofertilizantes.

Dentro de las parcelas no tratadas con fertilizante químico destacó el tratamiento con micorriza en el cual se obtuvo el mayor rendimiento (4,830 kg ha⁻¹). Asimismo, las plantas de avena tratadas con el inoculante Micorriza INIFAP, superaron a la bacteria *Azospirillum* y a la mezcla de ambos con índices de rentabilidad de 2.61, 1.59 y 1.50, respectivamente (Amado *et al.*, 2010b).

Por otro lado, dentro de las parcelas fertilizadas se pudo observar que las mayores producciones se obtuvieron mediante la inoculación con *Azospirillum* resultó en los mayores rendimientos (6,350 kg ha⁻¹). Dentro de los valores más altos obtenidos en estas parcelas fertilizadas se encontraron los obtenidos mediante el uso de fertilización química e inoculación con micorriza INIFAP (6,107 kg ha⁻¹), fertilización química e inoculación con *Azospirillum* (6,350 kg ha⁻¹) y finalmente mediante la doble inoculación con *Azospirillum* y micorriza (6,072 kg ha⁻¹) con índices de rentabilidad de 2.06, 2.01 y 1.85, respectivamente.

Igualmente en Satevo, Chihuahua, algunos de los componentes de rendimiento cuantificados indicaron mayores beneficios de la combinación del biofertilizante Micorriza INIFAP con fertilizantes químicos en comparación con las plantas de avena no fertilizadas químicamente (47 tallos por planta vs. 22 tallos por planta y 20 hojas por planta vs. 10 hojas por planta; resultados no mostrados).

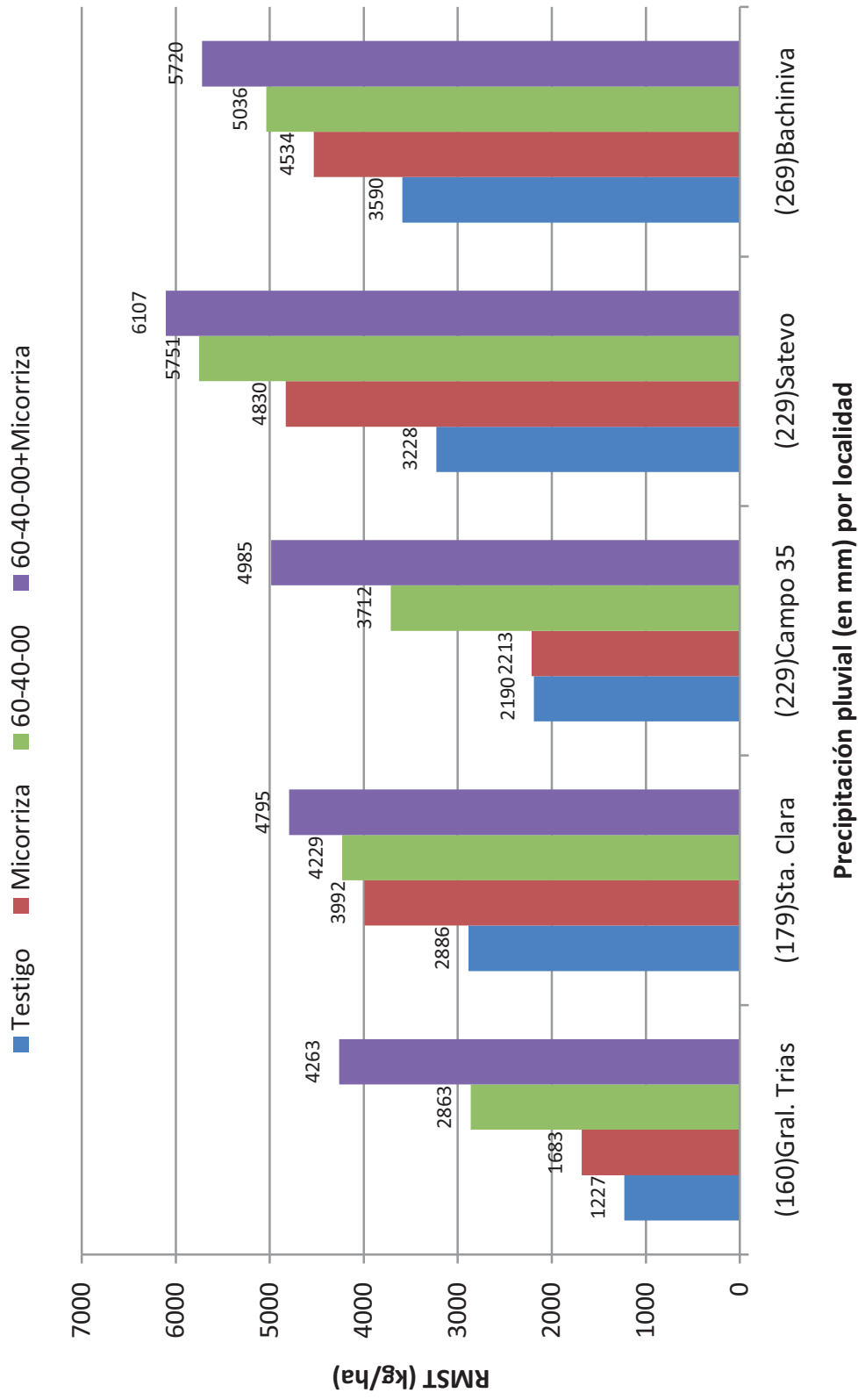


Figura 1. Rendimiento de materia seca total (kg ha^{-1}) de avena con relación a la cantidad de lluvia registrada por localidad-Ciclo 2009. CESICH-INIFAP (Amado et al., 2010b).

Cuadro 3. Rendimiento de materia seca total (kg ha⁻¹) en las cinco localidades estudiadas-Ciclo 2009. CESICH-INIFAP (Amado *et al.*, 2010b).

Tratamientos	Satevo	CESICH	Campo 35	Santa Clara	Gral. Trias
0-0-0	3,228 d	3,590 g	2,190 d	2,686 d	1,227 g
Micorriza INIFAP (M)	4,830 bc	4,534 e	2,213 d	3,992 b	1,683 f
<i>Azospirillum</i> (A)	3,240 d	4,379 f	2,818 cd	3,404 c	1,894 e
M + A	3,260 d	4,719 d	2,968 cd	3,922 b	1,692 f
60-40-00	5,751 ab	5,036 c	3,712 bc	4,229 b	2,863 c
60-40-00 + M	6,107 a	5,720 a	4,985 a	4,795 a	4,263 b
60-40-00 + A	6,350 a	5,288 b	5,531 a	4,026 b	4,503 a
60-40-00 + M + A	6,072 ab	5,294 b	4,095 b	3,364 c	2,197 d

F_{0.05} =6.3408 ** P> F =0.00001, DMS_{0.05} = 1485.2 C. V = 14.61 % (Satevo)
 F_{0.05} =2.9787 ** P> F =0.016, DMS_{0.05} = 82.063 C. V = 12.92 % (CESICH)
 F_{0.05} =12.79 ** P> F =0.00001, DMS_{0.05} = 917.64 C. V = 11.28 % (Campo 35)
 F_{0.05} =16.45 ** P> F =0.016, DMS_{0.05} = 461.3798 C. V = 8.32 % (Santa Clara)
 F_{0.05} =486.05 ** P> F =0.00001, DMS_{0.05} = 142.79 C. V = 4.55 % (General Trias)

Ortíz *et al.* (2000) consignan que dentro de la interacción de la fertilización química con distintos genotipos de plantas se manifiestan diferentes respuestas influenciadas por la humedad disponible. En condiciones de buena disponibilidad de agua (precipitación= 429-468 mm) el tratamiento 60-40-00 (N-P₂O₅-K₂O) resultó en una producción de 7,673 kg ha⁻¹, mientras que en condiciones de humedad limitada (precipitación= 179 mm) el mejor rendimiento (5,875 kg ha⁻¹) se obtuvo a través de la fórmula de fertilización química 30-40-00 (N-P₂O₅-K₂O).

Sitio 2. CESICH, Bachiniva

Como se muestra en el Cuadro 3, la mayor producción de materia seca total (5,720 kg ha⁻¹) correspondió al tratamiento de fertilización química más

Micorriza INIFAP, el cual resultó ser estadísticamente superior al resto de los tratamientos evaluados y con un índice de rentabilidad de 1.80. Es por esto que la vinculación entre la industria y los expertos de la simbiosis micorrízicos tiene particular relevancia con el propósito de coadyuvar en el mejoramiento de sistemas de producción de inoculantes, así como en el control de la calidad de los mismos.

El factor principal que influenció la producción de avena fue la precipitación pluvial (268.7 mm, equivalente al 84% de los requerimientos hídricos). Dentro de las consideraciones sobre la distribución del agua de lluvia que aconteció durante el periodo del estudio pudimos apreciar que sobresalió una lluvia más fuerte (43 mm) el 22 de Agosto, fecha cercana a la etapa fenológica de formación de hijuelos (también conocida como etapa de amacollamiento), posteriormente entre los 40 y 50 días de establecido el cultivo de avena (plena floración y llenado de fruto) se presentaron dos eventos con cantidades superiores a los 20 mm, lo cual favoreció significativamente la producción de avena.

Los beneficios referidos en la literatura sobre la simbiosis micorrízica arbuscular hacen especial énfasis en la promoción del crecimiento y el mejoramiento del estatus nutricional de las plantas (Jeffries *et al.*, 2003; Heinzeman y Weritz, 1990; Dodd *et al.*, 1990).

Sitio 3. Campo 35, Cuauhtémoc

Este sitio se caracterizó por tener una de las mayores proporciones de limo (38.7%), lo cual facilitó el crecimiento radical; se registraron valores de hasta 24.5 cm de longitud de raíz en las plantas sin fertilizante químico y tratadas con la Micorriza INIFAP, mientras que en las plantas de avena tratadas con Micorriza INIFAP y fertilizante químico la longitud promedio de las raíces se consignó en 11.4 cm en la etapa fenológica de floración (29 de septiembre del 2009).

Los resultados anteriores confirman que la mejor respuesta de las plantas a los HMA se presenta en suelos con limitaciones nutrimentales, en tanto que

el mayor aprovechamiento y captación de elementos por estos hongos depende de factores inherentes a la planta y del suelo. En la simbiosis se forma una extensa red de hifas capaces de explorar mayor volumen de suelo y sitios donde la raíz es incapaz de llegar (Klironomos, 2002). Colin *et al.* (2007) mencionan que en la región Lagunera el uso de cebada para producción de forraje es poco usual, a pesar de las bondades que presenta, además de que no existen variedades diseñadas para la producción de forraje desconociéndose su valor nutritivo al momento de la cosecha. Al respecto, se ha reportado que la etapa masoso suave del grano maximiza la producción y calidad de cebada y avena; en esta etapa en cebada se obtienen rendimientos de 4.9 t ha⁻¹ de materia seca, 8.1% de proteína cruda y 48.1 y 32.8% de fibras detergente neutro y ácido, respectivamente.

Sitio 4. Santa Clara Namiquipa

Los HMA inducen una mayor tolerancia de las plantas a condiciones adversas de producción. La inoculación de *Glomus intraradices* en semilla de avena representó una práctica eficiente en este sitio. El mayor rendimiento se consignó en las franjas tratadas con fertilizantes químicos más el inoculante Micorriza INIFAP (4,795 kg ha⁻¹), las cuales además fueron diferentes estadísticamente del resto de los tratamientos (Cuadro 3).

También se registraron los mayores índices de rentabilidad, 2.68 y 1.84, para las condiciones naturales del terreno y con fertilizantes químicos, respectivamente (Cuadro 4). Esta diferencia se atribuye principalmente a la constitución del suelo, ya que en este sitio se presentan las mejores características edáficas entre las cinco localidades estudiadas, con concentraciones altas de limo (58.7%), 20.2% de arcilla y 21.0% de arena, porcentaje de saturación de 53.5%, alto cantidad de materia orgánica (2.55%), con excesos de P (44.36 ppm), suficiencia en nitratos (195.9 kg ha⁻¹) y ausencia de sales y carbonatos.

Alarcón y Ferrera-Cerrato (2001), Tarafdar y Rao (2002) y Young *et al.* (2003) señalan que uno de los nutrimentos que más se ha estudiado con

relación a su absorción por las micorrizas arbusculares es el P, debido a que las plantas lo requieren en cantidades relativamente grandes, pero que se encuentra en concentraciones muy bajas en la solución del suelo. La razón principal para este fenómeno, es que los iones de fosfato inorgánico se unen rápidamente a coloides del suelo o se fijan como sales de Fe o Al volviéndose relativamente inmóviles; además una gran proporción del P inorgánico total está normalmente no disponible para las plantas.

Sitio 5. General Trías

Los rendimientos consignados en esta localidad con el uso del Micorriza INIFAP fueron de 1,683 y 4,263 kg ha⁻¹, para las franjas sin fertilización química y con la adición de fertilizantes a base de urea y fosfato diamónico, respectivamente, los cuales mostraron ser estadísticamente diferentes entre sí (Cuadro 3).

El índice de rentabilidad del empleo de Micorriza INIFAP fue igual al calculado para el tratamiento con *Azospirillum* (1.13), pero mayor que el registrado para las parcelas testigo 0-0-0 (0.91) y para la mezcla de ambos biofertilizantes (0.94). La combinación del fertilizante químico con la micorriza resultó en la mejor relación beneficio costo (1.63; Cuadro 4). En la localidad de General Trías la pobreza de los suelos en adición a la baja cantidad de lluvia que ocurrió durante el verano del 2009 (160 mm, equivalente al 50% de los requerimientos hídricos) afectaron significativamente la producción de avena. Este panorama es común ya que la región se caracteriza por ser de bajo potencial productivo y con alto riesgo de siniestro, con lo cual soportamos la conveniencia de impulsar el uso de la Micorriza INIFAP por todos los beneficios que ofrece. Al respecto, Rilling y Mummey (2006) reportan que los HMA son microorganismos rizosféricos cosmopolitas, ecológicamente adaptados y que pueden ser sujetos de manipulación para la producción de inoculante con el objetivo de mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas, particularmente en condiciones adversas para los cultivos.

Cuadro 4. Índice de rentabilidad para los distintos tratamientos evaluados en las cinco localidades de estudio-Ciclo 2009 (Amado *et al.*, 2010b).

Tratamientos	Satevo	CESICH	Campo 35	Santa Clara	Gral. Trías
0-0-0	1.88	1.87	1.47	1.97	0.91
Micorriza INIFAP (M)	2.61	2.20	1.36	2.68	1.13
<i>Azospirillum</i> (A)	1.59	1.95	1.56	2.03	1.13
M + A	1.50	1.99	1.53	2.17	0.94
60-40-00	2.03	1.66	1.42	1.71	1.16
60-40-00 + M	2.06	1.80	1.45	1.84	1.63
60-40-00 + A	2.01	1.58	1.89	1.44	1.61
60-40-00 + M+ A	1.85	1.52	1.34	1.15	0.75

Estudio de avena bajo condiciones de riego-Ciclo 2010.

El análisis estadístico sobre la variable materia seca total (grano y forraje) indica diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados. En el Cuadro 5 se puede apreciar que los beneficios más altos se obtuvieron al utilizar Micorriza INIFAP (8,864 kg ha⁻¹) seguido de las plantas tratadas con el biofertilizante Bacteriano 2709 INIFAP donde se produjeron 8,212 kg ha⁻¹. Estos datos nuevamente apuntan a impulsar la aplicación de biofertilizantes para minimizar la contaminación ambiental y fomentar la producción agrícola orgánica.

Respecto a la respuesta combinada del empleo de fertilizantes químicos y biológicos, se observó que las mejores respuestas en términos de rendimiento se registraron en los tratamientos en los cuales se redujo en 1.33 (48-35-38; 8,500 kg ha⁻¹) y 2.0 veces (32-23-25; 7,940 kg ha⁻¹) las dosis de fertilización química recomendada; estos tratamientos no observaron diferencias

significativas con las parcelas que contenían las dosis completas de fertilizantes químicos y sí con las que no fueron fertilizadas o que se les aplicó la dosis mínima (16-12-13; Cuadro 5).

Cuadro 5. Materia seca total (kg ha⁻¹) en avena variedad “Cuauhtémoc”. Cárdenas, Municipio de Meoqui, Chih. Ciclo Primavera-Verano 2010.

Tratamientos	0-0-0	16-12-13	32-23-25	48-35-38	64-46-50	μ DMS=754.5
N-P ₂ O ₅ -K ₂ O	5,520	6,520	6,760	8,140	9,420	7,272b
Micorriza INIFAP (M)	7,840	7,840	8,600	9,580	10,460	8,864a
Bacteriano 2709 (B)	7,220	7,600	8,700	9,260	8,280	8,212a
M + B	9,720	7,420	7,700	7,020	5,300	7,432b
DMS=843.6	7,575bc	7,345c	7,940abc	8,500a	8,365ab	

De acuerdo con Bever *et al.* (2002) numerosos estudios han descrito que la inoculación micorrízica produce beneficios en los cultivos tales como estimulación del enraizamiento y crecimiento de las plantas, mejoramiento de la supervivencia, resistencia de las plantas al ataque de patógenos que afectan la raíz, aumento de la tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico y aumento de la precocidad en la floración y fructificación, entre otros. Sobre el mismo tema, Sieverding (1991) y Xia *et al.* (2007) mencionan que al no tener nutrientes disponibles a su alcance, las raíces comienzan a crecer y explorar mayor volumen del suelo y que esta capacidad es incrementada significativamente a través de las hifas de los hongos.

El fraccionamiento de P en el suelo estudiado indicó altos valores de este elemento, lo cual minimiza la acción de los hongos micorrízicos ya que la colonización por estos hongos aumenta en suelos con bajos niveles de este nutriente.

Índice de rentabilidad

Se puede apreciar en el Cuadro 6 que en combinación con fertilizantes químicos la Micorriza INIFAP obtuvo los mejores índices de rentabilidad (IR de 1.72 a 1.73) que en el resto de los tratamientos. Contrariamente, cuando no se aplicó ningún fertilizante de origen químico la rentabilidad fue mayor en el tratamiento en el cual se combinaron el biofertilizante bacteriano del INIFAP 2709 con la micorriza INIFAP (IR = 2.29). Esto pone de manifiesto la importancia de las inoculaciones duales o múltiples de biofertilizantes para lograr efectos sinérgicos sobre el rendimiento de los cultivos.

Los beneficios de la materia orgánica en suelos agrícolas son físicos, químicos y biológicos, ya que mejoran la estructura, evitan la compactación y la erosión, aumentan la retención de humedad y mejoran la capacidad de intercambio catiónico como lo mencionan Castellanos *et al.* (1996). Fitzpatrick (1996) señala que la mayoría de los suelos contienen 1.6% de materia orgánica, o menos, pero que en suelos muy áridos el porcentaje baja a menos de uno. La aplicación de estiércol a suelos pobres en dosis de más de 100 mg ha⁻¹ origina que estos porcentajes de materia orgánica puedan alcanzar niveles de 5% o más (Salazar *et al.*, 2007).

Productividad de maíz azul bajo condiciones de temporal con biofertilizantes y cosecha de agua en Chihuahua-Ciclo 2010.

Dentro de los factores de estudio que afectaron significativamente el rendimiento de grano de maíz azul sobresale el tratamiento donde se aplicó Micorriza INIFAP, el pileteo para la cosecha de agua y la mitad de la dosis recomendada de los nutrimentos N, P y K (Micorriza INIFAP + pileteo + 35-20-00, rendimiento= 3.59 t ha⁻¹). Este tratamiento resultó con diferencias altamente significativas con relación a los tratamientos en los que empleó la fertilización completa (70-40-00, Cuadro 7); aunque se aplicó el doble de fertilizantes químicos no hubo respuesta, ya que tan sólo se obtuvieron 2.62 t ha⁻¹ en el tratamiento de Micorriza INIFAP + pileteo + 70-40-0). La precipitación pluvial acumulada durante el ciclo de cultivo fue de 275 mm, lo cual sitúa esta cantidad de agua por debajo de la media anual (= 561.3 mm; Medina *et al.*, 2006). Otras

variables climáticas en Gómez Farías Chih. fueron: temperatura media anual de 12.2°C, oscilación térmica de 18.2°C, precipitación máxima en 24 h = 65 mm y 69 días con lluvia.

Cuadro 6. Índice de rentabilidad de avena biofertilizada con micorriza y un consorcio bacteriano. Cárdenas, Municipio de Meoqui, Chih. 2010.

Tratamientos	0-0-0	6-12-13	32-23-15	48-35-38	64-46-50
N-P ₂ O ₅ -K ₂ O (FQ)	1.43	1.49	1.41	1.51	1.61
FQ + Micorriza INIFAP (M)	1.94	1.72	1.73	1.72	1.73
FQ + Bacteriano 2709 (B)	1.76	1.64	1.73	1.65	1.36
FQ + M + B	2.29	1.56	1.49	1.22	0.85

*Dosis de Micorriza INIFAP y Bacteriano 2709 = (2 kg ha⁻¹)

Se ha encontrado que plantas de maíz inoculadas con HMA aumentan sus contenidos de proteína soluble, N, P, K, Ca, Cu, Mg y Zn, así como su biomasa total y radical y rendimientos de grano y forraje (Loredo *et al.*, 2004). Otros trabajos que se refieren a la inoculación con la BPCV *Azospirillum brasilense* han mostrado un efecto benéfico en el rendimiento de diversos genotipos de maíz (Dobbelaere *et al.*, 2001). Además, también en maíz, se ha encontrado un sinergismo con la inoculación combinada entre *A. brasilense* y HMA que induce mayor crecimiento y asimilación de P, Fe y Mn (Robles y Baera, 2004), así como mayor producción de biomasa aérea y radical (Vázquez *et al.*, 2000).

El pileteo consiste en levantar montículos de tierra a intervalos regulares a través del surco para formar pequeños huecos y retener una mayor cantidad de agua de lluvia en el suelo por más tiempo. Esto aumenta la disponibilidad de agua para los cultivos y evita su pérdida total, además de contribuir al control de la degradación del suelo (Cruz, 1995).

Inzunza *et al.* (2006) encontraron que el híbrido de maíz H-419 a una densidad de 66,000 plantas ha⁻¹ y con la dosis 120-40-00 floreció a los 55 días después de la siembra (dds), llenó el grano a los 85 (dds), alcanzó su madurez fisiológica a los 115 (dds) y rindió un máximo de 8.1 t ha⁻¹, utilizando 79.4 cm de la lámina de agua total. De acuerdo con Yao *et al.* (2008) los HMA ejercen efectos positivos en los diferentes cultivos, atribuidos, en parte, a una mayor capacidad de exploración de volumen de suelo y, por tanto, de captación de nutrientes. Dodd *et al.* (1990) comentan que una alternativa de manejo para mejorar el estado nutrimental de los suelos es el uso de mecanismos biológicos que permitan restituir su fertilidad, sin perturbar y/o empeorar su condición, entre los que cita a las asociaciones simbióticas como los HMA especializados en la captación de P de la solución del suelo.

Análisis económico

La fertilidad del suelo es el segundo factor más importante para incrementar la productividad del maíz azul en condiciones de agricultura de secano. Después de analizar la relación de costos de producción, rendimiento y valor de cosecha (Cuadro 8), los resultados encontrados en suelos con una concentración nutrimental media (1.67% de MO) indican que la aplicación del biofertilizante Micorriza INIFAP, la omisión de fertilizantes químicos (0-0-0 de N-P₂O₅-K₂O) y la aplicación de niveles bajos de fertilizantes químicos (35-20-00 y 18-10-00) registraron los valores más altos de rentabilidad (2.83, 2.47 y 2.58). La incorporación de la práctica del pileteo al manejo tecnológico del cultivo en conjunto con la inoculación de la Micorriza INIFAP y la aplicación de niveles bajos de fertilizantes químicos también muestran indicadores económicos favorables con rentabilidades de 2.47 a 2.58 por cada peso invertido en la producción del maíz azul. Estas tendencias han sido reportadas también por Herrera *et al.* (2010) y Ramírez *et al.* (2010).

La extensión de las hifas extra radicales de la micorriza ocasionan un incremento del área de absorción y la exploración de un volumen mayor de suelo en comparación con el que normalmente podría alcanzar el crecimiento

de la raíz por sí sola (Bonfante, 2004). La simbiosis micorrízica está influenciada por la humedad del suelo y la aireación. Se presume que el crecimiento del micelio decrece a una baja concentración de oxígeno, debido a que todos los hongos micorrízicos son aerobios (Botella *et al.*, 2002).

Cuadro 7. Rendimiento de grano de maíz azul ($t\ ha^{-1}$) bajo condiciones de temporal, con pileteo (PL), Micorriza INIFAP (M) y fertilizantes químicos ($N-P_2O_5-K_2O$) en Gómez Farías, Chih-Ciclo 2010.

Tratamientos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Media
M + PL + 70-40-00	3	2.6	3.8	2.2	1.8	2	3.1	2.7	2.64 c
M + 70-40-00	2.1	2.8	2.7	3.2	2.5	2.6	3	2.6	2.68 bc
M + PL + 53-30-00	2.7	3.3	3.7	2.8	2.1	2.9	3.1	3	2.96 abc
M + 53-30-00	2.8	4.1	3.5	3.6	2.2	3.7	3.5	3	3.29 abc
M + PL + 35-20-00	3.3	4.2	4.4	4.6	2.2	2.2	3.7	4.2	3.59 a
M + 35-20-00	3.3	3.9	2.6	4.3	2.6	2.1	3.1	2.4	3.02 abc
M + PL + 18-10-00	3.8	3.7	2.9	4.4	3.2	3.7	3.3	2	3.39 ab
M + 18-10-00	2.6	3.4	2.8	3.5	2.4	3.6	2.8	2.2	2.90 abc
M + PL + 00-00-00	4.5	1.6	2.8	3.3	2.4	3.8	4.5	2	3.12 abc
M + 00-00-00	4.6	4.3	3.1	3.5	2.3	2.4	3.1	2.5	3.21 abc

F=1.36; Pr>F= 0.2209 **; $DMS_{\alpha=0.05} = 0.7317$; C.V. = 12.1 %.

La aplicación apropiada de abonos orgánicos en suelos agrícolas aumenta tanto la disposición y el reciclaje de nutrientes como la conservación del agua (López *et al.*, 2001). La descomposición de la materia orgánica depende de los microorganismos presentes en el suelo e involucra una serie de procesos complejos en los cuales los organismos utilizan los compuestos orgánicos, resultado de esta desintegración, como fuente de alimento (Lamm y Schlegel, 2000; Cabrera *et al.*, 2005).

Cuadro 8. Análisis económico de la productividad de maíz azul, bajo condiciones de humedad temporal, con pileteo (PL), fertilizantes biológicos (Micorriza INIFAP) y químicos en Gómez Farias, Chih-Ciclo 2010.

Tratamientos	Rendimiento grano (t ha ⁻¹)	Costo total \$	Valor de la producción (\$3,500 ha ⁻¹)	Utilidad neta \$	Índice de rentabilidad
M + 70-40-00 + PL	2.64	5,826.10	9,240.00	3,413.90	1.59
M + 70-40-00	2.68	5,561.80	9,380.00	3,818.20	1.69
M + 53-30-00 + PL	2.95	5,461.00	10,360.00	4,898.90	1.9
M + 53-30-00	3.29	5,196.80	11,515.00	6,318.20	2.22
M + 35-20-00 + PL	3.59	5,096.00	12,565.00	7,468.90	2.47
M + 35-20-00	3.01	4,698.80	10,535.00	5,836.20	2.24
M + 18-10-00 + PL	3.39	4,599.10	11,865.00	7,265.90	2.58
M + 18-10-00	2.9	4,334.80	10,150.00	5,815.20	2.34
M + 00-00-00 + PL	3.12	4,234.10	10,920.00	6,685.90	2.58
M + 00-00-00	3.21	3,969.80	11,235.00	7,265.20	2.83

Nota: No se incluyen costos de seguro, renta o uso de la tierra. No se incorpora el apoyo de PROCAMPO. El costo económico se refiere a los insumos y mano de obra. El cálculo para maquinaria y equipo integra ya una tasa de interés.

Conclusiones

En avena inoculada con la Micorriza INIFAP y durante el ciclo 2000, la producción de grano en Santo Tomás, Municipio de Guerrero, fue de 721.2 kg ha⁻¹ y de forraje 6,675 kg ha⁻¹, mientras que en el Campo 26, Municipalidad de Cuauhtémoc, Chihuahua, las producciones de grano y forraje fueron de 1,113.8 kg ha⁻¹ y 4,983 kg ha⁻¹, respectivamente; los índices de rentabilidad respectivos para cada una de estas localidades fueron de 3.77 y 2.83.

En las parcelas de demostración y transferencia de tecnología apoyadas por la SAGARPA, Fundación Produce Chihuahua, AGI-Granos básicos y el INIFAP, se logró aumentar la producción y productividad del cultivo de avena en 9,288 ha bajo condiciones de temporal utilizando el biofertilizante Micorriza INIFAP, resultando en incrementos neto promedio en la producción de grano y forraje de 55%, equivalentes a \$ 1,710.00 ha⁻¹ y una derrama económica de \$15,882,480.00.

Los resultados obtenidos en las cinco parcelas piloto estudiadas durante el ciclo 2009 mostraron indicadores de rendimiento (grano-forraje), ingreso e índices de rentabilidad a favor del biofertilizante Micorriza INIFAP. Los índices de rentabilidad registrados para los tratamientos omisión de fertilización química y aplicación de fertilización química fueron de manera respectiva: 2.61 y 2.06, en El Faro Municipio de Satevo; 1.13 y 1.63 en General Trías; 2.20 y 1.80 en Bachiniva; 1.36 y 1.45 en el Campo 35, Municipio de Cuauhtémoc; 2.68 y 1.84 en Santa Clara Namiquipa.

Con la variedad Cuauhtémoc, en la localidad de Cárdenas, Municipio de Meoqui, Chihuahua, bajo condiciones de riego y empleando la micorriza INIFAP se registró la mayor producción de avena (8,864 kg ha⁻¹). El mayor índice de rentabilidad (2.29) con mayor impacto sobre la producción, forraje-grano se registró en los tratamientos que emplearon el biofertilizante Micorriza INIFAP y el Biofertilizante Bacteriano del INIFAP 2709, sin la aplicación de químicos.

La tecnología evaluada con mejor respuesta para incrementar la productividad en maíz azul (3.59 t ha⁻¹) se obtuvo a través de la aplicación de la Micorriza INIFAP, el pileteo para la cosecha de agua y la mitad de la dosis

recomendada de los nutrimentos N, P y K (35-20-00). El índice de rentabilidad más alto (2.83) se alcanzó con el biofertilizante Micorriza INIFAP y el tratamiento testigo (0-0-0 de N-P₂O₅-K₂O).

Bibliografía Citada

- Aguilera, L.I.G., Olalde, P.V., Rubí, M.A. y Contreras, A.R. 2008. Micorrizas arbusculares. *CIENCIA ergo sum*. 14:300-306.
- Aguirre, J.F.M., Irizar, G.M.B., Peña, R.M.A., Durán, P.A., Grajeda, C.O.A. y Cruz, C.F.J. 2009. Micorriza INIFAP^{MR}. Biofertilizante para la agricultura/Mejor nutrición/Mayor crecimiento de raíz. Hoja desplegable. www.inifap.gob.mx. (Consulta 22 de mayo de 2009).
- Aguirre, M.J.F., Irizar, G.M.B., Durán, P.A., Grajeda, C.O.A., Peña, R.M.A., Loredó, O.B. y Gutiérrez, B.A. 2010. Los Biofertilizantes Microbianos: Alternativa para la Agricultura en México. Folleto Técnico No. 5. INIFAP-CIRPAS-CERI. Tuxtla Chico, Chiapas.
- Alarcón, A.R. y Ferrera-Cerrato, D. 2001. Biofertilizantes: importancia y manejo en la agricultura. *Agr. Téc. Mex.* 26:63-75.
- Amado, J.P.A. y Ortiz, F.P. 2003. Evaluación de fitohormonas, fertilizantes químicos y biológicos, sobre la producción de avena de temporal. *In: Abonos Orgánicos y Platicultura*. Salazar, S.E., Fortis, H.M., Vázquez, A.A. y Vázquez, V.C. (eds). Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Venecia, Durango.
- Amado, J.P.A., Ávila, M.R.M., Herrera, M.D., Ramírez, O.V., Jacinto, R.J., Jiménez, J.C.G. y Jacobo, J.L.C. 2010b. La Biofertilización con Micorriza INIFAP: Tecnología Sostenible para el Cultivo de Avena en el Estado de Chihuahua. Folleto Técnico No. 24. SAGARPA, INIFAP-CIRNOC-CESICH. Cd. Cuauhtémoc, Chih.
- Amado, J.P.A., Chávez, R.M.G., Peña, R.M.A., Díaz, F.A., Moreno, G.B. y Aguado, S.G.A. 2010a. Transferencia de tecnología de la Micorriza INIFAP mediante el establecimiento de parcelas demostrativas en avena. *In: Estrategias de Investigación para la Innovación Tecnológica: Principales Logros en el Norte Centro de México*. Salinas, G.H., Figueroa, V.U., Verástegui, C.J., Rumayor, R.A.F., Pajarito, R.A., Quiroga G.H.M., Peña, R.A., Quiñones, C.A. y Gustavo Chávez, R.G.A. (eds). Matamoros, Coahuila.
- Batten, K., Scow, K., Davies, K. and Harrison, S. 2008. Two invasive plants alter soil microbial community composition in serpentine grasslands. *Biol. Invas.* 8:217-230.
- Bever, J.D., Pringle, A. and Schultz, P.A. 2002. Dynamics within the plant-

- arbuscular mycorrhizal fungal mutualism: testing the nature of community feedback. *Mycor. Ecol.* 157:267-292.
- Bonfante, F.P. 2004. The role of the cell wall as a signal in mycorrhiza associations. *In: Cell to Cell Signals in Plant, Animal and Microbial Symbiosis.* Scannerini, S., Smith, D., Bonfante-Fasolo, P. and Gianinazzi-Pearson, V. (eds). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
- Botella, A., Venanzi, S. y Krüger, H. 2002. Respuestas de un cultivo de avena en siembra directa a la fertilización química y biológica en un ambiente marginal. *In: Memorias del XVIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo.* Puerto Madryn, Chubut, Argentina.
- Cabrera, M.L., Kissel, D.E. and Vigil, M.F. 2005. Nitrogen mineralization from organic residues: research opportunities. *J. Environ. Qual.* 34:75-79.
- Castellanos, J.Z., Márquez, J.J.O., Etchevers, J.D., Aguilar, A.S. y Salinas, J.R. 1996. Efecto de largo plazo de la aplicación de estiércol de ganado lechero sobre el rendimiento de forrajes y las propiedades del suelo en una región árida irrigada del norte de México. *Terra* 14:151-158.
- Colin, R.M., Zamora, V.V.M., Lozano, R.A.J., Martínez, Z.G. y Torres, T.M.A. 2007. Caracterización y selección de nuevos genotipos imberbes de cebada forrajera para el norte y centro de México. *Tec. Pecu. Méx.* 45:249-262.
- Cruz, V.A. 1995. La práctica del pileteo en los sistemas de temporal. *In: Memorias del Quinto Congreso Nacional de la Ingeniería Agrícola.* Universidad de Guanajuato. Irapuato, Guanajuato.
- De la Peña, E. 2009. Efectos de la biota edáfica en las interacciones planta-insecto a nivel foliar. *Ecosistemas* 18:64-78.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, D., Ptacek, G., Labandera, M., Caballero, M.L, Aguirre, S.J., Burdman, S., Sang, J. y Okon, H. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Austr. J. Plant Physiol.* 28:871-879.
- Dodd, J.C., Arias, I., Comen, I. and Hayman, D.S. 1990. The management of populations of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in acid-infertile soils of a savanna ecosystem. *Plant Soil* 122:229-240.
- Fernández, H.P., Félix, O.V., Quezada, C.O.R., Castillo, J.G.A., Rubio, D.M., Contreras, L.P.C. y Amado, J.P.A. 2009. Programa de promoción y uso

- de biofertilizantes (Micorriza) en el cultivo de avena de temporal en Chihuahua. (Informe sin publicar).
- Fitzpatrick, E.A. 1996. Introducción a la Ciencia de los Suelos. Editorial Trillas. México, D.F.
- Giulietti, A.L., Ruiz, O.M., Pedranzani, H.E. y Terenti, O. 2008. Efecto de cuatro lombricompuestos en el crecimiento de plantas de *Digitaria eriantha*. *Phyton* 77:137-149.
- Heinzeman, J. and Weritz, J. 1990. Rockwool: a new carrier system for mass multiplication of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Angew Bot.* 64:271-274.
- Herrera, M.D., Amado, J.P.A, Ramírez, V.O., Jacinto, S.R., Ávila, M.M.A. y Jiménez, G.J.C. 2010. Uso combinado de fertilizante químico y biofertilizante para la producción del cultivo de avena. *Agrofaz* 10:27-35.
- Huerta, E., Gómez, R. y Constantino, M. 2008. Manual de Aplicación y Reproducción de Biofertilizantes. El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Villahermosa. Villahermosa, Tabasco.
- Inzunza, I.M.A., Villa, M.C., Catalán, E.A.V. y Mendoza, S.F.M. 2006. Modelo para estimar el rendimiento de maíz en función de la humedad del suelo. *Terra Latinoam.* 242:179-186.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnan, K. and Barea, J.M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fertil. Soils* 37:1-16.
- Klironomos, J.N. 2002. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature* 417:67-70.
- Lamm, F.R. and Schlegel, A.J. 2000. Nitrogen fertilization for corn production when using lepa center pivot sprinklers. *In: National Irrigation Symposium Proceedings of the 4th Decennial Symposium.* Evans, G.R., Benham, B.L. and Trooien, P.T. (eds). American Society of Agricultural Engineers. Phoenix, Arizona.
- Linderman, R.G. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. *In: Micorrizae in sustainable agriculture.* Special Publication 54. Bethlenfalvay, G.J. and Linderman, R.G. (eds). American Society of Agronomy. Madison, WI.
- López, M.J.D., Estrada, A.D., Rubin, E.M y Valdéz, R.D. 2001. Abonos

- orgánicos y su efecto en propiedades físicas y químicas del suelo y rendimiento en maíz. *Terra Latinoam.* 19: 293-300.
- Loredo, O.C., López, R.L. y Espinoza, V.D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. *Terra Latinoam.* 22:225-239.
- Martínez, L.B. y Pugnaire, F.I. 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas* 18:44-54.
- Medina, G.M., Díaz, P.G.M., Berzoza, M.M., Silva, S.A., Chávez, S.H. y Báez, G.A.D. 2006. Estadísticas Climatológicas Básicas del Estado de Chihuahua (periodo 1961-2003). Libro Técnico No. 1. INIFAP-CIRNOC-Dirección de Coordinación y Vinculación Estatal en Chihuahua. Chihuahua, Chih.
- Moncayo, R.I. 2009. Micorrizas: solución para la reforestación y recuperación de suelos contaminados. Tríptico. Bio Triton, S.A. www.biotri-ton.cl. (abril- 2009).
- Ortíz, P.F., Amado, J.P.A. y Salmerón, J.J.Z. 2000. Evaluación de tecnología para avena en la Sierra de Chihuahua. Variedades y Fertilización Mayor. Folleto Científico No. 6. INIFAP-CIRNOC-CESICH. Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua.
- Parker, M.A., Malek, W. and Parker, M.I. 2006. Growth of an invasive legume is symbiont limited in newly occupied habitats. *Divers. Distribut.* 12:563-571.
- Ramírez, V.O., Amado, A.J.P, Ávila, M.M.R., Jiménez, G.J.C., Jacinto, S.R., Herrera, M.D. y Jacobo, C.J.L. 2010. Influencia de la biofertilización y fertilización química sobre la productividad de avena en Chihuahua. *Agrofaz* 10:37-46.
- Rilling, M.C. and Mummey, D.L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171:41-54.
- Robles, C. y Barea, J. 2004. Respuesta de la planta y del suelo a inoculación con *Glomus intraradices* y rizobacterias en maíz en cultivo intensivo. *Terra Latinoam.* 22:59-69.
- Rodríguez, E.S., Crisóstomo, J.A., Nabais, C. and Freitas, H. 2009. Belowground mutualists and the invasive ability of *Acacia longifolia* in coastal dunes of Portugal. *Biol. Invas.* 11:651-661.
- Salazar, S.E., Trejo, E.H.I., Vázquez, V.C. y López, M.J.D. 2007. Producción de

- maíz bajo riego por cintilla, con aplicación de estiércol bovino. *ΦYTON* 76:169-185.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. GTZ. Germany.
- Tarafdar, J.C. and Rao, A.V. 2002. Possible role of arbuscular mycorrhizal fungi in development of soil structure. *In: Soil fertility, Soil biology and Plant Nutrition Interrelationships*. Siqueira, J.F., Moreira, A., Lopes, L. Guilherme, V., Faquin, A., Furtini, N. and Carvalho, J. (eds). Sociedade Brasileira de Ciencia do solo. Labras, Brasil.
- Trappe, J.M. 1987. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. *In: Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. Safir, J.R. (ed). CRC Press. Boca Raton, USA.
- Van der Heijden, M.G.A., Boller, T., Wiemken, A. and Sanders, I.R. 1998. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79:2082-2091.
- Vázquez, M.M. Cesar, S., Azcón, R. and Barea, J.M. 2000. Interactions between mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial populations and enzyme activities in the rizosphere of maize plants. *Appl. Soil Ecol.* 15:261-272.
- Xia, O.K., Chen, B.D., Christie, P., Smith, A., Wang, Y.S. and Li, X.L. 2007. Arsenic uptake by arbuscular mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in an arsenic-contaminated soil with added phosphorus. *J. Environ. Sci.* 19:1245-1251.
- Yao, Q., Zhu, H.H., Hu, Y.L. and Li, L.Q. 2008. Differential influence of native and introduced arbuscular mycorrhizal fungi on growth of dominant and subordinate plants. *Plant Ecol.* 196:261-268.
- Young, C.C., Lai, W.A., Shen, F.T., Hung, M.H., Hung, W.S. and Arun, A.B. 2003. Exploring the microbial potentiality to augment soil fertility in Taiwan. Soil management technology on low-productivity and degraded soils. The 6th ESAFS International Conference. Taipei, Taiwan.

Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes
en la Agricultura se terminó de imprimir en el
mes de Julio de 2012,
con un tiraje de 1,500 ejemplares.

impreso en:



Presa Peñuelitas 104 Col. Benito Juárez
C.P. 38030 Celaya, Gto. México
Tel. 461 612 2983
www.ocma.com.mx
atencionclientes@ocma.com.mx

Los biofertilizantes son productos agrobiotecnológicos que se caracterizan por contener microorganismos "vivos o latentes" que incrementan la productividad y sanidad de los cultivos. Los biofertilizantes pueden actuar favoreciendo el estado nutricional o la sanidad de las plantas, a través de una gran diversidad de mecanismos como la fijación biológica de nitrógeno, el incremento de la disponibilidad y el acceso a los nutrientes del suelo, el control de agentes fitopatógenos o la activación de los sistemas de defensa de las plantas.

La aceptación de estos productos biológicos como parte integral de los sistemas de producción agrícola es cada vez mayor no solamente en nuestro país sino en el mundo entero. Parte de este renovado interés se deriva de una situación de oportunidad, pero también de necesidad, ya que las tendencias globales en cuanto a la reducción del uso de químicos dañinos a la salud humana y al ambiente, así como el aumento en los precios de los fertilizantes sintéticos está forzando a la adopción de tecnologías más económicas y con un menor impacto ecológico. Aunque los biofertilizantes no reemplazan completamente el uso de los fertilizantes o pesticidas sintéticos, si constituyen una alternativa viable para reducir de manera sustantiva la cantidad utilizada actualmente de estos productos químicos.

Las nuevas líneas de investigación en torno al uso de biofertilizantes deberán considerar la compatibilidad de los microorganismos promotores de crecimiento con abonos orgánicos y otros productos naturales para reducir aún más la dependencia de los fertilizantes y pesticidas químicos.

La carencia de una obra que tratara de una manera sencilla, general y concreta el tema del uso de los biofertilizantes en México, precisando sus alcances pero también sus limitaciones inspiró la realización de este libro.

En los primeros capítulos de esta obra se abordan los tópicos introductorios al uso de los biofertilizantes, mientras que en últimas secciones se plasman las experiencias concretas de algunos investigadores mexicanos en torno al empleo de estos productos biológicos en diversos cultivos y ambientes agroecológicos de nuestro país como un medio para aumentar la productividad agrícola y reducir el impacto de los fertilizantes químicos en el ambiente.

