

**EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE UN BIOINOCULANTE SOBRE UN
CULTIVO DE CRISANTEMO (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono)
EN PERÍODO DE ENRAIZAMIENTO**



MIGUEL EDUARDO MANTILLA CARDENAS

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA AGRICOLA Y VETERINARIA
Bogotá D.C.
JULIO, 2007**

**EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE UN BIOINOCULANTE SOBRE UN
CULTIVO DE CRISANTEMO (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono)
EN PERÍODO DE ENRAIZAMIENTO**



MIGUEL EDUARDO MANTILLA CARDENAS

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

para optar al título de

MICROBIÓLOGO AGRÍCOLA Y VETERINARIO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE MICROBIOLOGIA AGRICOLA Y VETERINARIA

Bogotá D.C.

JULIO, 2007

NOTA DE ADVERTENCIA:

Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946: “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado”.

**EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE UN BIOINOCULANTE SOBRE UN
CULTIVO DE CRISANTEMO (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono)
EN PERÍODO DE ENRAIZAMIENTO**



MIGUEL EDUARDO MANTILLA CARDENAS

APROBADO:

MARIA MERCEDES MARTINEZ SALGADO
DIRECTORA

MARIA XIMENA RODRIGUEZ BOCANEGRA
CODIRECTORA

JOSE SALVADOR MONTAÑA LARA
JURADO 1

CARLOS ROA
JURADO 2

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA AGRICOLA Y VETERINARIA
Bogotá D.C.
JULIO, 2007**

**EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE UN BIOINOCULANTE SOBRE UN
CULTIVO DE CRISANTEMO (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono)
EN PERÍODO DE ENRAIZAMIENTO**



MIGUEL EDUARDO MANTILLA CARDENAS

APROBADO:

**ANGELA UMAÑA MUÑOZ, Mphil.
DECANA ACADEMICA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**LUIS DAVID GOMEZ MENDEZ MSc.
DIRECTOR CARRERAS
DE MICROBIOLOGIA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA AGRICOLA Y VETERINARIA
Bogotá D.C.
JULIO, 2007**

*“Un nuevo barco para él construyeron
de mitril y de vidrio élfico,
de proa brillante; ningún remo desnudo,
ninguna vela en el mástil de plata:
el Silmaril como linterna
y en la bandera un fuego vivo
puesto allí mismo por Elbereth,
y otorgándole alas inmortales
impuso a Eärendil un eterno destino:
navegar por los cielos sin orillas
detrás del Sol y la luz de la Luna.”*

J.R.R. Tolkien

AGRADECIMIENTOS:

- A Dios por permitirme llegar hasta este punto de mi carrera y darme la fuerza para no renunciar
- A María Mercedes y María Ximena por exigirme a hacer siempre el kilómetro de más, por su infinita paciencia, sabios consejos, apoyo constante y su incondicional amistad
- A mi Familia y amigos por brindarme su fortaleza, paciencia, apoyo y aprender trasnochando conmigo microbiología, fisiología vegetal y estadística
- Dr. Cristian Fog y al personal de Cultivos del Norte por brindarme la oportunidad y su confianza para llevar a cabo este proyecto y por su apoyo durante todo el montaje en campo y en la recopilación de información
- A Maritza López y Víctor Pérez por su apoyo invaluable durante el desarrollo de la investigación
- A tesistas e investigadores del Laboratorio Microbiología Ambiental por su colaboración y a los miembros del Departamento de Química de la PUJ

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....	11
2.1 Los inoculantes biológicos.....	11
2.1.1 Bioinoculantes.....	13
2.1.2 Microagro.....	14
2.2 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal - PGPR.....	15
2.2.1 Producción de hormonas.....	17
2.2.2 Métodos de detección de fitohormonas.....	22
2.2.3 <i>Burkholderia cepacia</i>	24
2.2.4 Levaduras.....	27
2.2.5 <i>Lactobacillus</i> sp.	28
2.2.6 Otros microorganismos productores de fitohoromonas.....	30
2.2.7 Auxinas.....	30
2.2.7.1 Ácido indol acético (AIA).....	32
2.3 Crisantemo.....	34
2.3.1 Taxonomía y morfología.....	34
2.3.2 Propagación.....	35
2.3.3 Enfermedades del crisantemo.....	37
3. JUSTIFICACION.....	39
4. OBJETIVOS.....	40
4.1 Objetivo General.....	40
4.2 Objetivos específicos.....	40
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
5.1 Localización.....	41
5.2 Evaluación de grupos microbianos en el bioinoculante (Microagro).....	41
5.2.1 Toma de muestras.....	41
5.2.2 Aislamiento de grupos funcionales microbianos presentes.....	42
5.3 Determinación de la producción de AIA.....	42

5.3.1 Curva patrón de ácido indol acético (AIA)	42
5.3.2 Determinación de la concentración de AIA.....	44
5.4 Producción del preinóculo de Microagro.....	45
5.5 Preparación del inoculante Microagro.....	45
5.6 Ensayo de enraizamiento.....	46
5.7 Evaluación de variables agronómicas.....	51
5.8 Pruebas de antagonismo frente a <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	52
5.9 Diseño de la investigación.....	53
5.10 Análisis estadístico.....	53
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
6.1 Aislamiento de grupos funcionales microbianos presentes.....	55
6.2 Determinación de la producción de AIA.....	57
6.2.1 Determinación de la concentración de AIA.....	61
6.3 Evaluación de variables agronómicas.....	70
6.3.1 Altura de los esquejes de crisantemo.....	71
6.3.2 Peso fresco de los esquejes de crisantemo.....	75
6.3.3 Peso seco de los esquejes de crisantemo.....	77
6.3.4 Peso seco radicular de los esquejes de crisantemo.....	81
6.3.5 Presencia de síntomas y porcentaje de mortalidad.....	84
6.4 Efecto sobre patógenos.....	86
6.5 Test de Correlación de Pearson.....	87
7. CONCLUSIONES	90
8. RECOMENDACIONES.....	91
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXOS.....	105

LISTA DE TABLAS

	Pág
TABLA 1: TIPOS DE INOCULANTES BIOLÓGICOS DE FORMULACIÓN RECONOCIDA POR EL ICA.....	12
TABLA 2: RECUENTO DE MICROORGANISMOS EN EL BIOINOCULANTE ANTES Y DESPUÉS DE LA MODIFICACIÓN EN FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	15
TABLA 3: MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE FITOHORMONAS.....	20
TABLA 4: PLAGAS Y ENFERMEDADES EN CRISANTEMO.....	37
TABLA 5: SOLUCIONES PARA CURVA PATRÓN.....	43
TABLA 6: TRATAMIENTOS ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO.....	48
TABLA 7. RECUENTO DE MICROORGANISMOS EN EL BIOINOCULANTE ANTES Y DESPUES DE LA MODIFICACION.....	56
TABLA 8: CARACTERISTICAS DE LAS 4 CEPAS ANALIZADAS.....	57
TABLA 9: DATOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.....	60
TABLA 10. VALORES MEDIOS DE ALTURA EN 4 MEDICIONES.....	72
TABLA 11: VALORES MEDIOS DE PESO FRESCO EN 4 MEDICIONES.....	76
TABLA 12: VALORES MEDIOS DE PESO SECO A TRAVÉS DEL TIEMPO (12 DÍAS).....	78
TABLA 13. PRINCIPALES FACTORES PRODUCIDOS POR LOS MICROORGANISMOS AISLADOS DE MICROAGRO.....	79
TABLA 14: VALORES MEDIOS DE PESO SECO RADICULAR.....	81
TABLA 15: VALORES MEDIOS DE MORTALIDAD EN 4 MEDICIONES.....	85
TABLA 16. RESULTADOS ARROJADOS POR LA PRUEBA DE ANTAGONISMO. HALOS DADOS EN MM.....	86

LISTA DE FIGURAS

	Pág
FIGURA 1: ÁCIDO INDOL 3-ACÉTICO.....	32
FIGURA 2: RUTAS BIOSINTÉTICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE AIA	33
FIGURA 3: TANQUES DE ALMACENAMIENTO DEL BIOINOCULANTE.....	41
FIGURA 4: SELECCIÓN ALEATORIA DE ESQUEJES DE CRISANTEMO.....	47
FIGURA 5: DISTRIBUCIÓN ALEATORIA DE ESQUEJES.....	47
FIGURA 6: CANASTAS PARA ENRAIZAMIENTO CON 120 ESQUEJES DE CRISANTEMO.....	48
FIGURA 7: PILAS DE COMPOST OBTENIDAS A PARTIR DE RESIDUOS DE COSECHA DE CRISANTEMO.....	49
FIGURA 8: PILAS DE CASCARILLA Y COMPOST	50
FIGURA 9: VOLTEO MANUAL PARA HOMOGENIZAR MEZCLA DE CASCARILLA + COMPOST.....	50
FIGURA 10: CURVA DE CALIBRACIÓN DE AIA	61
FIGURA 11: CONCENTRACIÓN OBTENIDA A 530 NM MEDIANTE LA REACCIÓN POSITIVA AL REACTIVO DE SALKOWSKI	62
FIGURA 12: REACCIÓN POSITIVA AL TEST DE SALKOWSKI, FRENTE AL BLANCO UTILIZADO EN EL MONTAJE	62
FIGURA 13: TONALIDADES DE REACCIONES POSITIVAS PRESENTADAS POR <i>Burkholderia cepacia</i> AL REACTIVO DE SALKOWSKI.....	65
FIGURA 14: DISTRIBUCIÓN ALEATORIA DE 90 CANASTAS DE LOS TRES TRATAMIENTOS Y EL CONTROL.....	70
FIGURA 15: RANGOS MEDIOS DE ALTURA A TRAVÉS DEL TIEMPO (12 DÍAS).....	72
FIGURA 16: RANGOS MEDIOS DE PESO FRESCO A TRAVÉS DEL TIEMPO (12 DÍAS).....	77
FIGURA 17: RANGOS MEDIOS DE PESO SECO A TRAVÉS DEL TIEMPO (12 DÍAS).....	78
FIGURA 18: RANGOS MEDIOS DEL PESO SECO RADICULAR AL FINAL DEL ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO (12 DÍAS).....	82
FIGURA 19: RANGOS MEDIOS DEL % MORTALIDAD AL FINAL DEL ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO	85

FIGURA 20: TEST DE CORRELACION DE PEARSON..... 89

LISTA DE ANEXOS

	Pág
ANEXO 1.	
MEDIOS DE CULTIVO.....	105
MEDIO SÓLIDO YMA.	105
AGAR NUTRITIVO.....	105
MEDIO SMRS1.	106
MEDIO ASHBY-MANITOL.....	106
MEDIO EXTRACTO DE MALTA (SCHARLAU®).....	107
MEDIO MRS (MERCK®).....	107
AGAR PDA (SCHARLAU®).....	107
CALDO TRIPTICASA SOYA (MERCK®).....	108
MEDIO KING B.....	108
ANEXO 2.	
REACTIVO DE VON URK SALKOWSKI (MODIFICACIÓN REALIZADA POR BRIC <i>ET AL.</i> , 1991 DE LA COMPOSICIÓN ORIGINAL REALIZADA POR SALKOWSKI 1889).....	109
ANEXO 3.	
LECTURA DE ABSORBANCIA A 530 nm COMPARATIVA DE DOS CURVAS DE CALIBRACION DE AIA EVALUADAS CON DOS PREPARACIONES DEL REACTIVO DE SALKOWSKI. CADA LECTURA CORRESPONDE A UN PROMEDIO DE 3 REPETICIONES.....	110
ANEXO 4.	
RESULTADOS DE ABSORBANCIA Y CONCENTRACIÓN OBTENIDOS EN 7 MEDICIONES PARA EVALUAR LA CONCENTRACIÓN DE AIA (530 NM) EN INÓCULOS INDIVIDUALES Y UN CULTIVO MIXTO DE MICROORGANISMOS AISLADOS DEL BIOINOCULANTE.....	111
ANEXO 5.	
ANALISIS ESTADISTICO.....	113

RESUMEN

Con el objeto de evaluar la acción del bioinoculante no comercial Microagro producido en un cultivo de flores de la sabana de Bogotá, y utilizado como fertilizante orgánico en fase de enraizamiento, se aislaron diferentes grupos microbianos a partir del bioinoculante, y se evaluó la capacidad biológica para la producción de ácido indol acético (AIA), por medio de la reacción colorimétrica de Salkowski. Se observó que la bacteria fosfato solubilizadora (BFS), *Burkholderia cepacia* produjo la mayor concentración de 14.823 µg/ml de AIA en inóculo individual al cuarto día de incubación en caldo tripticasa soya (temperatura ambiente, 120 rpm), en comparación al control positivo, *Azotobacter vinelandii* ATCC 12518, el cual produjo 18.332 µg/ml y 0.384 µg/ml de *Salmonella enteritidis* ATCC 13221, usado como control negativo. Por otra parte, se observó que en inóculo mixto sobre caldo tripticasa soya se calculó una concentración de 5.826 µg/ml de AIA al quinto día de fermentación y sobre el medio Microagro 2.542 µg/ml de AIA al cuarto día de fermentación. Así mismo, se evaluó la acción del inoculante Microagro sobre el proceso de enraizamiento de esquejes de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono), para esto se establecieron 3 tratamientos: a base de cascarilla tostada y cómpost (tratamiento 1), cascarilla y Microagro (tratamiento 2) y cascarilla, compost y Microagro (tratamiento 3); y un control. Sobre estos, se evaluó la altura, peso fresco, peso seco y peso seco radicular como variables agronómicas y, por otra parte, se evaluó la tasa de mortalidad y presencia de síntomas de damping off y moho blanco sobre los esquejes de crisantemo. Se observó, por medio de estadística no paramétrica, que la acción de Microagro influyó de manera significativa el incremento en peso fresco de los esquejes de crisantemo (3.5 g) ($p < 0.001$), el tratamiento con cascarilla y compost incrementó significativamente la altura (18.77 cm) ($p < 0.001$) y, diferencialmente, el peso seco radicular (0.113 g) con $p < 0.001$. Al final del ensayo de enraizamiento se observó una característica importante marcada por la observación una menor incidencia de síntomas de damping off y moho blanco, y tasa de mortalidad en los 3 tratamientos donde se utilizaron sustratos orgánicos para la fertilización de los esquejes de crisantemo ($< 0.1\%$).

ABSTRACT

The objective of these research was to evaluate the impact of a non-commercial bioinoculum produced in a crop plantation located in the savannah of Bogota, and used like organic fertilizer in the phases of rooting and production beds, different microbial groups were isolated from Microagro isolated themselves, and indoleacetic acid (IAA) production was verified on these isolations, by means of Salkowski colorimetric reaction. It was observed that the phosphate solubilizing bacteria (PSB) *Burkholderia cepacia* concentrated the greater production of IAA in an individual inoculum at the fourth day of incubation, having obtained 14,823 µg/ml, in comparison to the positive control, *Azotobacter vinelandii* ATCC 12518, which produced 18,332 µg/ml and *Salmonella enteritidis* ATCC 13221 wich produced 0.384 µg/ml of IAA. On the other hand, it was observed that under a mixed inoculum the production of IAA was 5,826 µg/ml at the fifth day of incubation. Also, the action of Microagro was evaluated in the process of rooting of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* to var. yoko ono), for this we settled down 3 treatments: husk and compost (treatment 1), husk and Microagro (treatment 2) and husk, compost and Microagro (treatment 3); and a control. Above this was evaluated height, fresh weight, dry weight, dry radicular weight, rate of mortality and symptomatic incidence of damping off and white mould on chrysanthemum cuttings. It was observed that the microbial action influenced in a fundamental way the increase of the fresh weight of chrysanthemum cuttings (3,5 g) ($p < 0,001$), the treatment with husk and compost increased in greater amount the height (18,77 cm) ($p < 0,001$) and radicular dry weight (0,113 g) ($p < 0,001$). At the end of the rooting test, an important characteristic was observed, marked by the minor percentages presented in the symptomatic incidence of damping off and white mould, and the mortality rate in the three treatments where the organic substratum were used to enrich the chrysanthemum cuttings ($< 0,1\%$).

1. INTRODUCCIÓN

La floricultura en Colombia es una actividad agrícola representada por 202 compañías distribuidas en 308 fincas con un área total de siembra de 6.544 Ha establecidas en Cundinamarca y Antioquia. Representa ingresos anuales por el orden de U\$512'676.000 estimados para el 2006 (DANE, 2006). Del total de flor deducido de exportaciones, el crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) representa el 2% de estos ingresos, siendo el tercer producto de flores de corte en importancia, después de la rosa (*Rosa* sp.) y el clavel (*Dianthus caryophyllus*) (Asocolflores, 2005).

Dentro del cultivo del crisantemo, el proceso de enraizamiento se considera un proceso clave para la producción de plantas en sistemas a gran escala. Este proceso permite controlar las condiciones ambientales sobre las cuales serán cultivadas las plántulas en sus estadíos jóvenes, con el fin de brindarle sustratos adecuados, soportes para mantener homogéneas variables agronómicas, como altura, peso, área foliar, producción de raíces, entre otras; y, así mismo, proteger el material vegetal de condiciones bióticas y abióticas. Dado que mediante este proceso se pretende promover el crecimiento de los esquejes, se hace necesario el uso de sustancias y factores que promuevan el desarrollo vegetal, considerando que el ácido indol acético (AIA) y el ácido indol butírico (AIB) son las fitohormonas más utilizadas en la agricultura de extensión (Somers *et al.*, 2005).

Estas sustancias pueden ser sintetizadas químicamente o producidas por diversos microorganismos asociados a la rizósfera, los cuales son considerados como promotores del crecimiento vegetal (PGPR – Plant Growth Promoting Rhizobacteria), entre ellos el AIA, sintetizado a partir de triptófano u otros compuestos que pueden funcionar como promotores (Anwar, 2000). Dichas habilidades metabólicas presentes en las bacterias promueven el crecimiento de esquejes, la formación del sistema radicular en etapas jóvenes de la planta, estimulan la elongación del tallo y mejoran la productividad de las plantas (Ahmad *et al.*, 2005).

Desde 1889, se vienen trabajando diferentes técnicas para la detección de AIA, iniciando por la reacción colorimétrica de Salkowski, siendo aún la técnica más usada, hasta técnicas de espectrofotometría y cromatografía como TLC (Thin layer

Chromatography) y HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Así mismo, el uso de extractos naturales y acetato de etilo a partir de cultivos de microorganismos como *Azospirillum brasilense* para evaluar la presencia de compuestos indol (1889, Salkowski; Anwar, 2000; Jiménez *et al.*, 2000; Crozier *et al.*, 1988).

Los inoculantes microbianos son desarrollados a partir de inóculos mixtos los cuales en Colombia, son importados o producidos por fermentación controlada o de manera artesanal por los cultivadores. Es en este marco donde se resalta la importancia de estudiar bioinoculantes como Microagro, desarrollado por la empresa Cultivos del Norte para la activación biológica de suelo en crisantemo y rosa, tanto en fase de enraizamiento, como en camas de producción.

El presente estudio da continuidad al denominado “Evaluación un medio de cultivo no comercial para la producción de un bioinoculante empleado en un cultivo de flores”, desarrollado por López *et al.* (2006); donde evaluaron las condiciones de producción del bioinoculante Microagro, sobre el cual se realizaron recomendaciones destinadas a incrementar la población de 4 géneros microbianos aislados a partir del bioinoculante Microagro: *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas hydrophyla* (bacterias fosfato solubilizadoras), *Cryptococcus laurentii* (levadura) y *Lactobacillus paracasei* (bacteria ácido láctica).

2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 Los inoculantes biológicos

Un inoculante biológico se define como una sustancia producida a partir de sustratos orgánicos, cuya acción potencia el metabolismo de microorganismos que poseen una función determinada. Dentro de estos se incluyen biofertilizantes, bioinoculantes, aceleradores de compostaje, lombricompostos, biocontroladores, biorremediadores (ICA, 2006).

Las normas de producción, uso y control de calidad de los inoculantes según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) generalmente tienen estándares mínimos que varían de acuerdo con el país. No existen especificaciones definidas para muchos microorganismos utilizados en la producción de inoculantes, sin embargo, se cuentan con datos para los microorganismos mundialmente más utilizados, como es el caso de *Rhizobium* sp., para el cual se tiene en cuenta que un inóculo de alta calidad debe contener no menos de 5×10^9 ufc/g de soporte. Debe ser especificado el tipo de planta a cultivar y aportar por lo menos $1-5 \times 10^3$ rizobios/semilla, en el caso de semillas pequeñas como alfalfa y trébol (Bashan *et al.*, 1995; Novo, 1993).

En el marco de la producción nacional de insumos agrícolas, la entidad que regula la producción de estos productos es el ICA en la resolución 00375 (ICA, 2004), define como inoculante biológico, un producto elaborado con base en una o más cepas de microorganismos benéficos que, al aplicarse al suelo o a las semillas, promueven el crecimiento vegetal o favorece el aprovechamiento de los nutrientes en asociación con la planta o su rizósfera. Incluye entre otros los productos elaborados con micorrizas, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y diferentes especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Frankia*, *Beijerinckia*; los inoculantes producidos en el país deben adaptarse a los sistemas de cultivo sobre los

cuales se vayan a aplicar, pero en un contexto general deben presentar un inóculo no menor a 1×10^5 UFC/ml (ICA, 2006).

En Colombia se encuentran registrados un sin número de empresas destinadas a la producción de inoculantes producidos a partir de diversos microorganismos, lo cual provee un rango considerable de aplicaciones. Entre las empresas registradas se encuentran Agrintel Ltda., Orius Ltda., Palm-Mixtex, Agropecuaria Reina Ltda., Animal Market, entre otras (ICA, 2004). Igualmente existe información para la producción de otros inoculantes, como los preparados con *Pseudomonas* sp., que deben presentar $5-9 \times 10^7$ ufc/ml, *Azotobacter* sp., 1×10^7 ufc/g, *Bacillus* sp. o *Azospirillum* sp., entre $1 \times 10^{5-6}$ ufc/ml para cereales y 1×10^7 ufc/ml para maíz, mientras que bajo una concentraciones iguales o superiores a $1 \times 10^{8-10}$ ufc/ml generalmente inhibe el desarrollo radicular. En general, un inoculante debe cumplir con adecuada concentración bacteriana, especificidad para estimulación del crecimiento vegetal y, para su formulación comercial, presentar información sobre lote y fecha de vencimiento y cumplir con condiciones de almacenamiento adecuadas (Bashan, 1996).

En la actualidad existen diversos tipos de inoculantes biológicos, los cuales se encuentran en presentaciones en polvo, granulados, líquidos y en agar (ICA, 2006) (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de Inoculantes Biológicos de formulación reconocida por el ICA

Tipo de Inoculante Biológico	Características
Inoculantes en polvo	Más comunes. El cultivo de bacterias es mezclado con turba fina que sirve para proteger las bacterias durante el período de preservación y les facilita adhesión a la semilla.
Inoculantes granulados	Microgranulados producidos a partir del inoculante en polvo aglutinado con arcilla, gel de algas marinas o se mezcla de goma xantan.
Inoculantes líquidos	El soporte es el mismo líquido en donde se elaboró el inoculante, el cultivo se diluye para su uso y se debe almacenar generalmente a bajas temperaturas.
Inoculantes en agar	No son muy empleados debido a su baja supervivencia

(ICA, 2004)

2.1.1 Bioinoculantes

El uso de inoculantes biológicos en los sistemas productivos, es una alternativa viable e importante para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conserva el suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad. (ICA, 2004)

Numerosos microorganismos, especialmente aquellos asociados con raíces como *Rhizobium* sp., *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp., entre otros tienen la habilidad de incrementar el crecimiento de las plantas al igual que su productividad. En algunos casos, este efecto se cree involucra la solubilización de algunos nutrientes minerales no disponibles. En el suelo, macro y micronutrientes sufren un complejo equilibrio dinámico de solubilización e insolubilización que es altamente influenciado por el pH y la microflora, lo que posteriormente afecta su accesibilidad a las raíces de la planta por absorción (Loredo *et al.*, 2004).

Dentro de los beneficios que presenta el uso de microorganismos en la agricultura están su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, la descomposición de residuos orgánicos, la detoxificación de plaguicidas, el control de enfermedades en las plantas, el aporte de nutrientes al suelo y la producción de compuestos bioactivos como vitaminas y hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas (Loredo *et al.*, 2004); del mismo modo es importante incentivar estudios para la búsqueda de nuevas fuentes de bioinoculantes y por supuesto nuevas aplicaciones.

En la actualidad el uso de bioinoculantes, aplicados como inoculantes dentro de los sistemas de producción agrícola, está teniendo un gran auge, especialmente para lograr una mayor disponibilidad de nutrientes que permitan un rendimiento sostenible de los cultivos, con la conservación del medio ambiente y una mayor producción.

2.1.2 Microagro

El Microagro es un bioinsumo líquido implementado en floricultura y actualmente es producido por un cultivo comercial de flores de la Sabana de Bogotá. La composición del medio consta de leche para terneros, melaza y agua, los cuales son fermentados en tanques de 1000 litros, donde se obtiene un compuesto, cuya función principal se basa en el aporte de microorganismos benéficos para crisantemo y rosa tanto en fase de enraizamiento como de producción en camas. Su uso se combina con la aplicación de compost, lombricompost, aditivos químicos (López *et al.*, 2006).

La producción se hace en un sistema en batch empleando melaza, leche y agua como sustrato durante 8 días de fermentación con posterior extracción de la mitad del bioinoculante el cual es reconstituido con agua para empezar de nuevo el proceso (Cultivos del Norte, 2005).

Recuentos realizados sobre el bioinoculante, encontraron poblaciones de 10^4 UFC/ml, lo cual indica una concentración celular relativamente baja para un inoculante biológico (Tabla 2) (Cultivos del Norte, 2005). Este bioinoculante poco tecnificado ha sido empleado, especialmente en pompón, para promover y mantener el crecimiento y la calidad de las flores que cultivan proporcionando una fuente de nutrientes solubles obtenida a través de la acción metabólica ejercida por los microorganismos allí presentes.

En el estudio realizado por López *et al.* (2006) se recomendó implementar condiciones de agitación de 150 rpm y el manejo de un Volumen Efectivo de Trabajo (VET) del 75% que favorecen las condiciones del cultivo incrementando las poblaciones microbianas del bioinoculante Microagro; aunque en la actualidad se sigue trabajando un VET cercano al 100%, realizando agitaciones manuales una vez a la semana.

Tabla 2: Recuento inicial de Microorganismos en el bioinoculante

Grupo Funcional	Recuento inicial UFC/ml
Bacterias fosfato solubilizadoras	20x10 ⁴
<i>Lactobacillus sp.</i>	17x10 ⁴
Levaduras	18x10 ⁴
Mesófilos aerobios	57x10 ⁴
<i>Azospirillum sp.</i>	<100
<i>Azotobacter sp.</i>	<100
Hongos filamentosos	<100

(López *et al.*, 2006)

2.2 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal – PGPR

El término PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) fue introducido por primera vez por Kloepper y Schroth (1979), para describir las rizobacterias que inducen el incremento del crecimiento de las plantas, mostrando ser organismos altamente eficaces en la promoción del crecimiento de las plantas e incrementar su tolerancia a otros microorganismos causantes de enfermedades. Un gran número de especies bacterianas, la mayoría de ellas asociadas a la rizósfera pueden ejercer un efecto benéfico sobre el crecimiento de la planta, este grupo denominado como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), algunas de ellas son bacterias solubilizadoras de fósforo (PSB), actualmente están siendo utilizadas como bioinoculantes para el mejoramiento de actividades agrícolas (Loredo *et al.*, 2004). Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas se definen como bacterias habitantes de la rizósfera que estimulan significativamente el crecimiento de plantas. En años recientes, se ha retomado el interés de utilizar bacterias promotoras de crecimiento en la producción de cultivos. Estas bacterias se han aplicado a semillas, tubérculos o raíz, y son capaces de colonizar las raíces de las plantas y estimular el crecimiento y rendimiento de cultivos (Agrios, 2004). Los mecanismos del efecto de las bacterias promotoras de crecimiento no son bien comprendidos, sin embargo, se ha sugerido un amplio rango de posibilidades que incluye efectos directos o indirectos.

El efecto directo consiste en un aumento en la movilización de nutrientes solubles, seguido por el mejoramiento de absorción de las plantas, el aumento de fijación de N₂ y la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas) (Ahmad *et al.*, 2005). Efectos indirectos incluyen la producción de sideróforos, la producción de antibióticos contra hongos, bacterias y virus, mejorar el número de nódulos de la raíz y el aumento de la actividad nitrogenasa, los cuales inducen resistencia sistémica a la planta (Igal *et al.*, 2001).

La acción de PGPR, ocurre en el suelo usualmente cuando sus concentraciones son suficientes para competir con otras bacterias comúnmente establecidas en la rizósfera. La acción de estas bacterias solo puede suceder cuando su concentración alcanza valores que le permitan competir con las comunidades establecidas en la rizósfera. Por lo tanto, para la utilidad agronómica, la inoculación de plantas por microorganismos blanco en una concentración mucho más alta de la encontrada en microorganismos nativos, es necesaria para aprovechar sus características benéficas para el realce de la producción de la planta (Igal *et al.*, 2001).

Algunos microorganismos PGPR son productores de hormonas involucradas en el crecimiento vegetal, siendo las más importantes las hormonas tipo auxina y citoquinas. Por otro lado, estos microorganismos tienen la capacidad de solubilizar fosfatos presentes en el suelo, por medio de la formación de ácidos orgánicos, producidos por la degradación de carbohidratos, los cuales quelan cationes y liberan fosfatos mono y dibásicos; este proceso también puede ser llevado a cabo por la acción de fosfatasas (Sylvia, 1998). La producción de ácidos orgánicos es considerada como el mecanismo principal en la solubilización de nutrientes por las bacterias. Estos aspectos han sido corroborados por la clonación de dos genes encargados de la producción de ácido glucónico: PQQ sintasa y *gabY*. El ácido glucónico es el principal ácido orgánico producido por *Pseudomonas* sp., *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia*, *Burkholderia cepacia*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* y *Bacillus firmus*; microorganismos que producen notables cantidades de 2-ácido cetoglucónico. Otros ácidos orgánicos tales como láctico,

isovalérico, isobutírico, acético, glicólico, oxálico, malónico y succínico son producidos por diferentes PGPR (Somers *et al.*, 2005).

Otro de los mecanismos más reconocidos es el utilizado por *P. fluorescens*, la cual puede promover el crecimiento de las plantas, vía producción de sideróforos extracelulares que secuestran óxidos férricos para convertirlos en formas disponibles para las raíces, además que incrementa el volumen radical. Dichas bacterias se concentran en el rizoplasma y varían la proporción de acuerdo con los cultivos (Somers *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2005).

Un diseño alternativo es el uso de inoculantes mixtos de PSB con otros microorganismos. En este punto, algunas publicaciones sugieren una interacción sinérgica entre hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA) y PSB, los cuales permiten un mejor uso de reservorios de fósforo en el suelo. De manera similar, el crecimiento de las plantas puede incrementarse por la inoculación dual de PSB y *Azospirillum* sp. o *Azotobacter chroococcum* (Rodríguez & Fraga, 1999).

2.2.1 Producción de hormonas

Los microorganismos con efecto benéfico en la planta pueden tener un potencial considerable como agentes de biocontrol y bioinoculantes. Se distinguen tres grandes grupos: (i) microorganismos fijadores de nitrógeno, (ii) hongos formadores de micorriza, (iii) bacterias promotoras del crecimiento de plantas. En años recientes se ha caído en cierta controversia, ya que no se sabe hasta qué punto se puede considerar a una rizobacteria como PGPR (Jiménez *et al.*, 2000), por lo que se han establecido cuatro características que definen este grupo:

- Que no requieran de la invasión interna de tejidos en plantas, como ocurre en hongos micorrízicos con la formación de arbusculos o nódulos en el caso de *Rhizobium* sp.
- Que tengan una elevada densidad poblacional en la rizósfera después de su

inoculación, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo.

- Que presenten capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y, como consecuencia, puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta.
- Que no produzcan daño en el hombre ni a otros microorganismos.

En el sentido de entender mejor los efectos de diferentes maneras de aplicar inoculantes bacterianos destinados a influenciar el crecimiento de plantas y en la estructura de la comunidad rizosférica, Ciccillo y colaboradores (2002) inocularon *Burkholderia ambifaria* MCI 7 (formalmente *B. cepacia*) en rizósfera de *Geranium maculatum* mediante adhesión a semillas, determinando que cuando se aplicó como un tratamiento de semillas, *B. ambifaria* MCI 7 promovió el crecimiento de las plantas significativamente; mientras cuando se incorpora al suelo, el mismo tratamiento reduce el crecimiento de las mismas marcadamente debido a que esta aplicación disminuye la proporción de microorganismos establecidos alrededor de las semillas de *G. maculatum* y por lo tanto la cantidad de fósforo soluble.

En el estudio de cepas de *Azotobacter* sp. y de bacterias fosfato solubilizadoras (BFS) como bioinoculante mixto en un cultivo de crisantemo, realizado por Santana *et al.* (2002) se aislaron a partir del suelo bacterias pertenecientes a las especies *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas luteola*. A partir de un inóculo bacteriano en concentración de 35×10^7 UFC/ml, se observó que el inóculo de BFS y *Azotobacter chroococcum* producen un efecto positivo sobre plantas de crisantemo, por la producción la fitohormona AIA, mas no por la fijación de nitrógeno o captación de fósforo (evaluados a nivel foliar) por parte de las plantas de crisantemo. Los análisis mostraron que la acción del inoculante incrementa el contenido foliar de potasio (20%), la longitud de los tallos (16%), el peso seco final (29%) y la longitud de las raíces (17%) en las plantas evaluadas, así mismo, se observó que la producción de AIA aumenta (397 µg/ml) por la relación sinérgica entre los microorganismos usados. Los resultados experimentales indican que las respuestas en incremento de las

cosechas por la aplicación de bioinoculantes son variables e impredecibles, lo cual enfatiza la necesidad de refinamiento en la producción de los mismos, la distribución y uso de las técnicas apropiadas para su empleo.

Un grupo de microorganismos PGPR habitantes libres del suelo o desarrollados en asociación con los miembros de diversas familias vegetales, proveen nitrógeno y su actividad enzimática producen vitaminas y hormonas que estimulan el crecimiento vegetal. La producción de fitohormonas es importante debido a los efectos fisiológicos que tienen sobre el crecimiento de la planta. Las fitohormonas influyen las tasas de respiración del hospedero y la proliferación de raíces, junto con el incremento en la toma de agua y minerales por parte de las plantas inoculadas. La propiedad de producir hormonas se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de diferentes géneros de bacterias. *Azotobacter vinelandii*, *A. paspali*, *A. chroococcum*, *Acetobacter* y *Herbaspirillum* producen AIA, giberelina y citoquinina en medios libres de nitrógeno. La producción de citoquininas ha sido reportada por *A. vinelandii* y *Corynebacterium*. *Azospirillum brasilense* produce auxinas, giberelinas y citoquinina. La producción de AIA ha sido reportada por diferentes vías biosintéticas dependientes e independientes de triptófano. *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* y *A. mutants* sintetizan altas cantidades (16 µg/ml) de AIA en medios de cultivo. *A. brasilense* también produce giberelinas en medios químicos definidos. Se ha reportado la presencia de exudados radiculares de *Zea mays* que incrementan considerablemente la producción de auxinas, giberelina y citoquinina por *A. chroococcum* (Ahmad *et al.*, 2005; Mok & Mok, 2001). En la tabla 3 se mencionan las diferentes fitohormonas producidas por diversos microorganismos habitantes del suelo.

Tabla 3. Microorganismos productores de fitohormonas

Hormona de crecimiento	Microorganismo(s) productor(es)
AIA	<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Pseudomonas</i>
Giberelina	<i>Agrobacterium</i> sp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>Nocardia</i> sp., <i>Brevibacterium</i> spp., <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium</i>
Giberelina y citoquinina	<i>Arthrobacter giacomelloi</i> , <i>Azospirillum brasilense</i>
AIA, giberelina y citoquinina	<i>Azospirillum paspali</i> , <i>Azotobacter</i> spp., <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Aerobacter</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Chromobacterium</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Xanthomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> spp.

(Anwar, 2000)

Un aspecto importante incluye determinar la biodiversidad de poblaciones microbianas en la rizósfera, en 2003 Gadagi y colaboradores realizaron aportes con respecto a la diversidad de poblaciones de *Azospirillum* sp. con respecto a plantas ornamentales cultivadas en diversas regiones de la provincia de Karnataka, India. Se obtuvieron 8 cepas de *Azospirillum* aisladas de 15 diferentes familias de especies vegetales, cultivadas en diferentes regiones agroecológicas de Karnataka. Se observó que los aislamientos de *Azospirillum* sp. obtenidos a partir de raíces de *Gaillardia pulchella* poseían mejores tasas de fijación de nitrógeno (actividad confirmada por la actividad de reducción de acetileno – ARA) y se determinó que intervienen en el crecimiento vegetal de 15 familias de especies de plantas no gramíneas con altos índices de producción de sustancias promotoras del crecimiento (AIA y giberelina).

Las hormonas son factores estimulantes del desarrollo, pero este es uno de sus efectos y no su acción fundamental. En realidad, las moléculas directamente reguladoras de los procesos del desarrollo son las enzimas involucradas en el proceso. Las hormonas son mensajeras cuyo papel es actuar como intermediarios entre el estímulo (a menudo la luz o la temperatura) y la respuesta de la planta (germinación, floración, etc.) (Loredo *et al.*, 2004).

Las giberelinas, siendo la más importante el ácido giberélico (GA_3), son una larga familia de hormonas vegetales isopropenoides producidas principalmente por el hongo *Giberella fujikuroi* (Williams & Mallorca, 2001). Se sintetiza principalmente en las hojas jóvenes, en las puntas de las raíces y en las semillas en desarrollo. Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. Su biosíntesis se presenta a partir del ácido mevalónico (Vandeputte *et al.*, 2005; Williams & Mallorca, 2001). La hormona no muestra el mismo transporte fuertemente polarizado como el observado para la auxina, aunque en algunas especies existe un movimiento basipétalo en el tallo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis) (Aguirre, 2006).

Las citoquininas, son hormonas naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos; las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo, ambos sufriendo una rápida división celular. La presencia de altos niveles de citoquininas puede facilitar su habilidad de actuar como fuente demandante de nutrientes. (Davies, 1997; Mok & Mok, 2001). Sus efectos en plantas incluyen la estimulación de la germinación de semillas, la estimulación de la formación de frutas sin semillas, ruptura del letargo de semillas, inducción de la formación de brotes, mejora de la floración, alteración en el crecimiento de frutos y ruptura de la dominancia apical (Raisman, 2006).

Está comprobado que las citoquininas inducen la actividad de las amilasas y proteasas, y la síntesis de tiamina y auxina. La citoquinina es poco móvil aplicada en forma exógena, si se aplica en una yema, solo actúa en el lugar de aplicación. La citoquinina endógena parece tener transporte polar basipétalo, pero se desconocen el mecanismo y velocidad. Un efecto es producir mayor actividad en el ritmo de la mitosis celular, por lo que se le llama hormona de la división celular, así como la auxina hormona del alargamiento, esta determinación no es absoluta ya que la citoquinina promueve un poco el alargamiento. El otro efecto es el retardo del envejecimiento o senescencia de los órganos y los fenómenos a que esta da lugar

como amarillamiento y caída de las hojas, sea por acción sobre el DNA o porque la presencia de citoquinina hace afluir, por un mecanismo no conocido, auxina y nutrientes a las hojas (Somers *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que el desarrollo de inoculantes donde se incluyan microorganismos capaces de sintetizar fitohormonas a partir de compuestos del suelo o a partir de los exudados producidos por las plantas, conduce a la posibilidad de desarrollar inoculantes que al ser incorporados sobre las semillas o al suelo, incrementen la concentración de rizobacterias en la rizósfera, aumentando de este modo la probabilidad de obtener un efecto benéfico sobre el cultivo y disminuyendo los costos de aplicación. Se ha observado que la aplicación directa de estos microorganismos sobre las semillas antes de la germinación o directamente sobre el suelo, incrementa la asimilación de estas fitohormonas. La aplicación de microorganismos PGPR como *Pseudomonas* sp., *Bacillus* spp., o *Azospirillum* sp., bajo condiciones de laboratorio o en invernadero, muestra resultados muy promisorios, pero se debe tener en cuenta que este comportamiento puede tener resultados variables en condiciones de campo debido a la heterogeneidad de los factores bióticos y abióticos y la competencia con los organismos nativos. El conocimiento de estos factores puede ayudar a la determinación de concentraciones óptimas, ubicación y momento de la inoculación, así como las estrategias de manejo del suelo y el cultivo para mejorar la supervivencia y proliferación del inoculante. Esto también incluye la elección del sustrato más adecuado para soporte del microorganismo y determinación del estado fisiológico óptimo (Raisman, 2006).

2.2.2 Métodos de detección de fitohormonas

Una de las técnicas más utilizadas para la detección de AIA es mediante la reacción colorimétrica von Urk Salkowski (Salkowski, 1889). Almonacid *et al.* (1999) mediante el aislamiento de grupos microbianos a partir de una solución líquida, determinó que el uso del reactivo de Salkowski para la detección de AIA se considera una alternativa importante para obtener resultados cualitativos y semicuantitativos de la presencia de

esta fitohormona, en dicha investigación se analizaron especies de *Pseudomonas* spp., las cuales se estima pueden producir concentraciones superiores a 4.5 µg/ml de AIA.

Estudios realizados por Anwar (2000) aislaron cepas de *Azospirillum* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp. y *Azoarcus* sp. asociadas a cultivos de arroz, leguminosas y algunas plantas ornamentales. En cultivos puros los aislamientos bacterianos exhibieron altas tasas de fijación de nitrógeno (reducción de acetileno >7.6 µg/ml). Así mismo, chequeos primarios para la producción de AIA fueron realizados mediante método colorimétrico de Salkowski y HPLC (High Performance Liquid Chromatography); se encontró que las cepas de *Pseudomonas* sp. y *Azospirillum* sp. produjeron altas cantidades de AIA (por encima de 35 µg/ml) en un medio líquido con adición de triptófano y NH₄Cl. La producción se incrementó (más de 22 µg/ml) conforme se incrementaba la edad del cultivo. La producción de AIA decrece drásticamente en medios semisólidos sin adición de NH₄Cl, debido a que este puede ser utilizado para la síntesis de la fitohormona. En este caso ninguna de las cepas analizadas de *Enterobacter* y *Azotobacter* produjo AIA o ácido giberélico (AG). En análisis posteriores se determinó una alta producción de AG por parte de *Azospirillum* (10 µg/ml), la cual decrecía en estados tardíos de crecimiento. La disminución de la producción de AG puede deberse a su hidrólisis por parte del mismo microorganismo. También se determinó por HPLC que las cepas de *Azoarcus* y *Azospirillum* produjeron indol acetamida. Mediante mediciones llevadas a cabo en invernadero se determinó que el incremento en la biomasa vegetal se debía a la producción de fitohormonas (AIA y giberelina) por parte de PGPR. Dichas hormonas fueron extraídas y analizadas individualmente y se encontró que AIA en concentraciones en rangos de 1-2 µg/ml incrementaba la longitud de las raíces, pero principalmente la biomasa en plántulas de arroz; las hormonas de crecimiento contenidas en extractos de *Pseudomonas* incrementaban la longitud radicular, la longitud de las raíces; mientras que en la administración de hormonas de crecimiento contenidas en extractos de *Azospirillum* se marcaba más fuertemente el incremento en la biomasa vegetal (Anwar, 2000; Mok & Mok, 2001; Somers *et al.*, 2005).

En estudios llevados a cabo por Mehnaz y colaboradores (2001) aislaron rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal pertenecientes a los géneros *Enterobacter cloacae* y *Aeromonas veronii* a partir de cultivos de arroz (variedad NIAB IRRI-9) y observaron el efecto de dichos microorganismos en dos variedades de arroz Basmati. Se obtuvieron cuatro aislamientos a partir de raíces de arroz y fueron mantenidas en cultivos puros en los cuales produjeron la fitohormona ácido indol acético (AIA). A partir de estos, tres aislamientos redujeron acetileno a etileno en medio de sales mínimas. A partir de características morfológicas, fisiológicas y genéticas (secuencia del rRNA 16S) se determinó que estos microorganismos pertenecían al género y especie *Enterobacter cloacae*, mientras que las bacterias no fijadoras de nitrógeno pertenecían al género *Aeromonas veronii*.

Hasta la fecha sólo unos cuantos diferentes métodos de inoculación son empleados. El más simple y económico método de bioinoculación es la aplicación de las bacterias en caldos líquidos a base de agua o aceite o la peletización de las semillas (Loredo *et al.*, 2004).

2.2.3 *Burkholderia cepacia*

La producción de sustancias estimuladoras del crecimiento es otra de las propiedades detectadas por las bacterias del género *Burkholderia* sp. y dentro de sus principales ventajas se encuentra el estímulo del crecimiento apical, la solubilización de fósforo, la producción de enzimas catalíticas y de sustancias estimuladoras de tipo hormonal como auxinas, giberelinas y citoquininas pero también producen sustancias de otro tipo, como aminoácidos y promotores específicos del crecimiento (Richardson *et al.*, 2002).

Burkholderia cepacia y *Aeromonas hydrophyla* son dos bacterias bacilares gram negativas aisladas a partir de un bioinoculante no comercial utilizado como acondicionador del suelo de un cultivo comercial de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) y caracterizadas por López *et al.* (2006) mediante el uso de Kits API20 NE

Biomerieux® determinando la presencia de *Burkholderia cepacia* con un índice de correlación de 99.5% y *Aeromonas hydrophyla* con un índice de correlación de 99.9%.

Burkholderia cepacia es una bacteria muy atractiva y de considerable atención por su versatilidad genética, apareciendo como patógeno de plantas, saprofítico, biorremediador y agente de biocontrol en cultivos de interés agrícola. Entre sus mecanismos de acción se destacan el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta, la producción de fitohormonas y el biocontrol de patógenos (Rives *et al.*, 2004). Es una proteobacteria que se ha caracterizado por ser un efectivo controlador biológico, promotor de crecimiento vegetal; juega un papel importante en la descontaminación del suelo y aguas subterráneas, razón por la cual se le ha considerado como una buena alternativa en la biorremediación de suelos contaminados con pesticidas; se ha determinado su alta afinidad por la asociación a las rizósfera de plantas y árboles (Ramette, 2005). De igual forma, autores como Richardson *et al.*, (2002) han reportado a esta bacteria como un microorganismo capaz de fijar nitrógeno y solubilizar fosfato.

Rives *et al.*, (2004) demostraron que cepas de *Burkholderia* spp. existen como rizobacterias capaces de producir metabolitos de interés agronómico, donde se incluye ácido salicílico, sideróforos y fitohormonas. En este marco se incluye el ácido 3-indol acético, la fitohormona más estudiada y de la cual, se reconoce, posee un rol importante en el crecimiento vegetal. El objeto de su estudio fue caracterizar rizobacterias asociadas a un cultivo de maíz en términos de producción de AIA, sideróforos y ácido salicílico. Utilizaron como controles cepas de *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* previamente aisladas a partir de la rizósfera de un cultivo de maíz variedad francisco. Mediante técnicas colorimétricas y cromatográficas se analizó la producción de metabolitos analizando la mayor producción de los mismos por medio de un análisis conglomerado jerárquico para seleccionar los microorganismos con mayor producción. Demostraron que todas las cepas utilizadas produjeron AIA, sideróforos y ácido salicílico. Señalando que las cepas de

Burkholderia cepacia MBf21, MBp1, MBp2, MBf22, MBp3, MBf20, MBf15 y *Pseudomonas fluorescens* MPp4 mostraron la mayor cantidad de metabolitos producidos (19-22µg/ml), mostrando de esta manera que dichas cepas pueden ser usadas en la promoción del crecimiento vegetal de diversos cultivos.

Burkholderia cepacia forma complejos bacterianos (Bcc –*Burkholderia cepacia* complex) los cuales son constituidos por diversas especies muy relacionadas y extremadamente versátiles encontradas como habitantes libres del suelo, en agua y en la rizósfera de diversas plantas. Hay cepas que han sido utilizadas para el control de enfermedades en plantas y bioremediación, mientras que algunas se catalogan como fitopatógenas (aunque no se han catalogado como fitopatógenos en flores) o patógenas oportunistas de humanos con fibrosis quística. Las especies originales de *B. cepacia* se han dividido en ocho especies genéticas (genovares), sobre las cuales se han determinado diferencias genéticas, pero no se han establecido distinciones taxonómicas entre las cepas biocontroladoras de las patógenas de humanos. Parker y Gurian-Sherman (2001) realizaron análisis de cepas utilizadas como biocontroladoras y encontraron que el 35% de estas eran potencialmente patógenas de humanos y plantas, lo cual representa un riesgo para aquellas cepas utilizadas en agricultura y registradas por el gobierno de los Estados Unidos por medio de la Agencia para la Protección Ambiental (EPA – Environmental Protection Agency). Así mismo destacaron la acción de los Bcc en torno a la producción de la fitohormona AIA (cantidades relativas de 12 µg/ml) y la acidificación del pH del medio mediante la acción hidrolítica sobre ácidos orgánicos, lo cual puede ejercer una acción benéfica sobre las plantas ya que provee cantidades considerables de AIA y solubilización de sustratos en la rizósfera.

Igual, se han realizado estudios para analizar la diversidad genética de *Burkholderia cepacia*, con respecto a su relación con el sistema radicular de *Zea mays*, donde representa un 4% de las rizobacterias totales cultivables (Hebbar *et al.*, 1994). Así mismo, se ha destacado la acción de *B. cepacia* como PGPR (Hebbar *et al.*, 1994; Tabachioni *et al.*, 1993) y como antagonista y represor de patógenos del suelo, como

aquellos pertenecientes al género *Fusarium* sp., por medio de un mecanismo de antibiosis que desintegra el micelio del patógeno impidiendo su proliferación (Défago & Hass, 1990; Ezziyani *et al.*, 2004). Como se mencionó anteriormente, *B. cepacia* puede actuar como patógeno oportunista de humanos con fibrosis quística, aunque se ha demostrado que en algunos casos existen diferencias entre los aislamientos ambientales y clínicos, lo cual debe proveer precauciones sobre riesgos asociados a los aislamientos a partir de rizósfera (Tabachioni *et al.*, 1993).

Halda-Alija (2003) señaló que la producción de ácido indol 3-acético (IAA), es una herramienta fisiológica clave en agricultura; su estudio sobre bacterias anaerobias facultativas asociadas a la planta macrófita *Juncus effusus* L señaló que la asociación entre los aislamientos analizados interviene fuertemente en la producción de AIA. Más del 74% de las rizobacterias aisladas pertenecieron a las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Aeromonadaceae, Burkholderiaceae y Bacillaceae, las cuales fueron probadas en cuanto a su producción de AIA mediante HLPC y determinación colorimétrica de Salkowski. Se observó que el número de bacterias productoras de AIA disminuía en invierno y se observó que la fitohormona era producida incluso cuando su precursor, L-triptófano, no se encontraba en el medio.

Por otra parte, Falcao *et al.*, (2004), han reportado la importancia de *Burkholderia cepacia* en suelos por su facilidad de asociarse a las raíces de diversas plantas, también se ha reportado que dependiendo de la planta a la cual se asocie difiere su concentración poblacional activando una diversidad y cantidad de metabolitos que contribuyen al crecimiento de la planta.

2.2.4 Levaduras

Entre los microorganismos del suelo, las levaduras han recibido muy poca atención como agentes biocontroladores de patógenos del suelo y potenciales PGPR, en comparación a bacterias, actinomicetes y hongos filamentosos. Varios taxa de levaduras se han registrado como endófitos en plantas, con una proporción pequeña

registrada como promotores del crecimiento vegetal. La habilidad de ciertas levaduras como *Saccaromyces* spp. y *Candida* sp., para producir antibióticos, enzimas quitinolíticas y reguladores del crecimiento vegetal (auxinas y giberelinas), indica que pueden utilizarse potencialmente como biocontroladores y PGPR (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006). A pesar que estos microorganismos son muy ubicuos, en ecosistemas de suelo se han encontrado principalmente en la zona del filoplano; al parecer las sustancias antimicrobianas excretadas por las raíces de las plantas (exudados) afectan la pared celular de las levaduras y por lo tanto dificultan su crecimiento a nivel de rizósfera (Mc Cormack et.al, 1994)

López *et al.* (2006) determinaron mediante el sistema API 20 AUX Biomerieux ® la presencia de las especies de levaduras *Candida albicans*, *Criptococcus neoformans* y *Criptococcus laurentii* (con un índice de correlación de 97%) en el bioinoculante Microagro.

Ellis *et al.*, (1999), ha reportado el uso de levaduras como *Criptococcus neoformans* y *Criptococcus laurentii* en procesos de degradación de materia orgánica, encontrándose en material vegetal en descomposición. Se presume que dichos microorganismos podrían producir sustancias como fitohormonas, en acción relacionada con el mejoramiento de las condiciones del suelo mediante la solubilización de compuestos del suelo, mas no como un microorganismo que potencialmente promueva el crecimiento vegetal (Ellis *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004).

2.2.5 Lactobacillus

Las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico a partir de azúcares y otros carbohidratos desarrollados por bacterias fotosintéticas y levaduras. Desde tiempos antiguos, muchos alimentos y bebidas como el yogurt y los pepinillos son producidos usando bacterias ácido lácticas. Sin embargo, el ácido láctico es un compuesto altamente esterilizante que suprime microorganismos nocivos y mejora la descomposición de la materia orgánica (Fenster *et al.*, 2003). Además las bacterias

ácido lácticas promueven la fermentación y descomposición de materiales como lignina y celulosa, eliminando así los efectos indeseables de la materia orgánica no descompuesta, su efecto como PGPR radica en los aspectos ya nombrados, mas no se ha reportado que produzca fitohormonas como auxinas, citoquininas o giberelinas, aunque se dice que su presencia en sustratos agrícolas puede intervenir en la acción de otros microorganismos como *Pseudomonas* sp. y *Azospirillum* sp. (Raves *et al.*, 2004).

Las bacterias ácido lácticas tienen la habilidad de suprimir microorganismos por la producción de sustancias antibacteriales tipo bacteriocinas por ejemplo: nistatina, sustancias antimicrobianas como, ácidos orgánicos y sustancias antifúngicas como ácido-3-fenilacético (Lowe y Arendt, 2004; Ström, 2005). Bajo circunstancias normales, las especies como *Fusarium* debilitan las plantas cultivadas, exponiéndolas a enfermedades y a poblaciones crecientes de plagas como los nemátodos. El uso de bacterias ácido lácticas reduce las poblaciones de nemátodos y controla la propagación y diseminación de *Fusarium* sp., mejorando así el medio ambiente para el crecimiento de cultivos (Ström, 2005).

López *et al.* (2006) determinaron mediante el kit de identificación API AUX 50 CHL Biomerieux® al microorganismo *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* con un índice de correlación de 99.3%, este microorganismo fue la única bacteria ácido láctica aislada apartir de Microagro y concordando con las observaciones realizadas con Ström (2005), se describe como una bacteria Gram positiva, en forma bacilar, no esporulada, aerotolerante y produce ácido láctico como el mayor producto de su fermentación a partir de carbohidratos. Se ha reportado que su mayor acción como PGPR se debe a la producción de bacteriocinas que inhiben el crecimiento de bacterias fitopatógenas (Lowe y Arendt, 2004).

2.2.6 Otros microorganismos productores de fitohormonas

Algunos miembros de Enterobacteriaceae han sido aislados a partir de la rizósfera de cultivos como trigo, sorgo y maíz. De igual manera especies de *Beijerinckia* han sido reportadas a partir de regiones tropicales y subtropicales. Cepas de *Azotobacter* sp. y *Klebsiella* sp. han sido aisladas a partir de pastizales y raíces de *Paspalum notatum*. *Acetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum seropedicae*, fueron aislados a partir de caña de azúcar y clavel. Otros microorganismos tales como *Azotobacter*, *Bacillus* spp., *Campylobacter*, *Caulobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella*, han sido catalogadas como PGPR, debido a su habilidad para fijar nitrógeno atmosférico y producir fitohormonas como ácido giberélico y ácido indol acético (Anwar, 2000; Vandeputte *et al.*, 2005).

2.2.7 Auxinas

Estas hormonas son un grupo de compuestos que estimulan la elongación de la planta. El ácido indolacético (AIA) es una auxina que realiza una acción directa sobre la elongación y es la forma predominante, sin embargo, evidencia reciente sugiere que existen otras auxinas indólicas naturales en plantas. Su acción principal radica en determinar el crecimiento de la planta y favorecer la maduración del fruto (en el caso del AIA) y el proceso de enraizamiento (ácido indol butírico – AIB). Las auxinas se sintetizan principalmente en el ápice del tallo, en las yemas, ramas jóvenes y en general en los meristemas a partir del aminoácido triptófano. Ayudan a que los tallos débiles se desarrollen y que se formen raíces adicionales de soporte para complementar el sistema radicular (Salisbury, 1994; Somers *et al.*, 2005). El ácido indolil-3-acético (AIA) es sintetizado en la planta a partir de L-triptófano, el cual puede estar libre o formando parte de proteínas. Por acción de una transaminasa se transforma en ácido indolpirúvico el cual se descarboxila por acción de una descarboxilasa formándose indol-acetaldehído. Luego actúa una oxidasa que lo transforma en ácido indol acético. Existen otras vías de síntesis que conducen al compuesto mediante la formación intermedia de triptamina, o bien mediante un

intermediario nitrílico. El AIA se puede transformar en ácido indol butírico por acción de una sintasa (Bialek *et al.*, 1992).

Una característica sorprendente de la auxina es la fuerte polaridad exhibida en su transporte a través de la planta. La auxina es transportada por medio de un mecanismo dependiente de energía, alejándose en forma basipétala desde el punto apical de la planta hacia su base. Este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical. El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del pecíolo parece también prevenir la abscisión (Raisman, 2006).

La auxina ha sido implicada en la regulación de diferentes procesos fisiológicos, entre los que se incluye promoción del crecimiento y diferenciación celular, y por lo tanto en el crecimiento en longitud de la planta; estimulación del crecimiento y maduración de frutas, floración, senectud, geotropismo; la auxina se dirige a la zona oscura de la planta, produciendo que las células de esa zona crezcan más que las correspondientes células que se encuentran en la zona clara de la planta; retardar la caída de hojas, flores y frutos jóvenes; y dominancia apical (Aguirre, 2006).

El efecto inicial preciso de la hormona que subsecuentemente regula este arreglo diverso de eventos fisiológicos no es aún conocido. Durante la elongación celular inducida por la auxina se piensa que actúa por medio de un efecto rápido sobre el mecanismo de la bomba de protones ATPasa en la membrana plasmática, y un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas (Raisman, 2006).

Por otra parte, las aplicaciones de auxinas deben realizarse de manera metódica, ya que se ha observado que un exceso en la aplicación de auxinas como AIA o AIB, pueden producir efectos tóxicos o inhibitorios frenando el desarrollo de nuevas raíces, presentando un efecto negativo sobre el crecimiento de ápices caulinares y coleóptilos (Anwar, 2000; Lee *et al.*, 2004, Aguirre, 2006).

2.2.7.1 Ácido Indol Acético (AIA)

El Ácido Indol 3-Acético (AIA) es una auxina catalogada como una fitohormona, y así mismo, es la auxina más activa. Se considera una heteroauxina con fórmula molecular $C_{10}H_9NO_2$ y masa molecular de 175.19 Da (figura 1). El AIA estimula el crecimiento vegetal, observándose mediante el incremento de biomasa, altura de los tallos, crecimiento del vástago principal (dominancia apical) y reduce el crecimiento de ramas laterales (Koshiba, 1993).

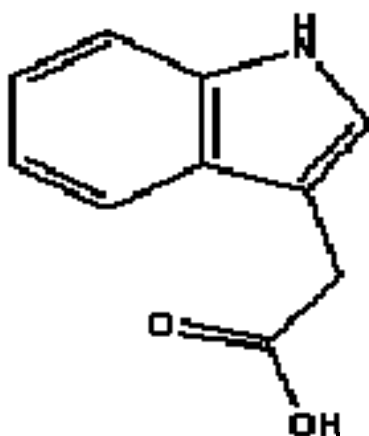


Figura 1. Ácido Indol 3-acético (Koshiba *et al.*, 1996)

Se piensa que el ácido Indol 3-Acético (AIA) es sintetizado a partir del triptófano. Sin embargo, existe un debate considerable acerca del o de los intermediarios necesarios para su síntesis. Se ha propuesto que compuestos como el ácido indol 3-pirúvico, triptamina, indol 3-acetaldoxima, indol 3-acetamida, indol 3-acetonitrilo o el indol 3-acetaldehído pueden funcionar como intermediarios en la síntesis de AIA (Figura 2). Estudios realizados en frijol con marcadores radioactivos sugieren que el AIA es sintetizado a partir del triptófano (Bialek *et al.*, 1992).

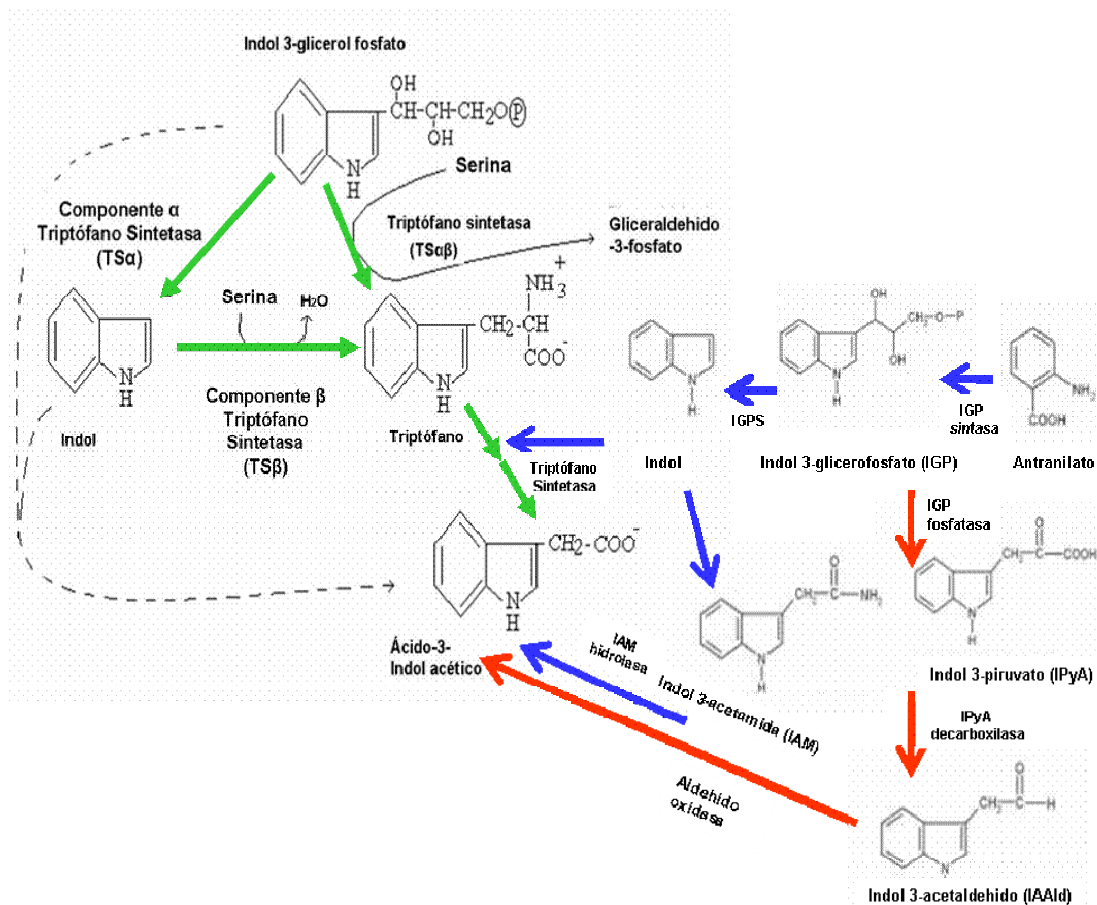


Figura 2. Rutas biosintéticas para la producción de AIA (Prinsen *et al.*, 1993; Anwar, 2000; Somers *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2005; Gadagi *et al.*, 2003; Hadja-Alija, 2003)

Koshiba and Matsuyama (1993) han demostrado que extractos de coleóptilo de maíz, el triptófano puede ser metabolizado en AIA. La reacción parece proceder vía indol 3-acetaldehído como intermediario. Así, se purificó una actividad formadora de AIA (usando triptófano como sustrato y requiriendo una ascorbato peroxidasa citosólica) y encontrado para co-purificar con la actividad de una indol 3-acetaldehído oxidasa. Esta enzima ha sido purificada a partir de coleóptilos de maíz y es una aldehído oxidasa que contiene flavina y molibdeno (Koshiba *et al.*, 1996).

Un pericarpo mutante desarrollado por Wright *et al.* (1991), y catalogado como triptófano auxótrofo, resultó de la mutación inespecífica de la triptófano sintetasa. Se observó que las líneas de semillas acumulaban indol, obteniendo niveles 50

veces más altos que aquellos obtenidos con las semillas nativas. Las plántulas mutantes incorporaban precursores de AIA marcados radioactivamente (donde se incluyó ^{15}N -anthranilato, pero no triptófano), sugiriendo así, que existen vías alternativas para la producción de AIA que no utilizan triptófano como precursor (Wright *et al.*, 1991).

Vías biosintéticas alternativas (independientes a triptófano) han sido propuestas para cultivos como zanahoria y flores, basados en marcaje con isótopos con óxido de deuterio, ^{15}N -indol y triptófano marcado con deuterio (Michalczuk *et al.*, 1992).

Entre los microorganismos que han sido reportado como productores de altas concentraciones de AIA se encuentran *Azospirillum brasilense* (20-40 $\mu\text{g/ml}$), *Azospirillum lipoferum* (16-32 $\mu\text{g/ml}$), *Rhizobium* sp. (22 $\mu\text{g/ml}$), *Xanthomonas* sp. (20 $\mu\text{g/ml}$), *Pseudomonas* spp. (20-65 $\mu\text{g/ml}$), *Azospirillum paspali* (35 $\mu\text{g/ml}$), *Azotobacter* spp. (>22 $\mu\text{g/ml}$), *Acinetobacter* sp. (3-18 $\mu\text{g/ml}$), *Aerobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Arthrobacter* spp., *Bacillus* spp. (30-40 $\mu\text{g/ml}$), *Chromobacterium* spp., *Corynebacterium* spp., y *Flavobacterium* spp (Anwar, 2000; Oberhansli *et al.*, 1991; Rives *et al.*, 2004; Somers *et al.*, 2005; Vandeputte *et al.*, 2005).

2.3 Crisantemo

2.3.1 Taxonomía y morfología

La especie *Dendrathera grandiflora* (*Chrysanthemum morifolium*) pertenece a la familia Asteraceae y engloba flores de las más antiguas cultivadas. Las hojas pueden ser lobuladas o dentadas, ligulosas o rugosas, de color variable entre el verde claro y oscuro, recubiertas de un polvillo blanquecino que le da un aspecto grisáceo y casi siempre aromáticas (Stace, 2003).

Lo que se conoce como flor es realmente una inflorescencia en capítulo. Existen diversos tipos de capítulo cultivados comercialmente, aunque, en general, esta inflorescencia está formada por dos tipos de flores: femeninas y hermafroditas. El receptáculo es plano o convexo y está rodeado de una envoltura de brácteas. La

forma de las inflorescencias los puede clasificar como sencillas, anémonas, recurvadas, reflejas, hirsuta, pompones o decorativas (Vidiale, 1983).

Actualmente la mejora para la obtención de híbridos comerciales se basa tanto en la forma y en el color como en su adaptación para la producción de flores durante todo el año, incidiendo siempre en la calidad agronómica del producto.

2.3.2 Propagación

La propagación se realiza por esquejes terminales que se obtienen de plantas madre seleccionadas por su conformación a la progenie, capacidad de cosecha y vigor mantenidas bajo condiciones de día largo para inhibir la formación de botones finales. Los esquejes terminales de 3-4 cm de longitud pueden colocarse directamente en el medio para enraizamiento o almacenarse a 0-3°C durante unas seis semanas, en cajas de cartón forradas con polietileno para evitar la deshidratación. Debe aplicarse un fungicida de amplio espectro para prevenir el desarrollo de enfermedades (Vidiale, 1983). En enraizamiento los extremos basales de los esquejes se sumergen en ácido indolbutírico (AIB) con adiciones de urea y suplementos químicos de elementos nutricionales al sustrato con cascarilla.

En cultivos de flores en Colombia la multiplicación vegetativa es el método más usado en cultivos de ornamentales, papa, frutas, entre otros. Se realiza mediante el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Se aplica *in vivo*. Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, idénticas a la del ápice del tallo, se aíslan sobre un medio nutritivo, realizándose los repicados cinados. Cuando se obtiene un número suficientemente grande de vástagos, estos son enraizados y finalmente se realiza transferencia al suelo. El aislamiento de yemas y ápices del vástago, es una técnica, donde en principio no se añaden citoquininas para evitar la dominancia apical (ICA, 1997).

En esta instancia es necesario evaluar el tipo de sustratos utilizados para incrementar la altura de los vástagos y la producción de biomasa. Para esto se emplea el ácido indolbutírico (tipo de cama de enraizamiento), sustrato fuente (compost, cascarilla y

suelo) y el esqueje de la planta madre. Con esto se obtiene que los vástagos puedan propagarse por esquejes de material juvenil provenientes de rebrotes, además que la respuesta de enraizamiento aumenta a medida que la concentración de AIB alcanza hasta 1%, y así mismo disminuye cuando alcanza una concentración de 2%. Sin embargo, en cuanto al substrato solo se evidencian diferencias en cuanto al número de raíces producidas, siendo la cascarilla el más favorable, debido a su pH (Hartmann & Kester 1998).

Las auxinas actúan directamente sobre la pared celular haciendo que la plasticidad de la misma aumente y se ensanche debido a la turgencia que se provoca por la entrada de agua a través de la vacuola. Las auxinas crean movimientos de iones hidrógeno desde la célula a la pared, dando como resultado una disminución del pH en la pared (acidez) lo cual activa la actividad enzimática que rompe los enlaces cruzados de las cadenas de celulosa. Las auxinas en concentraciones bajas promueven el crecimiento de las raíces, pero cuando los niveles de éstas aumentan, logran inhibir el crecimiento de las raíces primarias, llegando algunas veces a favorecer la aparición de raíces secundarias. Debido a que favorecen el crecimiento y desarrollo de raíces adventicias son empleadas industrialmente para la formación de raíces en esquejes (Vidiale, 1983; Hartmann & Kester, 1998).

El trasplante puede llevarse a cabo a los 10-20 días, dependiendo de la variedad y de la temporada. Para garantizar que las plantas estén turgentes y tengan una reserva antes de arraigar, se aplica un riego con fertilizantes complejos en vísperas a la plantación.

Para el aumento de la longitud del tallo pueden emplearse giberelinas, en forma de giberelato potásico, a concentraciones de 10, 50 a 60 $\mu\text{g/ml}$, de 1 a 3 días después de la plantación, repitiendo la aplicación durante tres semanas después. Para alargar el pedúnculo de los pompones, se pulveriza ácido giberélico en la parte superior de la planta, hasta el punto de saturación, 4 semanas después del inicio de los días cortos. Si se sobrepasan las 4 semanas, pueden producirse inflorescencias débiles, siendo el

tratamiento más efectivo durante períodos de alta energía radiante (Salinger, 1991). Para inducir la formación de raíz, la hormona más utilizada es el ácido indolbutílico (AIB) mezclado con talco (1000-2000 µg de AIB/g de talco) al 0,1-0,2%. La iniciación floral puede inhibirse con la aplicación de etileno (3-4 µg/ml) (Salinger, 1991; Agrios, 2004; Schuster, 2000).

2.3.3 Enfermedades del crisantemo

La sintomatología de cualquier anomalía en el desarrollo debe ser correctamente diagnosticada, ya que es frecuente que diversas causas, produzcan síntomas similares, ya sean agentes patógenos, plagas, deficiencias o toxicidades (Vidiale, 1983). El crisantemo es una especie muy susceptible al ataque de diversos patógenos, en la Tabla 4 se muestran los más importantes para este cultivo encontradas en Colombia.

Tabla 4. Plagas y Enfermedades en crisantemo

Enfermedad	Agente Causal	Síntomas
Larva del follaje	<i>Linomyza trifolii</i>	Minas serpenteantes en follaje.
Agallas por nemátodos	<i>Aphenlencoides ritzemabosi</i>	Lesiones angulares color verde oscuro a café en hojas
Pudrición de la raíz	<i>Pythium</i> sp.	Sistema radicular débil, damping off
Pudrición del tallo	<i>Rhizoctonia solani</i>	Plantas marchitas, crecimiento restringido
Verticilosis	<i>Verticillium</i> spp.	Estrés hídrico, raquitismo, clorosis; generalmente la sintomatología se da de un solo lado de la planta
Moho gris	<i>Botrytis cinerea</i>	Flores presentan mancha gris-marrón
Esclerosis	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Esclerocios en tallo y hojas, descomposición del tallo
Roya	<i>Puccinia chrysanthemi</i>	Pústulas pardo-rojizas en envez de hojas
Tizón rayado	<i>Stemphylium</i> sp. y <i>Alternaria</i> sp.	Lesiones necróticas en nervaduras de los pétalos
Tizón bacteriano	<i>Erwinia chrysantemi</i> (<i>Pantoea</i>)	Manchas grises en hojas,

	<i>chrysanthemi</i>)	marchitamiento, médula gelatinosa
Tumores	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Agallas en el tallo, tumores en raíces, damping off
Mancha foliar bacteriana	<i>Pseudomonas cichorii</i> (<i>Ralstonia cichorii</i>)	Puntos circulares-elípticos que forman lesiones en hojas
Pudrición del tallo	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Pudrición blanda en el tallo, necrosis de tejidos parenquimáticos

(Agrios, 2004; Asocolflores, 1995; Schuster, 2000)

3. JUSTIFICACION

El crisantemo es un cultivo muy exigente en nutrientes especialmente en nitrógeno, potasio y fósforo (Vidiale, 1983). Durante el período de enraizamiento, es muy importante el suministro de fitohormonas como las auxinas, con el fin de estimular la producción de raíces y la longitud de los tallos y, de esta manera, obtener flores y plantas de calidad, debido a que el establecimiento de estas primeras raíces proveerá la estabilidad en el suelo y una mayor capacidad de absorción de nutrientes. En este aspecto se destaca la acción de los bioinoculantes, los cuales al ser aplicados artificialmente son capaces de incrementar las poblaciones microbianas del suelo, colocando a disposición de las plantas fitohormonas que promoverán su desarrollo (Ahmad *et al.*, 2005). La aplicación de un inóculo puede ayudar a disminuir la aplicación de fertilizantes químicos y, de esta manera, contribuir a reducir los costos de fertilización en los cultivos de crisantemo.

La fitohormona más resaltada en la literatura, es el ácido indol acético (AIA), el cual existe en raíces y su administración promueve la elongación de secciones escindidas o aún de raíces intactas de muchas especies (Deleito *et al.*, 2005). *Burkholderia cepacia* es productor de AIA, al igual que proporciona fósforo asimilable que favorece el óptimo desarrollo de las plantas (Anwar, 2000). Y dado que este microorganismo, junto con otros, ha sido aislado del bioinoculante Microagro, la presente investigación pretende analizar la capacidad metabólica de las cepas *B. cepacia*, junto con *Aeromonas hydrophyla*, *Lactobacillus paracaseii* y *Cryptococcus laurentii*, en cuanto a la producción de AIA y, así mismo, el efecto que estos ejercen sobre el proceso de enraizamiento de esquejes de crisantemo.

La utilización de este tipo de bioinoculante puede ayudar a reducir la aplicación de fertilizantes químicos que producen un grave impacto ambiental en el suelo; al igual que ayuda a disminuir los costos de fertilización porque una vez establecidos los microorganismos en el suelo, su efecto se observará durante más tiempo, mientras que los fertilizantes químicos se lixivian y pierden su efecto.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- ◆ Evaluar la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono) en período de enraizamiento.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de grupos funcionales microbianos (solubilizadores de fosfato, fijadores libres de nitrógeno, productores de sideróforos) en el bioinoculante no comercial, Microagro.
- Evaluar producción de ácido indol acético (AIA) a partir de aislamientos microbianos, de manera individual y en cultivo mixto.
- Evaluar en etapa de enraizamiento de crisantemo, el efecto del bioinoculante y compararlo con la hormona Ácido Indol 3-Butírico (AIB), utilizada para enraizamiento de esquejes.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Localización

La fase experimental de laboratorio se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Pontificia Universidad Javeriana sede Bogotá.

Las muestras de bioinoculante fueron suministradas por la empresa Cultivos del Norte ubicada en Tocancipá, Cundinamarca, donde igualmente fue realizado el montaje del ensayo de enraizamiento.

5.2 Evaluación de grupos microbianos presentes en el bioinoculante (MICROAGRO)

5.2.1 Toma de muestras

Las muestras se tomaron a partir de los tanques de almacenamiento del producto, Microagro (Figura 3) (Cultivos del Norte, 2005). Cada muestra constituida de 150ml, fueron tomadas a partir del tanque que estuviese listo para ser aplicado en el cultivo de crisantemo sumergiendo frascos de vidrio estériles hasta aproximadamente la mitad del tanque con ayuda de instrumentos facilitados por Cultivos del Norte. Los frascos fueron sellados, etiquetados y almacenados en nevera a 4°C durante 24 horas hasta el momento de su análisis.



Figura 3. Tanques de almacenamiento del Bioinoculante (Fuente: el autor)

5.2.2 Aislamiento de grupos funcionales microbianos presentes

Siguiendo la metodología de recuento en placa se tomaron 10 ml del producto, los cuales fueron adicionados en 90 ml de agua peptonada (0.85%p/v) estéril, tomando esta como la dilución 10^{-1} , a partir de esto se realizaron diluciones seriadas posteriores hasta el factor 10^{-8} . De las diluciones 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} , se tomó 0.1 ml para sembrarlo en cajas de petri estériles con los medios King B para el aislamiento de *Pseudomonas* sp. y observar la producción de sideróforos (anexo 1) (King *et al.*, 1954). Así mismo se hizo aislamiento de fijadores libres de nitrógeno en medio Ashby (anexo 1) (Fenglerowa, 1965) y fosfato solubilizadoras en SMRS1 (anexo 1) (Sindara y Rau, 1945); recuento de aerobios totales en SPC (standard plate count, anexo 1) (Escobar, 2002) y bacterias ácido lácticas bajo condiciones anaerobias en MRS (anexo 1) (de Man, Rogosa y Sharpe, 1960), estos medios se incubaron por 48 horas a 37°C.

También se empleó PDA (papa dextrosa agar, anexo 1) para el aislamiento de hongos hialinos y dematiáceos (Beever & Bollard, 1970), extracto de malta para el aislamiento de levaduras y hongos hialinos (anexo 1) (Rapp, 1974), incubando por 48 horas a 28°C.

Se realizaron 3 repeticiones para cada una de las diluciones sembradas sobre los medios de cultivo anteriormente mencionados (Almonacid *et al.* 1999). Los grupos microbianos analizados fueron seleccionados de acuerdo con la información suministrada por López *et al.* (2006), la compañía Cultivos del Norte y por ser reportados en la literatura como potenciales PGPR (López *et al.*, 2006; Anwar, 2000; Loredó *et al.*, 2004).

5.3 Determinación de la producción de AIA

5.3.1 Curva patrón de ácido 3-indol acético (AIA)

La curva patrón se diseñó a partir de diferentes concentraciones de ácido indol acético Sigma®. Para esto se determinó la absorbancia a 530 nm de los patrones tras haberse sometido a la reacción de Salkowski (Salkowski, 1889). Los patrones que

comprenden concentraciones de: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, y 60 $\mu\text{g/ml}$; dado que dentro de este rango se encuentran los valores promedio de producción de AIA reportados (Anwar, 2000; Ahmad *et al.*, 2005).

Dichas concentraciones se obtuvieron a partir de los patrones de 100 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$ de AIA obtenidos sobre agua destilada; y diluidos hasta un volumen final de 1 ml, de la siguiente manera:

Tabla 5. Soluciones para curva patrón

[$\mu\text{g/ml}$]	100 $\mu\text{g/ml}$ [μl]	Agua destilada [μl]
0	0	1000
2	20	980
4	40	960
6	60	940
8	80	920
10	100	900
15	150	850
20	200	800
30	300	700
40	400	600
50	500	500
60	600	400

Una vez preparados los patrones y el reactivo, se transfirió 1 ml de cada uno de los mismos a un tubo de vidrio de 13x100 y se adicionaron 4 ml de reactivo de Salkowski (anexo 2), se agitó la solución y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos (Bric *et al.*, 1991).

Se leyeron los resultados y se registraon los valores de absorbancia a 530 nm (Bric *et al.*, 1991) en un espectrofotómetro Spectronic GENESYS 10 UV ® y con los resultados se construyó una gráfica de Absorbancia (530 nm) vs. Concentración, sobre la cual se calculó la ecuación de la recta y valor de r^2 mediante el uso de la hoja de cálculo excel, Microsoft Office 2006 ®. Utilizando como blanco una solución de

agua destilada sin adición de patrón de AIA realizando la lectura por triplicado. Se calculó el promedio de las tres repeticiones y se realizó la regresión lineal determinando la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación lineal, el cual debe ser mayor de 0.9 ya que se considera así una correlación ideal entre los datos (Mesa, 1999).

5.3.2 Determinación de la concentración de AIA

Se utilizaron 4 cepas aisladas por López *et al.* (2006) a partir del bioinoculante, un control positivo (*Azotobacter vinelandii* ATCC 12518) (Wong *et al.*, 1995) y un control negativo (*Salmonella enteritidis* ATCC 13221) (Windsor y Ashford, 2006). Cada una de las cepas se sembró en agar tripticasa soya y se incubó a 32 °C durante 48 horas. Una vez se obtuvo crecimiento masivo en las cajas, se confirmó la pureza de las cepas y se realizó una suspensión sobre solución salina al 0.85%, haciendo mediciones de absorbancia a 540 nm para medir turbidez hasta una absorbancia de 0.200; suponiendo así una concentración celular aproximada de 10^8 células/ml (Almonacid *et al.*, 1999). De esta suspensión, se utilizaron 10 ml, los cuales fueron diluidos sobre 90 ml de caldo tripticasa soya, obteniendo una concentración aproximada de 10^7 células/ml.

Se sembró por triplicado en erlenmeyers de 125 ml, con 3 repeticiones para cada uno de los microorganismos a evaluar y un inóculo mixto de los aislamientos del bioinoculante. El inóculo mixto también fue evaluado sobre el medio sugerido por López *et al.* (2006), para la producción del bioinoculante. En cada erlenmeyer se colocaron 54 ml de caldo tripticasa soya estéril y se adicionaron 6 ml de las suspensiones bacterianas ajustadas a una concentración de 10^7 células/ml. Los medios fueron agitados a temperatura ambiente, a 120 rpm y se realizó la primera medición, tomando 2 ml de cada uno de los medios y se centrifugaron por 15 minutos a 3000 rpm. Se tomó 1 ml del sobrenadante, se transfirió a un tubo estéril y se adicionaron 4 ml de reactivo de Salkowski, se agitaron los tubos y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos (Anexo 2). Se leyó la absorbancia a 530 nm

en un espectrofotómetro Spectronic GENESYS 10 UV®. A partir de los datos de absorbancia y la ecuación de la recta de la curva de calibración, se determinó la concentración de AIA producida (Salkowski, 1889; modificado por Bric *et al.*, 1991).

Los medios se dejaron a temperatura ambiente en agitación constante de 120 rpm durante 144 horas, realizando mediciones de la producción de AIA cada 24 horas durante 6 días.

5.4 Producción del preinóculo de Microagro

Para obtener un inóculo apropiado individual de los diferentes grupos aislados se tomaron fiolas con caldo de los medios utilizados (SMRS-1, MRS y extracto de malta) y se añadió 10% del inoculante modificado por López *et al.* 2006, a una concentración aproximada de 10^7 ufc/ml manteniendo una relación de aireación de 1/5 a un volumen de 500 ml. Las fiolas de cada uno de los microorganismos se llevaron a incubación a 30°C con una agitación de 150 rpm durante 48 horas. Se monitorearon los cultivos por el método de recuento en placa en los medios de cultivo SMRS1, MRS y extracto de malta (Novo *et al.*, 1993). Posteriormente, se tomaron 100 ml de cada uno de los medios de cultivo señalados y se aforó el volumen a 3000 ml del producto modificado por López *et al.* 2006 y autoclavado para completar un volumen final de 3000 ml a una concentración aproximada de 10^{11} ufc/ml (López *et al.*, 2006).

5.5 Preparación del inoculante Microagro

Para llevar a cabo la evaluación *in vivo* del inoculante mixto, se debió producir un volumen de 5000 ml del producto mediante un proceso de fermentación discontinua. Se utilizaron las recomendaciones dadas por por López *et al.* (2006), a la preparación del bioinoculante Microagro (leche 0.2%v/v y 3g/L de melaza; a 150 rpm, VET 75%). Se agregó una proporción del 10% del volumen total utilizando el inóculo mixto a una concentración celular aproximada de 10^9 , comparada con el tubo número 6 de patrón de McFarland. Se incubó durante 72 horas a 30°C a un Volumen Efectivo de Trabajo (VET) del 75% y se evaluó el incremento de las poblaciones por medio de la técnica

de recuento en placa en los medios SMRS-1, MRS y extracto de malta (Bashan, 1998), utilizando diluciones de patrones de 10^{-4} hasta 10^{-10} . La fermentación se llevó a un volumen final de 5 L, con agitación permanente de 120 rpm a una temperatura de 25°C durante 72 horas.

5.6 Ensayo de enraizamiento

La prueba de enraizamiento de esquejes de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono, sensible a *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*), se realizó en el banco de enraizamiento ubicado en las instalaciones de Cultivos del Norte (Tocancipá, Cundinamarca). Para este se tomaron 5.600 esquejes de crisantemo (figura 4), distribuidos de forma aleatoria en 90 canastas (figuras 5 y 6), colocando 140 esquejes por canasta. La metodología del cultivo establece que cada canasta de 16000 cm³ debe ser llenada a la mitad de su capacidad, con una mezcla de cascarilla + compost (70/30); posteriormente con un molde guía que es presionado contra el sustrato se obtienen 140 hoyuelos, sobre los cuales son insertados manualmente los esquejes de crisantemo (figura 5). Posteriormente, las canastas son apostadas en filas de 40 a 45 canastas (figura 6) y son sometidas a condiciones de banco de enraizamiento (Humedad Relativa del 80% y temperaturas promedio de 30°C durante el día) y por medio del cual se aplican la hormona sintética ácido indol butírico (AIB) a una concentración de 750 µg/ml por medio de un aspersor sobre la base de los esquejes, el riego es mantenido por medio de un sistema de microaspersión, el cual permite mantener la turgencia de los esquejes (Cultivos del Norte, 2006). Los esquejes, suministrados por Cultivos del Norte, contaron con un tamaño aproximado de 3-4 cm y el control de calidad de los mismos fue realizado por los trabajadores de la finca.



Figura 4. Selección aleatoria de esquejes de crisantemo (Fuente: el autor)



Figura 5. Distribución aleatoria de esquejes (Fuente: el autor)



Figura 6. Canastas para enraizamiento con 120 esquejes de crisantemo

Para este ensayo, se distribuyeron las canastas en 3 tratamientos y un control (Tabla 6), donde se mantuvo la metodología del cultivo para el montaje de las canastas

Tabla 6. Tratamientos ensayo de enraizamiento

Tratamiento	Composición	Número de canastas	Número de esquejes
Control	Cascarilla + agua	10	1400
T1	Cascarilla + compost 70/30	10	1400
T2	Cascarilla + Microagro	10	1400
T3	Cascarilla + compost 70/30 + Microagro	10	1400

El tratamiento control contó con el uso de cascarilla como sustrato junto con la adición de agua y la hormona sintética AIB + fertilizantes agroquímicos, según la metodología utilizada por el cultivo (Cultivos del Norte, 2006).

Para el tratamiento 1 se utilizó una mezcla de cascarilla + compost (proporción 70/30) como sustrato, el riego se aplicó según la metodología del cultivo. Se evaluó la acción del compost dado que es un sustrato agrícola que incrementa el crecimiento vegetal debido a que su proceso de producción conlleva a la solubilización de sustratos orgánicos, disminución en la concentración de microorganismos patógenos y aumento en las poblaciones de microorganismos promotores de crecimiento vegetal.

El tratamiento 2 utilizó cascarilla como sustrato, posteriormente se realizó una

inmersión de cada una de las canastas sobre un tanque de 1000 L con la preparación del inóculo de Microagro en una concentración aproximada de 10^7 células/ml. Dicha preparación se utilizó posteriormente como riego para los tratamientos 2 y 3.

El tratamiento 3 utilizó una mezcla de cascarilla + compost (70/30) como sustrato, la inmersión sobre el inóculo de Microagro y el riego se realizaron siguiendo el procedimiento utilizado para el tratamiento 2.

A excepción del tratamiento control, ninguno de los 3 tratamientos tuvo la aplicación de productos agroquímicos utilizados por el cultivo, en este caso de la hormona sintética AIB (ácido indol butírico).

Los sustratos utilizados para el montaje del ensayo de enraizamiento fueron suministrados por Cultivos del Norte. El compost, se produce con el material vegetal poscosecha sobrante después del “corte”, el cual se recoge y es mezclado con estiércol de ganado, melaza y cal, posteriormente es apilado en camas de un metro de ancho por veinte metros de largo y aproximadamente un metro de altura (Figura 7) (Cultivos del Norte, 2006).



Figura 7. Pilas de compost obtenidas a partir de residuos de cosecha de crisantemo (Fuente: el autor)

Para la composición de la mezcla cascarilla + compost (70/30) se realizó la mezcla de forma manual utilizando palas hasta encontrar una composición homogénea de la

mezcla (figuras 8 y 9).



Figura 8. Pilas de cascarilla y compost



Figura 9. Volteo manual para homogenizar mezcla de cascarilla + compost

5.7 Evaluaciones de variables agronómicas en camas de enraizamiento

Durante el proceso de enraizamiento se llevaron a cabo mediciones cada 3 días durante 12 días (duración normal del período de enraizamiento) de las siguientes variables mediante selección al azar de esquejes sobre los tratamientos:

- o Altura (cm): se midió desde la parte inferior del esqueje de crisantemo hasta el su última estructura, esta medición fue tomada en Cultivos del Norte.
- o Peso fresco (g): a partir de los esquejes medidos a los cuales se les midió su altura, fueron almacenados en cortes de papel periódico de manera individual, sellados con cinta de enmascarar y transportados hasta el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Pontificia Universidad Javeriana, donde fueron evaluados (Forero, 2006).
- o Peso seco (g): una vez evaluado el peso fresco, los esquejes eran nuevamente almacenados en los cortes de papel periódico, sellados nuevamente y secados durante 4 días a 104°C, tras los cuales se volvieron a pesar los esquejes para tomar la medida de peso seco (Forero, 2006).
- o Peso seco radical (g): siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se realizaron cortes del sistema radicular de los esquejes evaluados con el fin de obtener el peso seco radical de cada plántula.
- o Tasa de mortalidad (%): se realizó el conteo de esquejes muertos durante el proceso de enraizamiento, el porcentaje se calculó sobre el número total de esquejes en cada tratamiento, esta medición fue tomada en Cultivos del Norte.
- o Presencia de síntomas: se tomó como una variable cualitativa donde se evaluó la presencia de síntomas causados por los hongos *R. solani* y *S. sclerotiorum*, esta medición fue tomada en Cultivos del Norte.

5.8 Pruebas de antagonismo frente a *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*

Las cepas aisladas durante la investigación fueron sometidas a pruebas de antagonismo frente a los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* con el fin de determinar una posible acción antagónica frente a los microorganismos ya mencionados. Para llevar a cabo esta prueba fue necesario crecer cada una de las cepas a evaluar en agares nutritivo y sabouraud, con el fin de evaluar sobre cual de dichos medios tanto hongos como bacterias crecen con normalidad. Posteriormente se realizó una siembra por estría sobre uno de los costados de la caja con cada uno de los microorganismos aislados del bioinoculante y aproximadamente a unos 3 cm de dicha estría se siembra el hongo fitopatógeno extrayendo un disco de medio con el hongo (Tahmatsidou *et al.*, 2006). Esta prueba se realizó enfrentando cada uno de los microorganismos aislados del bioinoculante de manera individual, frente a cada uno de los hongos ya mencionados. Cada caja fue sometida a un periodo de incubación de 24 a 48h a 30°C, por triplicado. Después del respectivo período de incubación se midieron los halos de inhibición.

El efecto antagónico se evaluó midiendo el diámetro de cada uno de los halos de inhibición del crecimiento del hongo con respecto a la ubicación de la colonia bacteriana, tomando como antagonismo positivo a las cepas que inhibieran el crecimiento de la colonia fúngica, presentando un halo de inhibición mayor de 5 mm y determinándose con un antagonismo negativo las cepas que presentaron entre si, un halo de inhibición menor 5 mm de acuerdo a lo reportado por Gauze (1965).

5.9 Diseño de la investigación

El presente proyecto estuvo basado en un estudio experimental comparativo que buscaba encontrar la producción más alta de ácido indol acético (AIA) en inóculos individuales e inóculo mixto de microorganismos aislados del bioinoculante Microagro y determinar su efecto en esquejes de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono) en un ensayo de enraizamiento; en la experimentación se determinaron 3 tratamientos diferentes (Tabla 6), cada uno contó con 10 repeticiones representadas en 10 canastas, cada una con 140 esquejes, para un total de 1400 esquejes por tratamiento.

Se estableció como hipótesis general que existe evidencia suficiente que indique que el tratamiento donde se incluye la acción de Microagro + compost + cascarilla (Tratamiento 3) es el más apropiado para mejorar la producción de biomasa radical en los esquejes de crisantemo.

5.10 Análisis estadístico

Para determinar si los resultados arrojados por la experimentación se comportaban normalmente se realizó un análisis de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk, estableciendo:

H_0 = Todos los tratamientos se comportan normalmente

H_i = Los tratamientos no se comportan normalmente

Se rechaza H_0 si $p < 0.05$

Observando que los tratamientos no se comportan normalmente ($p > 0.05$), se sometieron los datos al test de Kruskal-Wallis, partiendo de:

H_0 : $\mu_{Control} = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

H_i : al menos uno es diferente

Se rechaza H_0 si el valor de $p < 0.05$

Para determinar si las variables tienen influencia sobre las otras, se realizó el Test de Correlación de Pearson, a partir del cual se determinó el valor de "r", donde:

$r = 1 \rightarrow$ las variables están positivamente correlacionadas

$r = 0 \rightarrow$ las variables no están relacionadas

$r = -1 \rightarrow$ las variables están negativamente correlacionadas

6. Resultados y Discusión

6.1 Aislamiento de grupos funcionales microbianos presentes en el bioinoculante

El bioinoculante no comercial, Microagro, es utilizado en Cultivos del Norte como un inoculante biológico, destinado a la fertilización de esquejes y plantas de crisantemo y gypsophila, tanto en fase de enraizamiento, como en producción. Su formulación está realizada a base de melaza, leche para ternero y agua, y se obtiene por cultivo en batch de 1000 L cada 8 días (Cultivos del Norte, 2006).

La primera determinación realizada a comienzos del 2006 en el laboratorio de Microbiología Ambiental, de la Pontificia Universidad Javeriana, así como los primeros muestreos en Cultivos del Norte, acerca de la concentración aproximada de los grupos microbianos presentes en el bioinoculante indicó 35×10^4 UFC/ml totales (Cultivos del Norte, 2005). Según la resolución número 00375 del ICA (2004) para la producción de inoculantes biológicos con base en microorganismos, la concentración encontrada sobre los recuentos realizados en el producto Microagro, no cumplen con la cantidad mínima de microorganismos requerida ($> 10^6$ células/ml), ya que en este caso las concentraciones se encuentran en un rango muy bajo en este bioinoculante de uso interno para la promoción, mantenimiento y calidad de las flores cultivadas. López *et al.* (2006) realizaron un estudio donde analizaron diversas variables en la producción del bioinoculante, con el fin de incrementar la población de grupos funcionales encontrados en el bioinoculante. Los datos de conteos microbianos obtenidos antes de ser modificado el medio y posterior a su modificación, señalaron un incremento de la población hasta 10^8 UFC/ml de mesófilos totales (Tabla 7).

Tabla 7. Recuento de Microorganismos en el bioinoculante antes y después de la modificación en formulación del medio de cultivo

Grupo funcional	Medio de cultivo	Recuento inicial (ufc/ml)	Recuento medio modificado (ufc/ml)
Hongos filamentosos	PDA	< 100	54 x 10 ³
Hongos hialinos y levaduras	Extracto de malta	56 x 10 ²	65 x 10 ⁴
<i>Azotobacter</i> spp.	Ashby	48 x 10 ²	72 x 10 ²
Fosfato solubilizadoras	SMRS1	62 x 10 ³	13 x 10 ⁸
Mesófilos aerobios	SPC	73 x 10 ⁴	88 x 10 ⁸
<i>Pseudomonas</i> spp.	King B	69 x 10 ⁴	35 x 10 ⁸
<i>Lactobacillus</i> spp.	MRS	70 x 10 ⁴	42 x 10 ¹⁰

(Fuente: el autor)

Acorde con las observaciones realizadas por López *et al.* (2006), se determinó que la concentración de hongos filamentosos, levaduras y *Azotobacter* no son mayores a 10³ UFC/ml, así mismo, en su evaluación se determinó un recuento <100 UFC/ml de microorganismos fijadores libres de nitrógeno. Dichas condiciones pueden ser atribuidas a las condiciones estáticas del cultivo, bajas concentraciones de oxígeno y producción de sustancias fungicidas como las producidas por *Lactobacillus* sp., las cuales pueden intervenir en el desarrollo de dichos grupos microbianos. En un segundo recuento, se detectó el incremento considerable de poblaciones de grupos funcionales de bacterias fosfato solubilizadoras (BFS), levaduras y bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* sp.) en órdenes superiores a 10⁸ UFC/ml, siendo el grupo de bacterias ácido lácticas el más abundante encontrándose en una concentración aproximada de 42 x 10¹⁰ UFC/ml.

Una vez se tomaron las muestras, se determinó la concentración poblacional de 6 grupos funcionales: bacterias fosfato solubilizadoras (BFS), mesófilos aerobios, hongos filamentosos y levaduras, bacterias ácido lácticas, productores de sideróforos y bacterias fijadoras de nitrógeno, cuyos resultados se presentaron en la Tabla 7. Dado que en los medios de cultivo King B y Ashby se aislaron colonias cremosas de bacilos gram positivos o levaduras (sólo en medio King B), se descartó la presencia de microorganismos de los géneros *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp. y *Azospirillum*

sp. en el bioinoculante. Se encontró que los microorganismos que aislados durante esta investigación en mayor abundancia fueron levaduras y microorganismos pertenecientes a los grupos funcionales de BFS y bacterias ácido lácticas, por lo tanto se determinaron como objeto de estudio los microorganismos *Burkholderia cepacia*, *Lactobacillus paracasei*, *Aeromonas hydrophyla* y *Cryptococcus laurentii* (Tabla 8), los cuales fueron identificados por métodos bioquímicos por López *et al.* (2006).

Debido a la abundancia presentada en los medios de cultivo a lo largo de los aislamientos, los medios de cultivo a partir de los cuales fueron aislados y sus características morfológicas, se seleccionaron estas 4 cepas con el fin de evaluar la producción de AIA por parte de estas cepas de manera individual y en inóculo mixto sobre caldo tripticasa soya (contenido de triptófano 0.1% p/v) (Hawkey *et al.*, 1986).

Tabla 8. Características de las 4 cepas analizadas

Microorganismo	Medio de aislamiento	Tinción de Gram	Características	Catalasa / Peroxidasa
<i>Cryptococcus laurentii</i>	King B	Ascos Gram +	Colonias blancas cremosas y brillantes, no se evidenció producción de pigmentos fluorescentes	(+) (+)
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	SMRS1	Bacilo Gram -	Colonias amarillas y cremosas de mal olor	(+) (+)
<i>Burkholderia cepacia</i>	SMRS1	Bacilo Gram -	Colonias color café, formación de halos de hidrólisis en el medio	(+) (+)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	MRS	Bacilo Gram +	Colonias cremosas con olor a yogurt crece bajo condiciones anaerobias	(+) (+)

6.2 Determinación de la producción de AIA

La curva de calibración para estas cuatro cepas fue elaborada a partir de patrones de AIA (Rodríguez, 2006) diluidos en agua destilada en concentraciones conocidas. La elaboración del reactivo de Salkowski se realizó según la modificación propuesta por Bric *et al.* (1991), quienes reemplazaron el uso de ácido perclórico por ácido sulfúrico concentrado, encontrado que el cambio de dicho reactivo no afectaba las lecturas realizadas sobre la detección de esta fitohormona bajo su producción realizada por

cepas bacterianas de *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*; dicha comparación fue realizada para el presente estudio y sus resultados se muestran en el anexo 3. Según lo expuesto por Salkowski (1889) y por Bric *et al.* (1991), la presencia de indol es directamente proporcional a la intensidad del color rojo producido; el cambio de color es debido al resultado de una reacción oxidativa a partir del ácido sulfúrico, donde por medio de una transaminación es sustituido un grupo amino por el cloro proveniente del FeCl_3 , por lo tanto la reacción ácida proporcionada por el ácido sulfúrico y por el ácido perclórico pueden ser usadas de manera óptima en este proceso. Además, es de importancia recalcar que tan sólo cinco compuestos producen reacción visible a través del cambio de color (indol, 5hidroxi indol acético: 5'OHIAA, indol acetamida: IAM, ácido indol acético: AIA y triptamina: IPyA), lo cual muestra que el test de Salkowski no presenta alta especificidad en el momento de determinar concentraciones específicas de AIA en una muestra, en comparación a pruebas como HPLC o TLC (Ahmad *et al.*, 2005, Bric *et al.*, 1991).

La reacción para la síntesis de AIA ocurre mediante la acción de enzimas como la triptófano sintetasa o algunas descarboxilasas producidas por microorganismos, las cuales actúan sobre compuestos precursores como serina, indol, indol 3-glicerol fosfato generando productos intermedios, aquí la acción del componente α de la triptófano sintetasa, cuyo proceso genera indol de manera irreversible. El indol a través de la unión al sitio activo del componente β de la triptófano sintetasa genera triptófano, liberando serina y agua. Así mismo, la serina posee tres vías metabólicas, la primera es catalítica donde genera nuevamente indol 3-glicerol fosfato; la segunda comprende la formación de triptófano mediante la acción del complejo enzimático α - β triptófano sintetasa; o bien puede generar compuestos secundarios como el gliceraldehido 3-fosfato, el cual puede ser acoplado a precursores independientes de triptófano para la producción de AIA, mediante un mecanismo que no se conoce muy bien (Somers *et al.*, 2005).

En este análisis se concluyó que no existían diferencias entre las lecturas realizadas con reactivo de Salkowski con adición de ácido perclórico (35% v/v) y aquel con adición de ácido sulfúrico (37% v/v) (Anexo 3). En la tabla 9 se muestran los datos de

absorbancia tomados a 530 nm (Salkowski, 1889) obtenidos a partir de las concentraciones establecidas en los patrones de concentración de AIA como rangos que contemplan las concentraciones de producción mínima (0.7 µg/ml) y máxima (35 µg/ml) reportadas en la literatura por microorganismos como *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. (Crozier *et al.*, 1988; Castillo *et al.*, 2005; Somers *et al.*, 2005; Vasanthakumar & McManus, 2004).

Por otra parte se observaron diferentes coloraciones presentadas en la reacción positiva de *Burkholderia cepacia* frente al reactivo de Salkowski. Dichos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por Glickmann y Dessaux (1995), quienes definen al reactivo de Salkowski como una metodología que no sólo puede ser utilizada para la detección de AIA, ya que su reacción puede detectar otros compuestos indol en el medio. A lo largo de las réplicas realizadas se observaron coloraciones desde el rosado pálido, hasta púrpura oscuro y café claro (Figura 13). Esto se debe a que la reacción en el medio puede generar tonos oliva-claro, indicando presencia de indol; beige a marrón claro, presencia de ácido 5- hidroxil indol acético (5'OHIAA); violeta y púrpura, indican presencia de indol acetamida (IAM); y color rojo a rosado, presencia de ácido indol acético (AIA) y triptamina (IPyA), los cuales son productos intermedios en la síntesis de AIA o productos generados a partir de un metabolismo independiente de triptófano y su importancia radica en que al ser productos intermedios en la producción de AIA, su detección en un medio permite establecer si un microorganismo determinado tiene la capacidad de producir AIA a partir de un precursor determinado y, así mismo, evaluar la especificidad encontrada en la reacción colorimétrica de Salkowski para la detección de compuestos indol (Glickmann y Dessaux, 1995; Anwar, 2000).

Tabla 9. Datos de la curva de calibración AIA*

µg/ml	Abs 530 nm
0	0.000
2	0,036
4	0,075
6	0,120
8	0,152
10	0,184
15	0,265
20	0,350
30	0,526
40	0,756
50	0,952
60	1,141

***λ_{530 nm} de lectura**

Los datos obtenidos a partir de los patrones fueron analizados mediante regresión lineal utilizando el programa Microsoft® Excel 2005, y se obtuvo una ecuación de la recta equivalente ($y = 0.019x - 0.0073$), producto de tres repeticiones, con un valor de $r^2 = 0.9984$, la gráfica se muestra en la figura 10. Se considera que un valor de $r^2 > 0.9$ muestra una dispersión homogénea de los valores sobre la recta, aceptando así el uso de la ecuación obtenida como un patrón de referencia para el cálculo de las concentraciones de AIA producidas por microorganismos aislados a partir del bioinoculante (Figura 10).

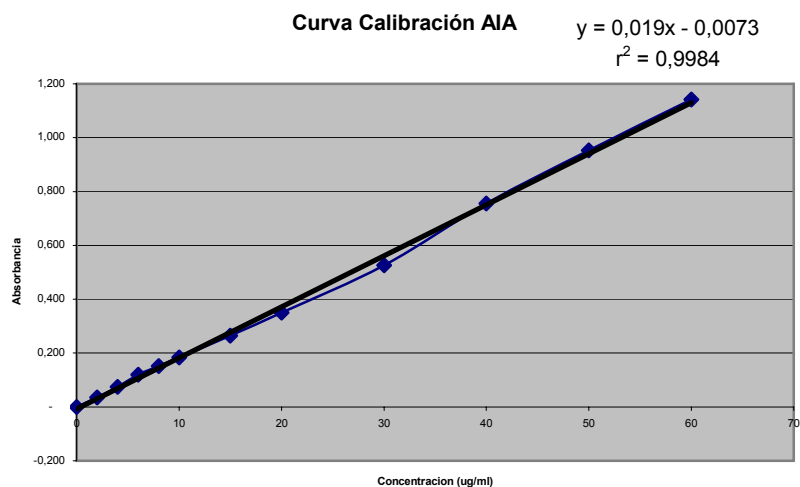


Figura 10. Curva de calibración de AIA ($r^2 = 0.9984$)

6.2.1 Determinación de la concentración de AIA

El ácido indol acético (AIA) es sintetizado a partir de diversas vías metabólicas que utilizan vías dependientes o independientes de triptófano para llegar a dicho producto. Para observar la síntesis de AIA de cada una de las cuatro cepas purificadas, su inóculo mixto sobre caldo tripticasa soya y el bioinoculante, un control positivo (*Azotobacter vinelandii* ATCC 12518) y un control negativo (*Salmonella enteritidis* ATCC 13221) se procedió a realizar el test colorimétrico de Salkowski (Figuras 11, 12; Anexo 4).

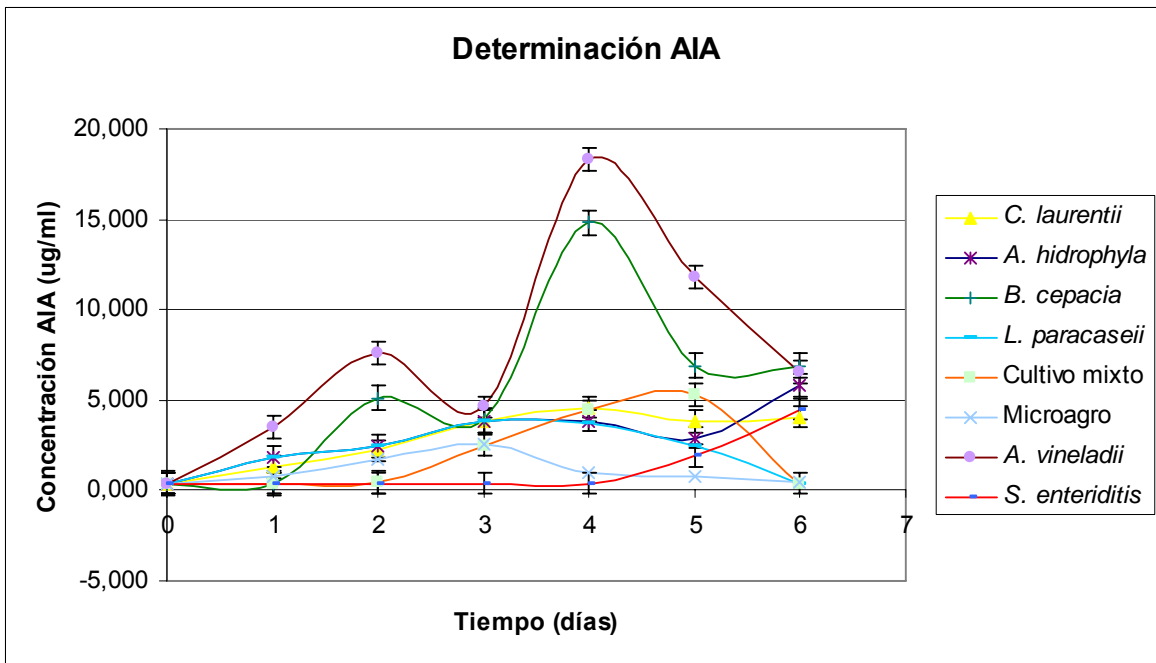


Figura 11. Concentración obtenida a 530 nm mediante la reacción positiva al reactivo de Salkowski

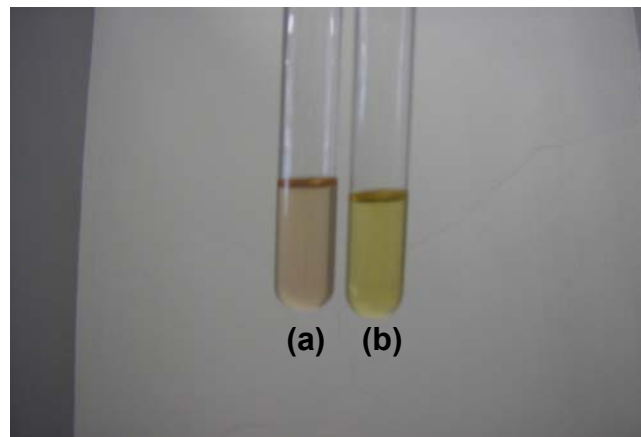


Figura 12. Reacción positiva al test de Salkowski (a), blanco (b)

Se observó durante el período evaluado que de las 4 cepas, tan sólo *B. cepacia*, producía reacción positiva al reactivo de Salkowski (figura 13), lo cual indica que las cepas *C. laurentii*, *A. hydrophyla* y *L. paracaseii*, probablemente no producen AIA mediante vías metabólicas dependientes de triptófano, utilizando como precursores indol, ácido antranílico u otros compuestos (Somers *et al.*, 2005). Se observó durante las lecturas realizadas que la reacción producida por estos microorganismos

representaría cantidades cercanas a 4.5 µg/ml en *C. laurentii* al cuarto día de fermentación y mucho menor en *L. paracaseii* (3.8 µg/ml) y *A. hydrophyla* (3.8 µg/ml), en comparación al control positivo. Por otra parte, no se encontró diferencia estadísticamente significativa (anexo 4) entre las medias determinadas para la cepa 3 y el control positivo, pero sí frente a los resultados de las cepas *C. laurentii*, *A. hydrophyla* y *L. paracaseii*. Así mismo, se observó un comportamiento similar durante el ensayo en las absorbancias medidas sobre *Burkholderia cepacia* y el control positivo (*Azotobacter vinelandii* ATCC 12518), aunque la concentración máxima generada por la *B. cepacia* (14.823 µg/ml), es menor a la observada en el control positivo (18.332 µg/ml).

Por otra parte, en la curva de producción de AIA por ambos microorganismos se observó un leve pico de descenso al día 3, en la cepa *B. cepacia* y el control; este comportamiento en *A. vinelandii* ATCC 12518 se observó también en el estudio realizado por Wong y colaboradores (1995), ellos asumieron que dicho comportamiento se debía a la saturación de sustratos carbonados extrapolado con una disminución en la producción de enzimas catalíticas, puede evidenciarse en una disminución en la producción de AIA debido a que algunas de estas enzimas pueden estar involucradas en el metabolismo del triptófano u otros precursores utilizados para la producción de AIA mediante reacciones de transaminación o carboxilación inespecíficas (Ahmad *et al.*, 2005).

Mediante los inóculos mixtos realizados sobre caldo tripticasa soya y el medio de cultivo de Microagro, se estableció que las concentraciones obtenidas son bajas, encontrándose en concentraciones máximas de 5,296 µg/ml (en caldo tripticasa soya) al quinto día de fermentación y de 2.6 µg/ml (en medio Microagro) al tercer día. Esto puede deberse a que el caldo tripticasa soya provee bajas concentraciones de triptófano (100 µg/ml), comparado con los resultados de Ahmad *et al.* (2005), donde establecieron que la concentración óptima de triptófano en el medio debe ser de 2000-5000 µg/ml, para obtener una concentración de AIA de 22.4 µg/ml. Por otra parte, podría decirse que las bajas concentraciones encontradas sobre el medio Microagro pueden deberse a que el medio de cultivo no provee una fuente rica en triptófano o en

algún otro compuesto que sirva como precursor para la producción de AIA (indol, triptamina o ácido antranílico). Por lo tanto se observa que la producción de AIA presentado en *B. cepacia* disminuye en los inóculos mixtos sobre caldo tripticasa soya y Microagro; y, por lo tanto, su efecto como microorganismo potencial productor de auxinas, posiblemente esto se presentó en los cultivos mixtos por reacciones inespecíficas sobre compuestos precursores de AIA en el medio.

Se ha observado que las bacterias asociadas a las raíces de plantas ornamentales de invernadero tienden a producir cantidades considerables de ácido indol acético (AIA) y que, así mismo, pueden excretarlo a partir de cultivos líquidos. La presencia y actividad del AIA se demostró por Tsavkelova y colaboradores (2005) utilizando un método colorimétrico (reacción de Salkowski) mediante cromatografía de capa delgada (TLC). Las bacterias asociadas variaron en su habilidad para excretar AIA, aproximadamente de 1-28 µg/ml en caldo nutritivo. En este caso, la adición de triptófano al medio de crecimiento mejoró la producción de la fitohormona, en cantidades superiores a 200 µg/ml de triptófano, las bacterias aisladas a partir de raíces de *Dendrobium moschatum* (*Sphingomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Bacillus* sp. y *Rhizobium* sp.) produjeron 50.2, 53.1, 92.9, 37.6 y 60.4 µg de AIA/ml respectivamente; mientras que bacterias aisladas a partir de raíces de *Acampe papillosa* (*Sphingomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Cellulomonas* sp., *Pseudomonas* sp., y *Micrococcus luteus*) produjeron 69.4, 49.6, 53.9, 31.0 y 39.2 µg de AIA/ml. A partir de sus observaciones, determinaron que la producción de esta auxina depende de las condiciones del medio de cultivo y de la fase de crecimiento de los cultivos bacterianos (Tsavkelova *et al.*, 2005). Lo cual concuerda con los resultados observados en esta investigación, dado que se determinó que las condiciones de producción de los inóculos mixtos disminuyen considerablemente la producción de AIA, sin encontrarse una relación directa con la concentración microbiana en el medio, pero si de una manera muy ligada a la concentración de triptófano o de otros compuestos precursores de AIA dentro del mismo.

El uso de métodos colorimétricos ha sido ampliamente usado para la detección de concentraciones de ácido indol 3-acético (AIA) producido por plantas y microorganismos. La determinación de la capacidad productora de AIA de un microorganismo es útil en su identificación y provee una característica valiosa en el estudio de los roles fisiológicos o la significancia ecológica del AIA en el establecimiento y persistencia del organismo. Aunque estos métodos pueden ser muy precisos, una herramienta puramente cualitativa para la determinación de la producción de AIA puede aportar al alcance de los objetivos propuestos (Bric *et al.*, 1991; Anwar, 2000).

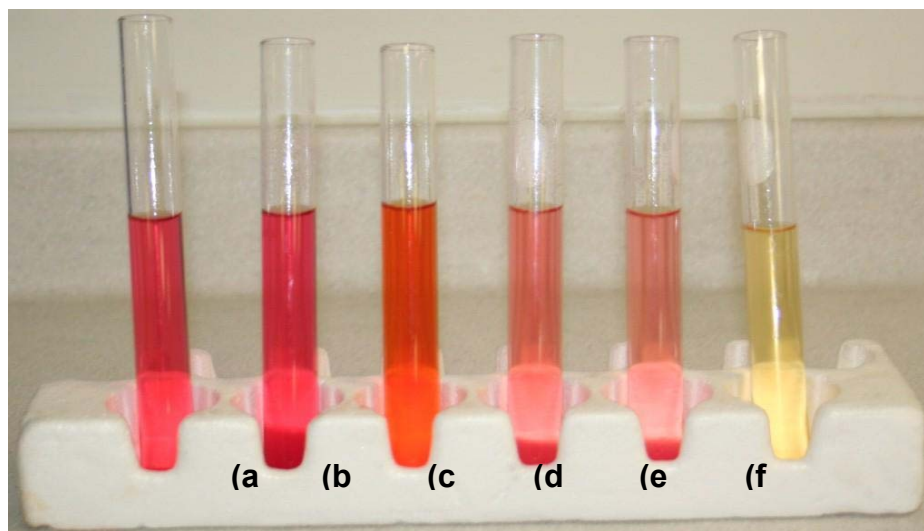


Figura 13. Tonalidades diferentes (a, b, c, d y e) de reacciones positivas presentadas por *Burkholderia cepacia* al reactivo de Salkowski frente al blanco (f)

La reacción observada por la adición del reactivo de Salkowski al sobrenadante de un cultivo de células libres origina un cambio en la coloración al medio a un color rojo, rosado o púrpura pálido en presencia de AIA. El reactivo exhibe un alto nivel de especificidad para la detección de compuestos indol generados por bacterias productoras tales como *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp., *Erwinia* sp., *Burkholderia* sp., *Azospirillum* sp., entre otras, obteniendo producción de color y resoluciones muy parecidas (Davies, 1988; Ahmad *et al.*, 2005), lo cual es importante en procesos donde se pretende evaluar la producción de AIA, dado que la reacción de Salkowski

no sólo detecta la presencia de AIA, sino de compuestos precursores o intermedios en la síntesis del mismo (Somers *et al.*, 2005).

Se ha establecido que las formulaciones del reactivo de Salkowski tienen un comportamiento similar, siendo la base de su reacción la formación de un complejo de color rojizo entre el compuesto férrico y el indol encontrado en la muestra, en presencia de ácido sulfúrico o perclórico (Bonner y Bandurski, 1952). La solución con ácido perclórico (formulación clásica) es la mezcla más utilizada y la solución con ácido sulfúrico (formulación modificada) ha sido implementada con el fin de acoplar los procesos de determinación de AIA. Ambas formulaciones del reactivo de Salkowski tienen un comportamiento aceptable, aunque se ha probado que el reactivo con ácido perclórico tiene mayor sensibilidad dado que tiene mayor potencial oxidativo. Esta formulación brinda un color rojo más intenso en los sitios donde se acumula AIA tanto en diagnósticos realizados en membrana, como en solución líquida, después de 30 minutos de incubación, incrementándose su intensidad por 4 horas con una excelente resolución (Bric *et al.*, 1991; Zakharova *et al.*, 1999). La reacción con ácido sulfúrico ocurre de una manera más lenta y provee una tonalidad rojiza que es visible después de 30 minutos y se conserva durante 2 horas bajo oscuridad. Esta solución resulta en una metodología más económica y de fácil acceso, ya que la gran mayoría de países de Latinoamérica se encuentra restringida la importación de ácido perclórico y, en ocasiones esta sólo puede ser efectuada por vía marítima, lo cual incrementa sus costos enormemente. Además, el ácido perclórico es extremadamente corrosivo pero no explosivo, por esta razón está limitada su importación y, por otra parte, su manipulación requiere un proceso cuidadoso (Davies, 1988; Bric *et al.*, 1991; Anwar, 2000).

Glickmann y Dessaux (1995) realizaron un estudio para la validación del uso del reactivo de Salkowski como método de rutina para la detección de AIA. Se evaluaron tres formulaciones del reactivo de Salkowski, bajo tres concentraciones de ácido sulfúrico: PC (7.9 M H₂SO₄), S1/1 y S2/1 (10.8 M H₂SO₄; 1 o 2 ml, respectivamente). Observaron que no se producen diferencias significativas por el incremento de la

temperatura de reacción consecuencia de la adición de H_2SO_4 en las tres formulaciones. Así mismo se evaluó la especificidad de las absorbancias obtenidas con los resultados obtenidos con HPLC, en ausencia y presencia de triptófano (750 $\mu\text{g/ml}$). Para determinar la sensibilidad de las técnicas PC, S1/1 y S2/1, se midió la densidad óptica a 530 nm como una función de la concentración de AIA en las muestras. Observaron que existen variaciones entre las mediciones día a día y entre grupos, y limitaciones en la lectura de concentraciones mayores a 20 $\mu\text{g/ml}$ en muestras de suspensiones bacterianas, a diferencia de las muestras evaluadas a partir de hormona sintética donde se detectaron concentraciones desde 0.5 $\mu\text{g/ml}$ y superiores a 200 $\mu\text{g/ml}$. Un aspecto importante que se observó fue que las muestras con presencia de triptófano marcaban una disminución en la sensibilidad del ensayo, dado que la síntesis de AIA por vías independientes de triptófano involucran la acción de enzimas más específicas (Ahmad *et al.*, 2005). Esta observación puede relacionarse con el comportamiento observado dentro del caldo tripticasa soya y el bioinoculante Microagro, ya que dentro de este último no se tiene certeza de la concentración y tipo de compuestos precursores de AIA que allí se encuentran, aunque por otra parte la adición de fuentes orgánicas ricas en triptófano podrían incrementar la producción de dicha auxina.

Diversos autores han calificado al test de Salkowski como una prueba cualitativa y semi-cuantitativa para la detección específica de AIA. Algunos de estos dicen que dicho test no es una prueba específica para la detección de AIA, ya que se ha observado que las tres formulaciones presentan especificidades diferentes con el AIA y otros compuestos con indol (Glickmann y Dessaux, 1995). El método PC (basado en la metodología de Pillet y Chollet, 1970, reportado en Glickmann y Dessaux, 1995), es el más específico dado que este reacciona en su mayoría con el AIA, y en una menor proporción, con IPyA y IAM. Como se ha observado en los estudios de sensibilidad de las tres técnicas, los resultados obtenidos con el método S1/1 fueron similares a los obtenidos con el método PC, aunque este último parece ser más específico. Por ejemplo, la indol etanolamina reacciona débilmente a 530 nm con el método S1/1, mientras que con el método PC no lo hace. En contraste, el protocolo S2/1 es menos

específico que los protocolos PC y S1/1. Diversos compuestos reaccionan con esta técnica y la presencia de estos compuestos en un sobrenadante bacteriano pueden alterar el resultado de la determinación de la concentración de AIA (Anwar, 2000). Se debe ser muy cuidadoso con la interpretación de estas técnicas ya que se ha observado que sus reacciones específicas pueden detectarse concentraciones de indol etanolamina, ácido indol propiónico y ácido indol butírico equivalentes a 7-9 µg/ml de AIA, mientras que se descarta la detección de indol aldehído, indol etanol y ILA (Glickmann y Dessaux, 1995; Anwar, 2000). Así mismo, sin importar la técnica, los métodos colorimétricos son más específicos para compuestos indoles en ausencia de triptófano. Esto se debe, probablemente, a las limitadas reacciones del triptófano con los reactivos colorimétricos (Bric *et al.*, 1991; Glickmann y Dessaux, 1995).

Comparaciones realizadas entre técnicas de HPLC y preparaciones del reactivo de Salkowski, han mostrado que los compuestos que reaccionan como positivos a esta última técnica, aún en bajas concentraciones, son siempre correlacionados con la producción de AIA o IPyA (Zimmer *et al.*, 1991). De otro modo, cepas que producen compuestos que no generan reacción positiva al reactivo de Salkowski, no producen AIA o IPyA, aunque pueden mostrar incremento progresivo en la absorbancia, con respecto al control, esto se debe a que la especificidad de la técnica puede verse alterada por la concentración celular de bacterias no productoras de compuestos positivos al reactivo de Salkowski o debido a la producción de IPyA, el cual puede ser sintetizado por diversos microorganismos como resultado de una transaminación no específica de triptófano (Anwar, 2000).

Los estudios llevados por Ahmad *et al.* (2005) determinaron diferentes niveles de producción de AIA bajo diferentes concentraciones de triptófano. Los rangos de producción obtenidos sin adición de triptófano por parte de los aislamientos de *Azotobacter*, se encontraron en los rangos de 2.68-10.8 µg/ml. Un incremento significativo en la producción de AIA fue observado en presencia de 1000, 2000 y 5000 µg/ml de triptófano (1.47-11.88 µg/ml, 5.99-24.8 µg/ml y 7.3-32.8 µg/ml respectivamente), de manera similar al de cepas de *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia*

sp. y *Bacillus* sp., con la capacidad de producir AIA, sin adición de triptófano en el medio, en rangos de 5.34-22.4 µg/ml, aunque no se determinó el precursor utilizado.

Así mismo, se observó un incremento en la producción de AIA en presencia de triptófano, aunque los aislamientos de *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp. y *Bacillus* sp. variaron enormemente en su habilidad intrínseca para producir AIA debido a la disponibilidad de triptófano en el medio, se obtuvieron concentraciones similares a las obtenidas en otras investigaciones (Ahmad *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004; Tabacchioni *et al.*, 2002; Vasanthakumar & McManus, 2004).

En conclusión, se ha determinado que el reactivo de Salkowski es específico para AIA, IPyA y IAM, más que para AIA únicamente. Como consecuencia, la producción de IPyA o IAM por células bacterianas puede confundirse con producción de AIA, encontrando que técnicas como HPLC brindan resultados más precisos. Dado que el gen que codifica para la enzima que cataliza la conversión de IAM a AIA (*iaaH*) regula la síntesis de IAM (*iaaM*), se observa que la producción de IAM está relacionada con la producción de AIA, ocasionando que se produzcan cantidades considerables de IAM en medios donde se pretenda producir AIA (Surico y Iacobellis, 1992). Incluso cuando una bacteria produce bajas cantidades de IPyA pueden ser identificadas erróneamente como productoras de auxinas debido a que las tonalidades producidas sobre la reacción son muy similares y dependiendo de la concentración de IPyA y de AIA producida dichas tonalidades suelen confundirse. Por lo tanto se debe tener cuidado al interpretar datos obtenidos con esta técnica colorimétrica y el uso del test de Salkowski como técnica rutinaria; aunque se destaca que su reacción es utilizada como técnica confirmatoria en procesos de detección de AIA como HPLC o GC-MS, dado que la presencia de compuestos como IAM, IPyA entre otros señalan que los microorganismos que se estudien poseen un metabolismo potencialmente productor de AIA, ya que estos compuestos funcionan como precursores de la síntesis de AIA por vías dependientes e independientes de triptófano (Anwar, 2000; Ahmad *et al.*, 2005).

6.3 Evaluación de variables agronómicas

El ensayo de enraizamiento fue realizado en el banco de enraizamiento ubicado en las instalaciones de Cultivos del Norte (Tocancipá, Cundinamarca). El montaje comprendió una duración total de 12 días desde la siembra de los 10800 esquejes de crisantemo variedad yoko ono sobre canastas distribuidas en 3 tratamientos y un control (Figura 14).



Figura 14. Distribución aleatoria de 90 canastas de los tres tratamientos y el control

A través de este ensayo, realizado bajo condiciones controladas de temperatura (mínima de 10°C y máxima de 25°C), riego (60 - 120 lts/cama/día) y humedad (higrometría media: 70%), se observó la acción del bioinoculante Microagro sobre el enraizamiento de los esquejes de crisantemo (Cultivos del Norte, 2006). El tratamiento 2, a base de cascarilla y Microagro, mostró el mayor incremento en peso fresco en comparación al control y los otros tratamientos, siendo esta la variable que mayor

diferencia estadística mostró a lo largo del ensayo de enraizamiento. En las variables de peso seco radicular, peso seco y altura en los esquejes de crisantemo el tratamiento 1 (compost y cascarilla), mostró los mayores valores aunque no se observó una diferencia estadística marcada con respecto al control. Al final del ensayo de enraizamiento se observó una baja tasa de mortalidad y presencia de síntomas en enfermedades de gran impacto para el cultivo de crisantemo como lo son el damping off y moho blanco, cuyos agentes causales son *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*, respectivamente; la tasa de mortalidad más alta fue mostrada por el tratamiento control (0.509%) y el menor porcentaje de mortalidad se presentó en el tratamiento 3, a base de cascarilla, compost y Microagro (0.093%), posiblemente por la presencia de microorganismos capaces de inducir resistencia sistémica sobre los esquejes.

6.3.1 Altura de los esquejes de crisantemo

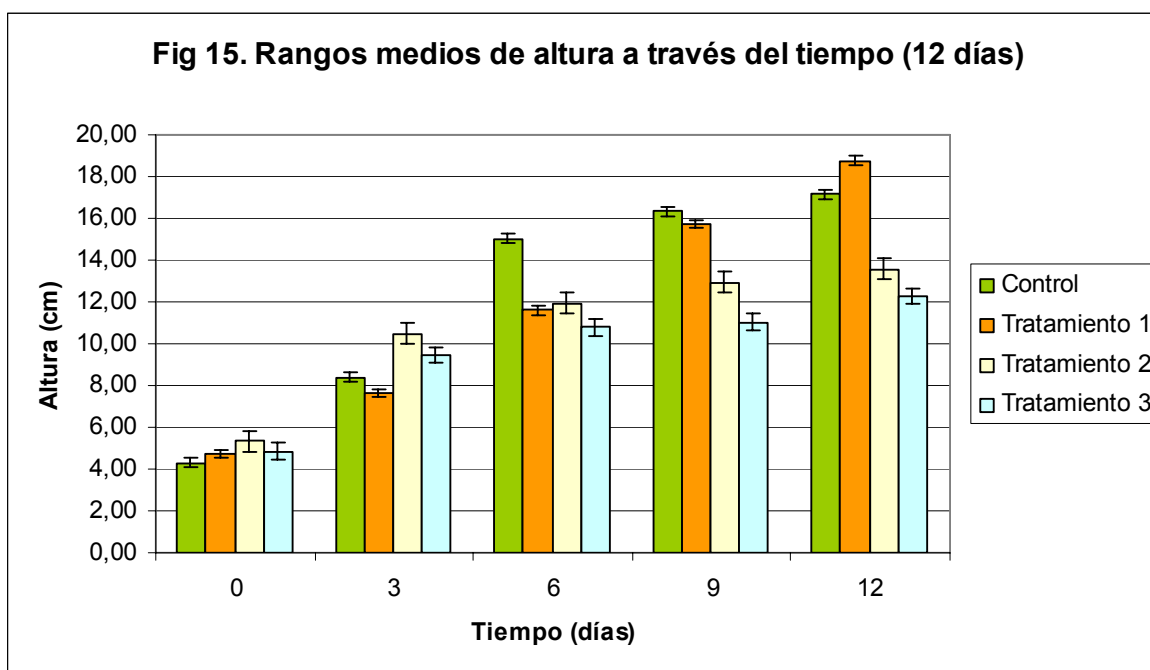
A lo largo del ensayo de enraizamiento se observó que el tratamiento 1, a base de cascarilla y compost (70/30), incrementó en mayor proporción en la longitud de los tallos, con respecto al control y los tratamientos 2 y 3 (Tabla 10 y Figura 15). Así mismo, se encontró a través del análisis de estadística no paramétrica por medio del test de Kruskal Wallis que existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de altura de los esquejes entre los tratamientos ($p < 0.001$). Por otra parte, se encontró que los tratamientos que muestran los mayores valores medios en longitud del tallo, corresponden al control y al tratamiento 1, observándose que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los rangos medios de los tratamientos (Tabla 11, anexo 5). Los tratamientos 2 y 3 mostraron los menores valores en altura durante el desarrollo del ensayo de enraizamiento, observándose también que el tratamiento 2 supera en más de un centímetro (13.58 cm) la altura mostrada por el tratamiento 3 (12.28 cm); se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento 1 y el control, pero no existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos 2 y 3, pero si de estos con respecto al tratamiento 1 (cascarilla y compost) y al control el cual contenía una

concentración aproximada de 750 µg/ml de la hormona sintética AIB utilizada por el cultivo para enraizamiento y cuyo efecto sobre los esquejes consiste en la obtención de un enraizamiento del 98% (Cultivos del Norte, 2006).

Tabla 10. Valores promedios de altura en 4 mediciones* y comparación de rangos medios

Altura (cm)	Control	T1	T2	T3
Día 0	4,31	4,75	5,35	4,85
Día 3	8,40	7,64	10,46	9,45
Día 6	15,04	11,59	11,93	10,78
Día 9	16,32	15,75	12,91	11,02
Día 12	17,14	18,77	13,58	12,28
Grupos	a	a	b	b

*Promedio 26 repeticiones



C: control; T1: cascarilla + compost (70/30); T2: cascarilla + Microagro; T3: cascarilla + compost (70/30) + Microagro

Se ha encontrado que los bioinoculantes involucran una cantidad considerable de microorganismos que tienen la capacidad de producir sustancias estimuladoras de crecimiento en cultivos puros y sobre la rizósfera. Algunos de estos microorganismos producen auxinas en presencia de un precursor como L-triptófano bajo condiciones de

laboratorio y bajo condiciones naturales hay considerable evidencia de la participación de Zn en la activación enzimática sobre la síntesis de AIA, pero no se conocen con exactitud los mecanismos (Anwar, 2000). Los efectos de las auxinas sobre las plantas en fase de enraizamiento son dependientes de su concentración, por lo tanto una concentración baja puede estimular el crecimiento, mientras que concentraciones superiores pueden ocasionar efectos inhibitorios (rangos mayores a 2500 µg/ml). Por otra parte, se ha observado que tipos diferentes de plantas responden de manera distinta a las concentraciones variables de auxinas y el tipo de microorganismos que las producen (Ahmad *et al.*, 2005). Estas observaciones deben tomarse en cuenta, dado que producto de las bajas concentraciones de la producción de AIA en el bioinoculante, indica que si se pretende incrementar la producción se deben considerar estrategias con respecto a modificaciones que deben ser realizadas sobre el medio de cultivo, con el fin de proveer concentraciones suficientes de compuestos precursores de AIA como triptófano, sobre los cuales las enzimas microbianas podrán ejercer su acción con el fin producir concentraciones óptimas que no resulten inhibitorias sobre los esquejes de crisantemo.

Observaciones realizadas por Castillo *et al.* (2005), detectaron que diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las dosis de AIB aplicadas sobre esquejes de *Muralla paniculata*, les permitió establecer que con la concentración de 4000 µg/ml se obtuvieron los valores más altos para todas las variables evaluadas a excepción del número de raíces en la que fue estadísticamente igual a la concentración de 3000 µg/ml mientras que en el testigo los resultados fueron siempre los más bajos. Los tratamientos con 3000 y 5000 µg/ml de AIB se comportaron estadísticamente iguales entre sí indicando que aparentemente la dosis de 5000 µg/ml resultó demasiado alta. En todos los tratamientos aplicados en las ramas acodadas, incluyendo el testigo, se produjo un 100% de enraizamiento, lo cual se confirma con lo señalado por Hartmann *et al.* (2002) quienes indicaron que esta técnica es exitosa en la propagación de muchas plantas debido a que la rama al no ser separada de la planta madre sigue recibiendo agua y nutrimentos. Sin embargo, al combinar esta técnica con aplicaciones de AIB se observó una mayor cantidad de raíces.

Por su parte, Buitrago y Ramírez (2003) encontraron el mayor porcentaje de enraizamiento, número y longitud máxima de raíces adventicias en *Psidium guajava* al aplicar 40000 µg/ml de ácido naftalenacético (ANA, un precursor de AIA). Lo cual indica que el uso de reguladores de crecimiento es una forma de mejorar la magnitud de enraizamiento de diversas especies vegetales y en el caso de los esquejes de crisantemo el aporte nutricional realizado por el tratamiento 1, fue mayor, en comparación al efectuado por el tratamiento 2, donde el aporte de AIA es muy bajo dado que el medio no provee concentraciones suficientes de compuestos precursores para obtener una producción alta de AIA, por lo cual no sólo puede considerarse que modificaciones específicas en el medio pueden incrementar la producción de AIA, ya que la adición de compuestos precursores de AIA sobre el sustrato pueden estimular la producción de la auxina.

Dashti *et al.* (1997), quienes, al inocular *Serratia liquefaciens* 2-68 y *S. proteamaculans* 1-102, encontraron mayor número de hojas y longitud del tallo en soya (*Glycine max*), afirman que el bajo o nulo efecto de *Bradyrhizobium japonicum* y *Serratia liquefaciens* 2-68 en el crecimiento del cultivo pudo deberse a que las cepas no encontraron el medio adecuado en la rizósfera, ya que, en general, para que los microorganismos puedan asociarse con las raíces, tienen que escapar de los mecanismos de defensa que las plantas desarrollan contra microorganismos patógenos y encontrar condiciones nutritivas y ambientales adecuadas para su crecimiento (Barea y Azcón-Aguilar, 1982).

Santana *et al.* (2002), encontraron un aumento en el longitud de los tallos que fue estadísticamente significativa entre los tratamientos donde fueron inoculados bacterias fosfato solubilizadoras con respecto al control, determinando que la capacidad de bacterias fosfato solubilizadoras (BFS) de sintetizar hormonas de crecimiento vegetal como el ácido indol acético estimula la producción de raíces laterales y la elongación de los tallos. Además, no solo tienen la capacidad de solubilizar fósforo, así mismo, son capaces de producir sustancias biológicamente

activas (auxinas, citoquininas, giberelinas, aminoácidos y vitaminas) que estimulan el desarrollo vegetal. También sintetizan sustancias fungistáticas que al inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos promueven directamente el desarrollo de las plantas en etapas tempranas del cultivo (Ahmad *et al.*, 2005).

Díaz *et al.* (2001) encontraron que al inocular cepas de *Hafnia* sp., *Azospirillum* sp., *Beijerinckia* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. sobre semillas y plántulas de *Lactuca sativa* L. var. longifolia; estas ejercían una influencia positiva en el desarrollo de las plantas, en comparación con el tratamiento con compost y el testigo sin inocular. Así mismo, se concluyó que las cepas que estimularon mayor desarrollo de área foliar y altura, fueron las mismas que causaron el incremento más alto en el peso fresco de la planta, con valores con un incremento hasta del 39%.

Es importante destacar la respuesta de crecimiento observada por el tratamiento 1 al favorecer la elongación del tallo por encima de otros tratamientos (18.7 cm), aunque un gran incremento en esta variable como el observado no representa un aspecto importante en un proceso de enraizamiento, donde se pretende promover un desarrollo uniforme de los esquejes con respecto a su altura, pero promoviendo la producción de raíces y la elongación de las mismas a una longitud no superior a 4 cm, con el fin de llevar a campo esquejes con una altura media, saludables, con una estructura radicular que permita un buen acople al suelo (Chang *et al.*, 2003; Ciccillo *et al.*, 2002; Deleito *et al.*, 2005).

6.3.2 Peso Fresco de los esquejes de crisantemo

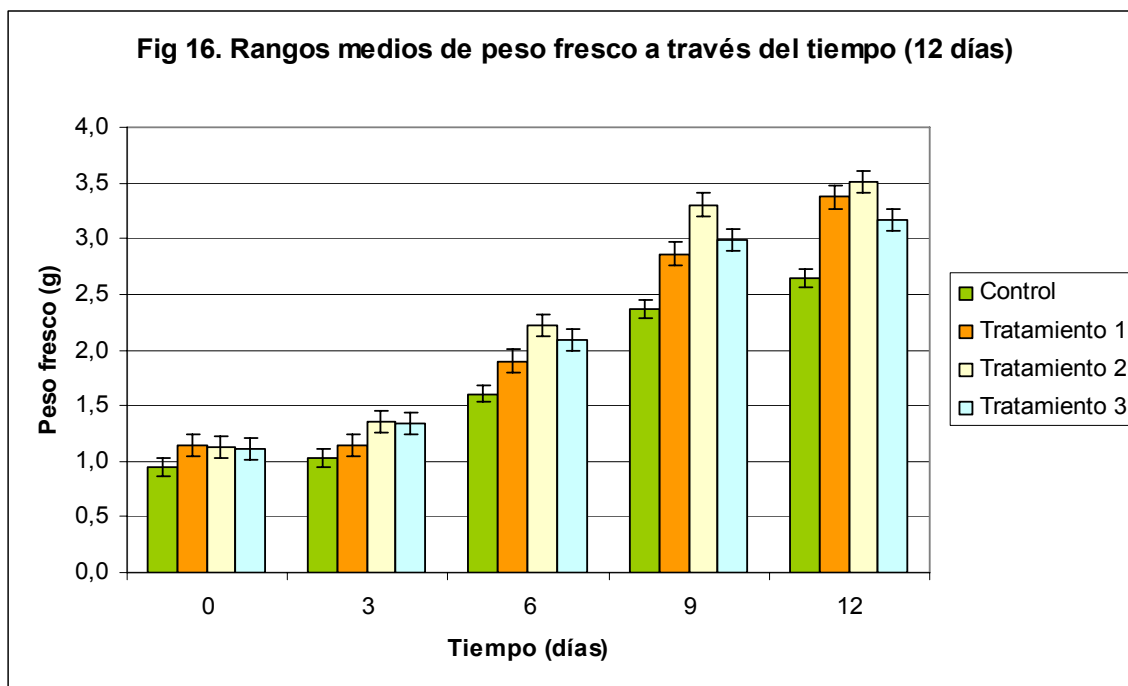
En las mediciones de peso fresco, se obtuvo que los tratamientos que mayor incremento de esta variable presentaron, fueron los tratamientos 2 (cascarilla + Microagro) y tratamiento 3 (Microagro + compost + cascarilla). De igual forma, con respecto al control y al tratamiento 1 (cascarilla + compost) (Tabla 11 y Figura 16). Así mismo, se encontró que existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de peso fresco de los esquejes en los tratamientos ($p < 0.001$).

La comparación de medias realizada permitió determinar que hay dos grupos (tratamientos 1 y 2) en los cuales las medias no son significativamente diferentes entre ellas ($\alpha > 0.05$), pero si respecto al control, determinando que el tratamiento 2, presenta el mayor valor medio de peso fresco (3.5 g) y que este no presenta una agrupación homogénea con respecto al valor medio del tratamiento 3 (3.16 g) (anexo 5), observando que el ensayo presenta un lento incremento de peso fresco de los esquejes y un rápido incremento al final del ensayo, dicha observación fue señalada por Barea y Azcón-Aguilar (1982) al incremento en la toma de agua y la traslocación de nutrientes, utilizada para el mantenimiento y aumento de la turgencia en los tejidos de la plántula.

Tabla 11. Valores medios de peso fresco en 4 mediciones* y comparación de rangos medios

Peso fresco (g)	Control	T1	T2	T3
Día 0	1,0	1,1	1,1	1,1
Día 3	1,0	1,1	1,4	1,3
Día 6	1,6	1,9	2,2	2,1
Día 9	2,4	2,9	3,3	3,0
Día 12	2,7	3,4	3,5	3,2
Grupos	a	b	c	c

* Promedio de 26 repeticiones



C: control; T1: cascarilla + compost (70/30); T2: cascarilla + Microagro; T3: cascarilla + compost (70/30) + Microagro

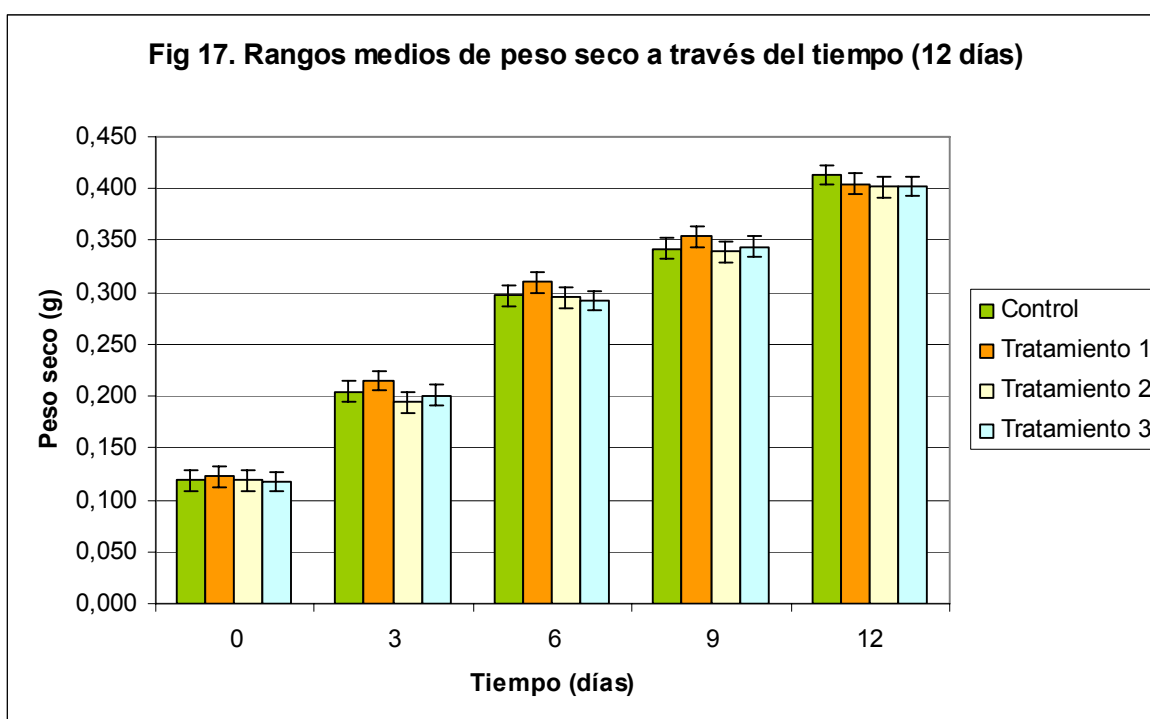
6.3.3 Peso Seco de los esquejes de crisantemo

Las mediciones realizadas sobre esta variable agronómica permitieron concluir que no existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de peso seco de los esquejes en los tratamientos 1, 2 y 3 con respecto al control ($p > 0.05$). El mayor valor medio en producción de biomasa seca lo presenta el tratamiento control, seguido del tratamiento 1 (cascarilla + compost) con respecto a los otros tratamientos (Tabla 12 y Figura 17, Anexo 5), pero menor con respecto al control, no correspondiendo a los resultados obtenidos en peso fresco.

Tabla 12. Valores medios de peso seco a través del tiempo (12 días)* y comparación de rangos medios

Peso seco (g)	Control	T1	T2	T3
Día 0	0,119	0,122	0,119	0,117
Día 3	0,204	0,215	0,194	0,201
Día 6	0,297	0,310	0,295	0,292
Día 9	0,342	0,354	0,339	0,344
Día 12	0,413	0,405	0,402	0,402
Grupos	a	a	a	a

*Promedio 45 repeticiones



C: control; T1: cascarilla + compost (70/30); T2: cascarilla + Microagro; T3: cascarilla + compost (70/30) + Microagro

Como se observa en la gráfica, el tratamiento control en el cual no se adicionó el bioinoculante presentó un mayor peso seco, aunque su cantidad no representa una diferencia estadísticamente significativa, con respecto a los demás tratamientos, dicha relación se mantiene desde la primera medición hasta el final del ensayo de enraizamiento (anexo 5), por lo cual podría decirse que el tratamiento 1 (cascarilla +

compost) donde se obtuvo la mayor medida de peso fresco es donde se favorece de mayor manera la toma de agua.

Santana *et al.* (2002), encontraron que los tratamientos inoculados con *Azotobacter* sp. y bacterias fosfato solubilizadoras (BFS) sobre esquejes de crisantemo bajo condiciones similares a las establecidas en este trabajo, presentaron una diferencia significativa entre estos tratamientos con respecto al control (13.4 y 12.8 g de los tratamientos frente a 9.6 g del control). Esto se debió a que estos microorganismos al encontrarse en altas concentraciones en el suelo ($10^6 - 10^9$ células/g), se asocian al sistema radicular de algunas especies vegetales y ocasionan una aceleración del desarrollo e incremento del rendimiento vegetal, debido a su capacidad de sintetizar sustancias metabólicamente activas como las auxinas derivadas del indol (AIA), giberelinas, citoquininas, vitaminas (biotina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, piridoxina, riboflavina), aminoácidos y otros compuestos bioactivos (Altomare *et al.* 1999). Dichos factores se han detectado en los microorganismos aislados del bioinoculante Microagro (Tabla 13) y, así mismo, gran parte de estos se ha demostrado que influyen en la diferenciación celular de los meristemas y la elongación celular llevada a cabo en el sistema radicular, donde enzimas como carboxilasas, descarboxilasas, anhidrasas carbónicas, oxidasas, entre otras, en acción conjunta con auxinas y vitaminas llevan a cabo la elongación radicular (Tabacchioni *et al.*, 2002; Ciccillo *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2003; El-tarabily y Sivasithamparam, 2006; Halda-Alija, 2003; Lowe y Arendt, 2004).

Tabla 13. Principales factores producidos por los microorganismos aislados de Microagro

Microorganismo	Sustancias producidas
<i>Burkholderia cepacia</i>	Carboxilasas, descarboxilasas, biotina, tiamina, riboflavina, fosfatasas, AIA, giberelinas, ácido salicílico
<i>Lactobacillus paracaseii</i>	Carboxilasas, descarboxilasas, ácido fólico, antibióticos, ácidos orgánicos, Vitamina K, lactasa
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	Treonina, fosfatasas, aminopeptidasas
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Oxidasas, liasas, anhidrasas carbónicas, pectinasas

Fuente: Tabacchioni *et al.*, 2002; Ciccillo *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2003; El-tarabily y Sivasithamparam, 2006; Halda-Alija, 2003; Lowe y Arendt, 2004

Di Cello *et al.* (1997), demostraron que la concentración de microorganismos PGPR en el suelo no sólo se ve afectada por la concentración en la cual sea inoculado, sino que el desarrollo fenológico de la planta afecta significativamente la población, debido a la producción de metabolitos secundarios que estimulan la formación de colonias microbianas y así mismo, el establecimiento de poblaciones de microorganismos como levaduras, *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Lactobacillus* sp. y fijadores libres de nitrógeno, asociadas a la raíz de las plantas. Se determinó que durante las fases de germinación y enraizamiento se encontraban mayores polimorfismos en las poblaciones de *Burkholderia cepacia* que los encontrados al final de la maduración. Esto se debe a que la rizósfera de plantas jóvenes representa un ecosistema inestable a diferencia del encontrado en una planta madura, probablemente debido a que una planta joven representa un nuevo elemento en el suelo. Por esta razón, se destaca la importancia de procesos de señalización en plantas en el proceso de enraizamiento para monitorear factores como la profundidad para la absorción de nutrientes, la necesidad de nutrientes o el tamaño de los tallos para el sostenimiento (Bernal *et al.*, 2007). Esto radica en que la dinámica de los dominios funcionales y estructurales del núcleo en células vegetales (cromatina condensada, región intercromatínica y nucleolo) está relacionada con las funciones de replicación, transcripción, procesamiento y transporte de RNAs, variando su organización estructural en relación a esta actividad y en las diferentes etapas del desarrollo gametofítico y embriogénico, así como durante las distintas fases del ciclo celular. Estudios realizados por Coronado *et al.* (2007) han revelado que en las plantas se producen cambios en la localización nuclear y citoplásmica de MAPKs y otras proteínas de señalización durante procesos de respuesta a estrés o estados fenológicos de desarrollo.

Tabacchioni *et al.* (2002), encontraron que el efecto de las bacterias fosfato solubilizadoras (BFS) como *Burkholderia* sp. y una cepa mutante de *Azotobacter chroococcum*, estimulan el crecimiento vegetal y que dicho estímulo no sólo se debe a la solubilización de formas insolubles de fósforo, a través de la producción de ácidos tales como el cítrico y el oxálico y que están involucradas en la promoción del

crecimiento y desarrollo general de determinados cultivos ya que aportan un valor agregado al incrementar el peso seco y el contenido de proteínas (27 – 40% respectivamente).

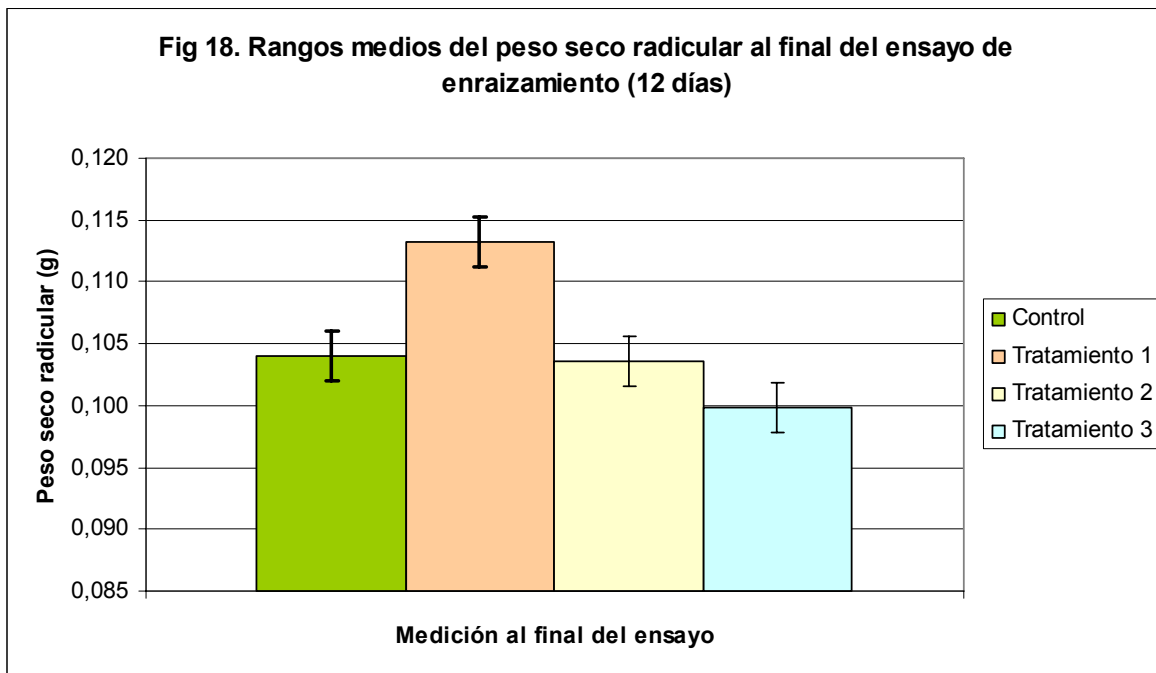
6.3.4 Peso seco radicular de los esquejes de crisantemo

Las mediciones realizadas sobre esta variable agronómica permitieron concluir que no existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de peso seco de los esquejes en los tratamientos ($p > 0.05$), se acepta que los valores medios son iguales entre sí y que no hay diferencias significativas entre las parejas de medias ($\alpha > 0.05$) (anexo 4). Se evaluó un total de 50 cortes radiculares del mismo número de esquejes de crisantemo obtenidos a partir de canastas seleccionadas de manera aleatoria sobre los 3 tratamientos y el control; la evaluación fue realizada al día 12 del ensayo de enraizamiento dado que este es el tiempo que tardan los esquejes de crisantemo para producir raíces definitivas para realizar el trasplante a camas de producción (Cultivos del Norte, 2006). A través de las mediciones realizadas, se logró determinar que el mayor valor medio en producción de biomasa seca radicular lo presenta el tratamiento 2 (Microagro) con respecto a los otros tratamientos (Tabla 14 y Figura 18) y al control.

Tabla 14. Valores medios de peso seco radicular* y comparación de rangos medios

Peso seco radicular (g)	Control	T1	T2	T3
Día 0	0	0	0	0
Día 12	0,104	0,113	0,104	0,100
Media	0,104	0,113	0,104	0,1
Grupos	a	a	a	a

***Promedio de 45 repeticiones**



C: control; T1: cascarilla + compost (70/30); T2: cascarilla + Microagro; T3: cascarilla + compost (70/30) + Microagro

Se ha observado que el efecto de aislamientos de PGPRs en la elongación radicular varía dependiendo de las concentraciones de triptófano sobre las cuales sea cultivado el microorganismo productor de AIA. En aplicaciones con concentraciones de triptófano del orden de 0, 1000, 2000 y 5000 $\mu\text{g/ml}$ la elongación radicular varía en unidades considerables; se observó que al utilizar *Azotobacter* sp. y BFS, sin adición de triptófano la elongación radicular en procesos de germinación y enraizamiento es mayor, pero no se determinaron los precursores que utilizan estos microorganismos en ausencia de triptófano. A diferencia de aplicaciones realizadas con *Pseudomonas* sp. donde se observa una disminución en la elongación radicular, esto supone que las especies de *Pseudomonas* aplicadas utilizan vías metabólicas dependientes de triptófano para la producción de AIA. En todos los montajes se observó que a una concentración de 5000 $\mu\text{g/ml}$ de triptófano, la producción de raíces de *Sesbania aculeata* y *Vigna radiata* disminuye, lo cual indica que el triptófano a una concentración de 5000 $\mu\text{g/ml}$ es tóxico en presencia de las bacterias analizadas (Ahmad *et al.*, 2005). Por otra parte se ha observado que a concentraciones mayores

de triptófano, la producción de AIA incrementa, lo cual excluye un efecto adverso sobre el crecimiento de la planta (Davies, 1988).

El desarrollo de las raíces, favorecido por efecto de la inoculación del bioinoculante, se manifestó directamente en mayor crecimiento de la parte aérea del cultivo; es importante destacar que las variables agronómicas evaluadas en el ensayo de enraizamiento mostraron que el tratamiento 1, con la mezcla de sustrato cascarilla y compost (70/30), mostró los mejores índices de crecimiento en la parte aérea y en la raíz del cultivo (18.7 cm y 0.11 g, respectivamente). Estos resultados concuerdan con los observados por Díaz *et al.* (2001) y por Pereira *et al.* (1988), quienes mencionaron que las bacterias promotoras del crecimiento, se caracterizan por incrementar el desarrollo radical, lo cual repercute directamente en el rendimiento del cultivo de sorgo y arroz.

Además, se ha observado que las plantas poseen sistemas de almacenamiento, uso y distribución de AIA a lo largo de su biomasa. Además, se conoce que el AIA puede presentarse de forma activa, o en forma conjugada bajo la cual es almacenado. Así mismo, una planta que se encuentre en un ambiente sin disponibilidad de triptófano no tendrá una fuente de AIA, a menos que esta sea producida por microorganismos asociados a la raíz. Microorganismos como *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp. pueden producir concentraciones superiores a 3.08 µg/ml de AIA (Ahmad *et al.*, 2005). La conversión de triptófano u otros precursores a AIA está mediada por peroxidasas y descarboxilasas las cuales pueden ser excretadas por raíces de las plantas y microorganismos. De esta manera la planta al almacenar concentraciones suficientes de AIA en forma conjugada, produce dichos complejos enzimáticos para producir AIA en su forma activa, cuando así lo requiera, por lo tanto, la producción de sustancias intermedias en la producción de AIA generadas por microorganismos puede cumplir la función de brindar a la planta reservas de compuestos precursores de AIA, los cuales serán utilizados en el momento requerido por la planta (Davies, 1988; Anwar, 2000). Así mismo, la planta debe mantener un balance energético para utilizar adecuadamente el AIA producido y almacenado, se dice que la vía dependiente de

triptófano le resulta más económica a la planta y a los microorganismos (Deleito *et al.*, 2005).

Aunque su síntesis inicia antes de llenar sus compartimentos de almacenamiento de triptófano (también suministrado por los microorganismos), la biosíntesis de AIA ocurre primero que la síntesis de triptófano, así la planta debe mantener sistemas de regulación en especial en fases tempranas del crecimiento con el fin de utilizar las cantidades necesarias de AIA tan sólo en estados fenológicos específicos de la planta. Aunque estos mecanismos se desconocen, y aún no se sabe con certeza que porcentaje del AIA utilizado por la planta proviene de sus compartimentos de almacenamiento y que porcentaje de síntesis directa microbiana (Castillo *et al.*, 2005; Deleito *et al.*, 2005).

6.3.5 Presencia de Síntomas y Porcentaje de Mortalidad

Tomando en cuenta que uno de los grandes aspectos que es considerado en el desarrollo de inoculantes biológicos, es disminuir la mortalidad de las plantas sobre las cuales el bioinoculante interviene. Se tomó en cuenta esta variable, con el fin de establecer si el bioinoculante Microagro, posee algún efecto que disminuya la incidencia de enfermedades y plántulas muertas en el proceso de enraizamiento.

Se observó durante el transcurso del ensayo de enraizamiento, que en general el control y los tratamientos presentaron un bajo porcentaje de presencia de síntomas y mortalidad de esquejes (tabla 15, figura 19, anexo 5).

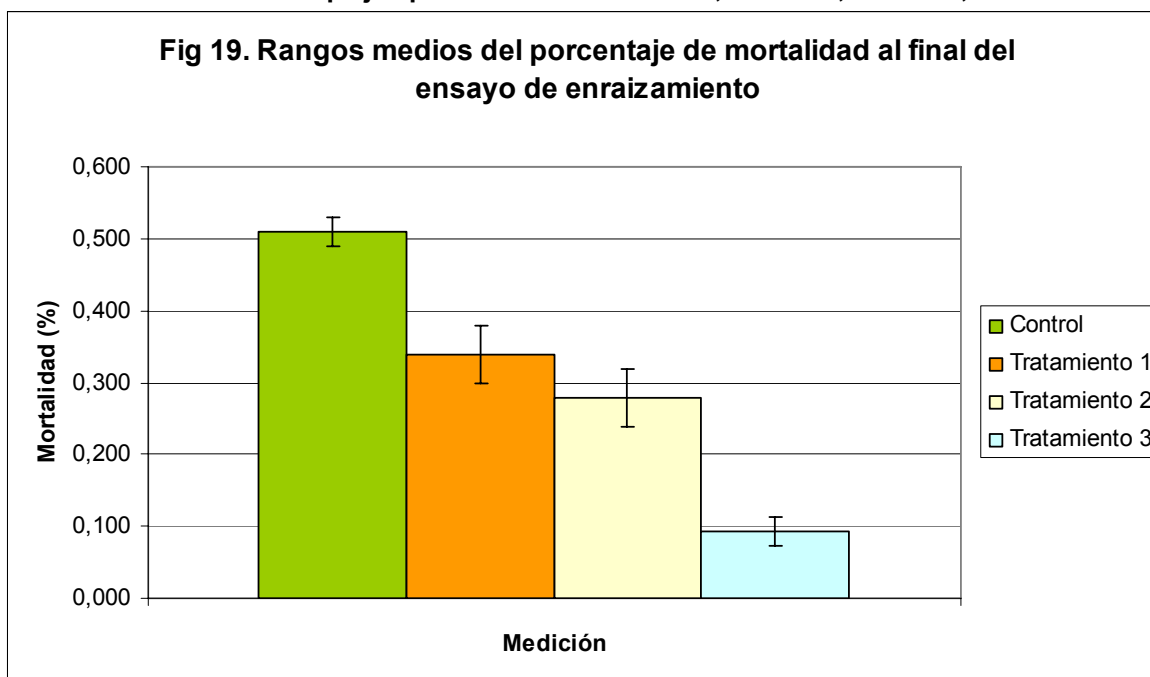
Se determinó que el control, fue el tratamiento con mayor incidencia de esquejes muertos, encontrándose un valor del 0.509% y así mismo se observó que en su totalidad los esquejes muertos presentaban síntomas caracterizados por la presencia de tejidos afectados por un micelio laxo color café claro con aspecto de telaraña, en la base del tallo pequeñas ulceraciones del tejido de la corteza con coloración café rojizo, lo cual produce debilitamiento y pudrición en el tallo y caída de estructuras

(damping off). Por otra parte, se observó que el tratamiento que menor incidencia de mortalidad presentó, fue el tratamiento 3, con un valor del 0.093% de esquejes muertos ($p < 0.001$).

Tabla 15. Valores medios de mortalidad en 4 mediciones*

Mortalidad (%)	Control	T1	T2	T3
Ensayo	0,509	0,340	0,278	0,093

*El porcentaje se determinó a partir de la cantidad de esquejes con síntomas obtenidos, sobre el total de esquejes por tratamiento. C: 4800; T1: 3600; T2: 1200; T3: 1200



C: control negativo; T1: cascarilla + compost (70/30); T2: cascarilla + Microagro; T3: cascarilla + compost (70/30) + Microagro

Ciccillo *et al.* (2002), probaron que la acción de inóculos de microorganismos PGPR en estadios jóvenes de plantas de maíz no sólo era una herramienta que permitía el mejor establecimiento de poblaciones microbianas y por otra parte un incremento en la acción de estos microorganismos sobre su acción sinérgica sobre las plantas. Así mismo, observaron que los inóculos sobre estados fenológicos tempranos de las plantas mostraban plantas más sanas y vigorosas, señalando de esta manera que la acción de estos microorganismos sobre el crecimiento vegetal y su posible efecto indirecto sobre microorganismos oportunistas disminuye considerablemente la

presencia de diferentes tipos de enfermedades (Anwar, 2000; Barea y Azcón-Aguilar, 1982).

Por otra parte, una característica importante que se le atribuye a los PGPR, consiste en generar resistencia sistémica inducida (RSI), sobre las plantas con las cuales interactúan. Esta consiste, básicamente como una protección activa (sistémica) de la planta, la cual depende de las barreras físicas o químicas levantadas por la planta hospedera, las cuales son activadas por agentes inductores producidos por microorganismos (Kloepper y Schroth, 1979). Resultados observados en estudios sobre PGPR, han mostrado una importante influencia en el control de patógenos del suelo, mediante la competencia frente a microorganismos patógenos, producción de metabolitos bacteriales deletéreos para el patógeno (sideróforos, HCN, antibióticos) o por mecanismos asociados con RSI. Más recientemente, tres laboratorios independientemente demostraron que ciertas cepas de PGPR protegían las plantas, por medio de mecanismos asociados con RSI. La inducción de una resistencia sistémica que comienza en el lugar de infección y que alcanza todo el organismo o puede ser influenciada por sustancias como el ácido salicílico (producido por *B. cepacia*). Este último fenómeno puede ser desencadenado por un patógeno avirulento o un microorganismo no patógeno (Anwar, 2000; Rives *et al.*, 2004).

6.4 Efecto sobre patógenos

Las cepas aisladas del bioinoculante Microagro fueron sometidas a pruebas de antagonismo frente a los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*, con el fin de determinar una posible reacción frente a estos hongos. Al finalizar la prueba, se midieron los halos de inhibición (Tabla 16).

Tabla 16: Resultados arrojados por la prueba de antagonismo. Halos dados en mm

Cepa	<i>C. laurentii</i>	<i>A. hydrophyla</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>L. paracaseii</i>
<i>R. solani</i>	0 mm	2 mm	1 mm	3 mm
<i>S. sclerotiorum</i>	0 mm	1 mm	0 mm	1 mm

Como puede observarse en los resultados ninguna de las cepas aisladas presentó un halo de inhibición mayor a 5 mm de diámetro, razón por la cual se puede inferir que ninguna de las cepas evaluadas es antagónica frente a *R. solani* y *S. sclerotiorum*.

Por otra parte, López *et al.* (2006) realizaron pruebas de antagonismo entre las cepas aisladas y encontraron que no existe acción antagónica entre estas. Esto es de gran importancia dado que en inoculantes mixtos, es de suma importancia conocer las posibles interacciones antagónicas existentes entre los microorganismos que conforman el inoculante; en el caso que algún microorganismo presente en el inoculante biológico revele un efecto antagónico, la población microbiana del mismo se alterará notablemente y por lo tanto los beneficios del inoculante así también propiedades como sustancias estimuladoras de crecimiento vegetal, mineralización de materia orgánica, fijación de nitrógeno, pueden verse de igual manera alteradas; razón por la cual el hecho de no tener microorganismos antagónicos entre sí en el inoculante evaluado, es positivo tanto para el suelo como para la planta.

6.5 Test de Correlación de Pearson

Se realizó con el fin de observar la relación entre las variables agronómicas analizadas durante el ensayo de enraizamiento. Se obtuvo una medida cuantitativa, entre dos variables, sobre la dependencia entre ellas. Se determinó que si el valor de r obtenido era mayor a 0, se dice que las variables se encuentran positivamente relacionadas, es decir, mientras x incrementa, y tiende a incrementar en igual proporción. Si el valor de r obtenido era menor a 0, se determina que las variables se encuentran negativamente relacionadas, es decir, mientras x tiende a incrementar, y tiende a disminuir. Y, por último, si el valor de r era igual a 0, se determina que las variables no están relacionadas por lo cual, se dice, que no existe relación lineal entre x y y (Rosner, 2006; Elston & Johnson, 1990).

A partir de los resultados obtenidos del Test de Correlación de Pearson (Anexo 5), se determinó que existe una influencia positiva baja entre la producción de biomasa obtenida por López *et al.* (2006) y la producción de AIA determinada en el presente

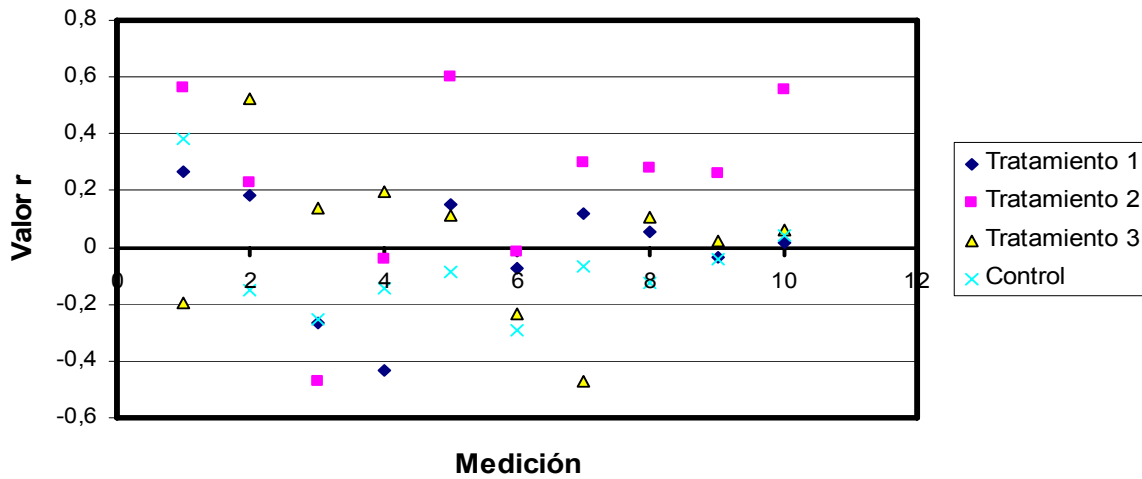
estudio ($r = 0.4019$; $r^2 = 0.1615$), lo cual concuerda con los datos obtenidos por Wong y colaboradores (1995), quienes determinaron que la producción enzimática no se ve influenciada directamente por la biomasa microbiana, sino por la disponibilidad de sustratos y la producción de las enzimas involucradas en los procesos de síntesis de diversos compuestos (Loredo *et al.*, 2004).

Se determinó que en el control y en los tratamientos 1 y 2 existe una correlación positiva entre la altura y el porcentaje de mortalidad ($r > 0$), aunque esta relación es baja (< 0.56), mientras que esta relación se da de manera levemente negativa ($r = 0.1928$) en el tratamiento 3 (Anexo 5, Figura 20).

En los tratamientos 1, 2 y 3 se observó que existe una relación baja positiva con respecto a la relación entre la variable de peso fresco frente a altura y porcentaje de mortalidad ($r < 0.6$), mientras que en el control dicha relación es levemente negativa ($r = -0.1494$ peso fresco-altura; $r = -0.0893$ peso fresco-mortalidad) (Anexo 5, Figura 20). De igual manera se observa entre la relación de la variable peso fresco, con respecto a peso seco y peso seco radicular en todos los tratamientos una relación positiva baja ($r < 0.2817$ peso fresco-peso seco; $r = 0.2601$ peso fresco-peso seco radicular) y una relación levemente negativa en el control ($r = -0.1242$ peso fresco-peso seco; $r = -0.0425$ peso fresco-peso seco radicular) (Anexo 5, Figura 20).

Así mismo, se observó una relación baja positiva entre los tratamientos 1, 2 y 3, con respecto al control, y entre sí mismos ($r < 0.35$), determinando así que no se puede determinar por medio de los resultados obtenidos con cada uno de los tratamientos, si existirá una relación directa predecible entre los mismos (Anexo 5, Figura 20).

Fig 20. Test de Correlación de Pearson



Eje X: 1 = altura-mortalidad; 2 = altura-peso fresco; 3 = altura peso seco; 4 = altura-peso seco radicular; 5 = mortalidad-peso fresco; 6 = mortalidad-peso seco; 7 = mortalidad-peso seco radicular; 8 = peso fresco-peso seco; 9 = peso fresco-peso seco radicular; 10 = peso seco-peso seco radicular

En los tratamientos 1, 2 y el control se observó que existe una relación levemente negativa entre la variable de altura con respecto al peso seco y al peso seco radicular ($r > -0.4726$ y $r > -0.4335$, respectivamente), mientras que en el tratamiento 3 se observó en estas mediciones una relación levemente positiva ($r > 0.1397$ y $r > 0.1941$) (Anexo 5, Figura 20).

Finalmente, se observó que en el tratamiento 3 y el control, existe una influencia negativa baja en la variable de mortalidad con respecto al peso fresco, peso seco y peso seco radicular ($r > 0.4685$), mientras que en los tratamientos 1 y 2, se observa que existe una relación positiva entre mortalidad con respecto a peso fresco y peso seco radicular ($r < 0.6005$) y, por así mismo, una relación levemente negativa entre mortalidad y peso seco ($r > -0.0702$) (Anexo 5, Figura 20).

7. CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de las bacterias fosfato solubilizadoras (BFS) *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas hydrophyla* y de la bacteria ácido láctica *Lactobacillus paracasei*, descartando, por otra parte, la presencia de bacterias fijadores libres de nitrógeno como *Azospirillum* y *Azotobacter*.
- Se determinó que el inóculo mixto produce una cantidad menor de AIA registrando una concentración de 5.826 µg/ml al quinto día de incubación, en comparación al inóculo individual de *B. cepacia* (14.823 µg/ml de AIA) y el producto Microagro el cual genera concentraciones bajas de AIA (2.542 µg/ml) al cuarto día de fermentación.
- El tratamiento 1 a base de compost y cascarilla, brindó un mayor incremento en las mediciones de altura y peso seco (18.77 cm y 0.113 g, respectivamente), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas, en comparación al control y los demás tratamientos; el tratamiento 2 a base de cascarilla y Microagro, brindó un mayor incremento en la medición de peso fresco (3.5 g), con diferencia estadísticamente significativa frente a los demás tratamientos planteados.
- Se observó que los tratamientos donde se utilizaron productos orgánicos como Microagro y compost, o la mezcla de los mismos, se presentó la menor incidencia de síntomas causados por los hongos *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*, en comparación al control (<0.1%).
- Se determinó que dado que existe un coeficiente de correlación bajo ($r > -0.4736$ y $r < 0.6005$), no se puede predecir con precisión si el incremento o decrecimiento en alguna de las variables puede influir de manera directa sobre otra variable.

8. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos se plantean las siguientes recomendaciones:

- Adicionar fuentes orgánicas ricas en triptófano (500 – 2500 µg/ml) como harina de soya (2500 µg/g), salvado de trigo (4500 µg/g) o alfalfa (2000 µg/g) con el fin de incrementar la producción de ácido indol acético (AIA) por *Burkholderia cepacia*.
- Evaluar condiciones presentadas en el medio que influyen en la disminución de la producción de AIA en el bioinoculante.
- Aplicar Microagro en proceso de enraizamiento, dado que presenta una influencia positiva sobre los esquejes de crisantemo, en comparación al control con aporte de AIB.
- Probar diferentes concentraciones de AIA en el proceso de enraizamiento para determinar concentraciones óptimas, tóxicas e inhibitorias de la fitohormona.
- Evaluar la producción de otros PEC como vitaminas y enzimas que puedan ser producidos por los microorganismos aislados de Microagro e intervenir de manera positiva en el proceso de enraizamiento.
- Validar y utilizar técnicas (como HPLC) que permitan evaluar la producción de AIA sobre el suelo y extrapolar la concentración encontrada en el suelo con el potencial de producción de la fitohormona en el bioinoculante.

9. REFERENCIAS

- AGRIOS, G. 2004. Fitopatología. Edit Limusa Mex. Noriega Edit. pp 125-127, 134-169, 236-259, 309-345.
- AGUIRRE, M. 2006. Comunicación personal. Universidad Nacional del Nordeste. Chaco, Argentina. [Consulta 29-11-2006].
- ALMONACID, S., QUINTERO, S., MARTINEZ, M. & BERNAL, J. 1999. Determinación de parámetros de calidad de inoculantes bacterianos basados en formulaciones líquidas elaboradas con cepas productoras de ácido indol acético (AIA). Carrera de Bacteriología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
- ALTOMARE, C. NORVELL, W.A. BJORMAN, T. AND HARMAN, G.E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Rifai 1295-22. Applied and Environmental Microbiology. Vol, 65. No, 7. p. 2926-2933.
- AHMAD, F.; AHMAD, I. & SAGHIR, M. 2005. Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. Turk J Biol. 29: 29-34.
- ANWAR, G. 2000. Production of growth hormones and nitrogenase by diazotrophic bacteria and their effect on plant growth. PhD thesis, University of the Punjab, Lahore. pp. 9-25; 32-44.
- ASOCOLFLORES. 1995. Segundo simposio nacional del crisantemo: plagas y enfermedades. Rionegro, Antioquia, Colombia. pp 23-43, 55-65, 91-99.
- ASOCOLFLORES. 2005. Colombia Tierra de Flores. Rionegro, Antioquia, Colombia. pp. 2, 4.
- BAREA, J. & AZCON-AGUILAR. 1982. La rizósfera: interacciones microbio-planta. An. Edaf. y Agrobiol. XLI (7-8): 1517-1532.
- BASHAN, Y. 1998. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plant. Soil Biology Biochemistry. 18: 297-301.
- BASHAN, Y. 1998. Inoculants of plant grow-promoting bacteria for use in agricultura. Advanced Biotechnology. 16:724-770.

- BASHAN, Y., HOLGUIN, G. & FERRERA, R. 1995. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. II. Bacterias asociativas de la rizósfera. pp 2-14.
- BEEVER, R.; & BOLLARD, E. 1970. The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. J. Gen. Microbiol. Vol, 60. p. 273-279.
- BERNAL, M.; TESTILLANO, P.; ALFONSO, M.; RISUEÑO, MC.; PICOREL, R. & YRUELA, I. 2007. Identification and subcellular localization of the soybean copper P1B-ATPase GmHMA8 transporter. J. Struct. Biol. 158, 46-58.
- BIALEK, K.; MICHALCZUK, L. & COHEN, J. 1992. Auxin biosynthesis during seed germination in *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol. 100: 509-517.
- BONNER, J. & BANDURSKI, R. 1952. Studies of the physiology, pharmacology and biochemistry of the auxins. Annu. Rev. Plant. Physiol. 3:59-86.
- BRIC, J.; BOSTOCK, R. & SILVERSTONE, S. 1991. Rapid *In Situ* Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrana. Appl Environ Microbiol. 57(2): 535–538.
- BUITRAGO, N. & M. RAMÍREZ. 2003. Enraizamiento de acodos aéreos del Guayabo (*Psidium guajava* L.) con ácido naftalen acético. Memorias del XI Congreso Venezolano de Botánica. Mérida, Venezuela.
- CASTILLO, G.; ALTUNA, B.; MICHELENA, G.; SÁNCHEZ-BRAVO, J. & ACOSTA, M. 2005. Contenido del ácido indol acético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. Anales de Biología. 27: 137-142.
- CASTILLO, M.; FRÈITEZ, Y. & BERNAL, N. 2005. Efecto de la auxina AIB en la propagación de azahar de la india (*Murraya paniculata* (L. Jack)) por acodo aéreo. Bioagro. 17 (2) 123-126.
- CHANG, Y., PARK, I., KIM, E., CHO, Y. Y SHIN, K. 2003. Characterization of the Proteolytic Activity of Bacteria Isolated from a Rotating Biological Contactor. The Journal of Microbiology. Vol. 41, No. 2. Pp.73-77.
- CICCILLO, F.; FIORE, A.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S. & CHIARINI, L. 2002. Effects of two different application methods of Burkholderia ambifaria MCI 7 on plant growth and rhizospheric bacterial diversity. Environ Microbiol. 4 (4):238-45.
- COMAI, L. & KOSUGE, T. (1980) Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid

in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *J. Bacteriol.* 143, 950–957.

- CORONADO, M.; TESTILLANO, P.; WILSON, C.; VICENTE, O.; HEBERLEBORS, E. & RISUEÑO, M. 2007. The in situ molecular identification of the Ntf4-MAP kinase expression sites in maturing and germinating pollen. *Biol. Cell.* 99, 209-221.
- COSTACURTA, A.; KEIJERS, V. & VANDERLEYDEN, J. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol. Gen. Genet.* 243, 463–472.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.; MONTEIRO, A. & SANDBERG, G. 1988. Analysis of Indole-3-Acetic Acid and Related Indoles in Culture Medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol.* 1988 November; 54(11): 2833–2837.
- CULTIVOS DEL NORTE. 2005. Comunicación Personal. Tocancipá, Cundinamarca. Colombia.
- CULTIVOS DEL NORTE. 2006. Comunicación Personal. Tocancipá, Cundinamarca. Colombia.
- DASHTI, N.; ZHANG, F.; HYNES, R. & SMITH, D. 1997. Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. *Plant Soil.* 18: 33-41.
- DAVIES, P. 1988. Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. Segunda Edición. Kluwer Academic Publishers. pp. 1-13, 39-66, 214-228, 415-433, 509-531, 572-598.
- DE MAN, J.; ROGOSA, M. & SHARPE, M. 1960. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bact. Vol, 23.* p. 130-135.
- DÉFAGO, G. & HASS, D. 1990. Pseudomonads as antagonists of soilborne plant pathogens: mode of action and genetic analysis. *Soil Biochem.* 6:249–291.
- DELEITO, C.S.R.; CARMO, M.G.F.; FERNANDES, M.C.A y ABBOUD, A.C.S. 2005. Ação bacteriostática do biofertilizante Agrobio *in vitro*. *Horticultura*

Brasileira, vol.23. N° 2. pp.281-284.

- DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADÍSTICA (DANE). 2006. Comercio exterior-exportaciones. Enero – Marzo. Comunicado de Prensa. Bogotá, 9 de Junio de 2006.
- DÍAZ, P.; FERRARA, R.; ALMARAZ, J. & ALCANTAR, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. Instituto de Recursos Naturales. Montecillo, México. 19: 327-335.
- DIRECCION NACIONAL DE ESTUPEFACIENTES (DNE). 2005. Las sustancias químicas y el tráfico de estupefacientes. Ministerio del Interior. pp. 18, 25, 42, 118-119.
- DUBEY, S. 1998. Response of soybean (*Glycine max*) to biofertilizers with and without nitrogen, phosphorus and potassium on swell-shrink soil, Indian J. Agron. 43: 546-549.
- ELSTON, R. & JOHNSON, W. 1990. Principios de bioestadística. Editorial El Manual Moderno. México D.Fp. 183-186.
- EL-TARABILY, K. & SIVASITHAMPARAM, K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Mycoscience. Vol 47 (1): 1340-3540.
- ESCOBAR, M. 2002. Fundamentos de Microbiología. ED Centro Editorial Javeriano. Edición 3ª, p.119.
- ESTRADA, P., BUSTILLOS, R. y CABALLERO, J. 2001. *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide environmental and Geographic Distribution. Applied and environmental microbiology. Vol. 67, No 6.pp. 2790-2798.
- EZZIYYANI, M.; SANCHEZ, C.; REQUENA, M.; AHMED, A. & CANDELA, M. 2004. Evaluación del control de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. Anales de Biología. 26: 61-68.
- FALCAO, J., VAN VEEN, A. Y VAN ELSAS, J.2004. Multivariate Analyses of *Burkholderia* Species in Soil: Effect of Crop and Land Use History. Applied and Environmental Microbiology. Vol.70, No. 7.pp. 4012–4020.

- FENGLEROWA, W. 1965. Simple method for counting Azotobacter in soil samples Acta Microb. Pol. 14 (21)203.
- FENSTER, K.; PARKIN, K. & STEELE, J. 2003. Intracellular esterase from *Lactobacillus casei* LILA: Nucleotide sequencing, purification, and characterization. J. Dairy Sci. 86: 118-1129.
- FORERO, A.; RODRIGUEZ, E.; POUTOU, R.; PEDROZA, A. & MATIZ, A. 2001. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias termofílicas aerobias con actividad proteolítica a partir de pilas de compost en fase termofílica. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
- FOOD & AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 1983. Technical handbook on symbiotic nitrogen fixation legume/*Rhizobium*. Rome, Italy.
- GADAGI, R.; CHAUHAN, M. & TONGMIN, S. 2002. Influence of diazotrophicus *Azospirillum* on growth, flower yield and N uptake of *Chrysanthemum*. Symposium No. 12. Paper No. 645.
- GADAGI, R.; KRISHNARAJ, P.; KULKARNI, J. & TONGMIN, S. 2003. Biodiversity of *Azospirillum* in ornamental rhizosphere soils of Karnataka. Symposium No. 09. Paper No. 537.
- GAUZE, G. F. 1965. Biochemical mechanisms of action of antitumor antibiotics in relation to the problem of the search for new active preparations. Vestn. Akad. Med. Nauk SSSR 20: 46-52.
- GLICKMANN, E. & DESSAUX, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 61 (2): 763-796.
- GRAY, P. 1951. Some advances in microbiological control for beer quality. - Wallerstein Lab. Comm. 14: 169-183.
- HALDA-ALIJA. L. 2003. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. Can. J. Microbiol./Rev. can. microbiol. 49(12): 781-787.
- HARTMANN, H.; KESTER, D.; DAVIES, F. & GENEVE, R. 2002. Plant

propagation. Principles and Practices. Prentice Hall. Upper Saddle River. New Jersey.

- HAWKEY, P.; MCCORMICK, A. & SIMPSON, R. 1986. Selective and differential medium for the primary isolation of members of the proteae. J. Clin. Microbiol. 23; 600-603.
- HEBBAR, K.; MARTEL, H. & HEULIN, T. 1994. *Burkholderia cepacia*, a plant growth promoting rhizobacterial associate of maize, p. 201–203. In Proceedings of the Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. CSIRO Australia, Adelaide, Australia.
- IGUAL, J., VALVERDE, A., CERVANTES, E., VELÁZQUEZ, E. 2001. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. Agronomie 21: 561-568.
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION (ICONTEC). 2004. Normatización para insumos agrícolas. Santa Fe de Bogotá. p. 59.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). 1997. Agricultura ecológica. Santa Fe de Bogota. Produmedios. pp 19-21.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). 1996. Normatividad Colombiana sobre insumos agrícolas. Santa Fe de Bogotá. pp 18-21, 56, 60, 101.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). 2004. Resolución no. 00074 (11 de junio de 2004).
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). 2004. Resolución no. 00375 (27 de febrero de 2004).
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). 2004. Empresas de fertilizantes registrados ante el ICA a Junio de 2004.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). 2006. Manual de buenas prácticas de distribución y manejo para insumos agropecuarios. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. pp. 12-17.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). 1992. Milk and milk products - Enumeration of yeast and molds - Colony count

technique at 25 °C. - International Standard ISO/DIS 661.

- JEWEL, N. 2003. Purification and characterization of a novel protease from *Burkholderia* strain 2.2 N. Tesis de maestria en microbiologia. Instituto Politecnico de Virginia. Blacksburg, Virginia.pp. 3-7.
- JIMENEZ, R., VIRGEN, G., TABARES, S. & OLALDE, V. 2000. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. *Can. J. Microbiology* 41: 109.
- KING, E.; WARD, M. & RANEY, D. 1954. Two simple media for the demonstratoin of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* Vol, 44. p. 301-307.
- KLOEPPER, J & SCHROTH, M. 1989. *Phytopathology* 73: 217-219.
- KOSHIBA, T. & MATSUYAMA, H. 1993. An *in vitro* system of indole-3-acetic acid formation from tryptophan in maize (*Zea mays*) coleoptile extracts. *Plant Physiol.* 102: 1319-1324.
- KOBAYASHI, M., SUZUKI, T., FUJITA, T., MASUDA, M. & SHIMIZU, S. (1995) Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 714–718.
- KOSHIBA, T.; SAITO, E.; ONO, N.; YAMAMOTO N. & SATO, M. 1996. Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. *Plant Physiol.* 110: 781-789.
- KUMAR, V. Y NARULA, N.1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutans. *Biol. Fertil. Soils.* 28: 301-305.
- LARSON, R. 1980. *Introduction to Floriculture.* N.Y., Academic Press pp 325-368, 422.
- LEE, S.; FLORES, M.; CONTRERAS, M.; GARCIA, L.; ESCAMILLA, J. & KENNEDY, C. 2004. Indole-3-Acetica Acid biosíntesis is deficiente in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutation in cytochrome c biogenesis genes. *Journal of Bacteriorlogy.* 186: 5384-5391.
- LESSIE, T.; HENDRICKSON, G.; MANNING, B. & DEVEREUX, R. 1996.

Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. FEMS Microbiol. Lett. 144:117–128.

- LOPEZ, M.; PEREZ, V.; MARTINEZ, M. & QUEVEDO, B. 2006. Evaluación de un medio de cultivo no comercial para la producción de un bioinoculante empleado en un cultivo de flores. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
- LOREDO, C., LÓPEZ, L & ESPINOSA, D. 2004. Plant Growth-Promoting Bacteria in Association with Graminaceous Species: A Review. CIRNE-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. San Luis Potosí, México. 12: 89-102.
- LOWE, P. y ARENDT, K. 2004. The Use and Effects of Lactic Acid Bacteria in Malting and Brewing with Their Relationships to Antifungal Activity, Mycotoxins and Gushing: A Review. J. Inst. Brew. 110(3). 163–180.
- MAGIE, A.R., WILSON, E.E. & KOSUGE, T. (1963) Indoleacetamide as an intermediate in the synthesis of indoleacetic acid in *Pseudomonas savastanoi*. *Science* 141: 1281–1282.
- McCORMACK, P. WILDMAN, G. y JEFFRIES, P. 1994. Production of Antibacterial Compounds by Phylloplane-Inhabiting Yeasts and Yeastlike Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, No. 3. pp. 927-931.
- McSPADDEN. B. 2002. Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA. Plant Management Network. 10.1094/PHP-2002-0510-01.
- MERCOSUR. 2002. Resolución N° 28-02 Disposiciones para el Comercio de Inoculantes. Buenos Aires, Argentina.
- MESA, F. 1999. Temas de estadística inferencial: aplicados al medio ambiente. Universidad Tecnológica de Pereira. pp. 56-58.
- MICHALCZUK, L.; RIBNICKY, D.; COOKE, T. & COHEN, J. 1992. Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiol.* 100: 1346-1353.
- MOK, D. & MOK, N. 2001. Cytokinin metabolism and action: Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. Vol. 52: 89-118

- MONTSERRAT, R.; VENDRELL, M. & OLIVILLA, C. 2001. Determinación de ácido abscísico, ácido indolacético, zeatina y ribósido de zeatina en hojas desarrolladas de *Gerbera jamesonii* cv *Bolus* y su variación con la edad. Investigación agraria. Producción y protección vegetales. Vol. 16 (3): 333-342.
- NORMANLY, J.; COHEN, J. & FINK, G. 1993. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 10355–10359.
- NOVO, R. 1993. Microbiología y química de suelos. Instituto superior de ciencias agropecuarias de La Habana, Cuba.
- ORIUS, 2006. <http://www.oriusbiotecnologia.com>. [Consulta: 29-11-2006]
- OBERHANSLI, T., DEFAGO, G. & HAAS, D. (1991) Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2273–2279.
- OTALORA, J; PATIÑO, L. & MARTINEZ, M. 2003. Estandarización de prueba para la detección de fosfatasa producida por bacterias solubilizadoras de fosfatos. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias básicas. Departamento de Microbiología. Bogotá. Colombia. Pp.32-33,42,48-50,69-72,78-81.
- PARKER, J. & GURIAN-SHERMAN, D. 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. Annual review of phytopathology. Vol. 39: 225-258.
- PEREIRA, J.; CAVALCANTE, V.; BALDANI, J. & DOBEREINER, J. 1988. Sorghum and rice inoculation with *Azospirillum* sp. Y *Herbaspirillum seropedicae* in field. Plant Soil. 110: 269-274.
- PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J. & VAN ONCKELEN, H. 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol. Plant-Microb Interact.* 6, 609–615.
- RAISMAN, J. 2006. Comunicación personal. Universidad Nacional Del Nordeste. Chaco, Argentina. [Consulta 29-11-2006].
- RAMETTE, A., LIPUMA, J. y THIEDJE, J. 2005. Species Abundance and

Diversity of *Burkholderia cepacea* Complex in the Environment. Applied and environmental microbiology. Vol. 71, No. 3. pp 1193-1201.

- RAPP, M. 1974. Indikatorzustze zur Keimdifferenzierung auf Wrze- und Malzextrakt-Agar. Milchwiss. Vol, 29. p. 341-344.
- REKOSLAVSKAYA, N. & BANDURSKI, R. 1994. Indole as a precursor of indole-3-acetic acid in *Zea mays*. *Phytochemistry* 35, 905–909.
- REPUBLICA DE CHILE MINISTERIO DE ECONOMÍA. 1999. Solicitud 691-00, Departamento de Propiedad Industrial.
- RICHARDSON, J.; STEAD, D.; ELPHINSTONE, J. y COUTTS, R. 2002. Diversity of *Burkholderia* isolates from woodland rhizosphere environments. *Journal of applied microbiology*. 93: 616-630.
- RICHARDSON, A., HADOBAS P., HAYES J., O'HARA, C., SIMPSON, R. 2001. Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil micro-organisms, *Plant and Soil* 229: 47-56.
- RIVES, H.; CABALLERO, A.; HERNANDEZ, A. & HEYDRICH, M. 2004. Characterization of rhizobacteria associated to maize crop in IAA, siderophores and salicylic acid metabolite production. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. 6, no. 1, pp. 6-13.
- RODRÍGUEZ, H., FRAGA, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, *Biotechnol. Adv.* 17: 319-339.
- RODRÍGUEZ, M. 2006. Determinación de ácido indol acético (AIA). Procedimiento Operativo Estándar. Laboratorio Microbiología Ambiental. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. p. 1-4.
- ROSNER, B. 2006. *Fundamentals of Biostatistics*. Sixth Edition. Editorial Thomson. Belmont, United States of America. p. 492-469.
- SALKOWSKI, E. 1889. Ueber die Bildung von flüchtigen Fettsäuren bei der ammoniakalischen Harnsäuregärung. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* 13: 264-274.
- SALINGER, J. 1991. *Producción Comercial de Flores*. Zaragoza, España. Ed. Acribia pp 29-41, 127-139.

- SALISBURI, F. 1994. Fisiología vegetal. Ed. Grupo editorial Iberoamericano. Pp 319-325, 395-423.
- SANTANA, M.; VASQUEZ, C.; MARTINEZ, M. & FRANCO, M. 2002. Evaluación de cepas de *Azotobacter* sp. y de bacterias solubilizadoras de fosfato (BFS), como biofertilizante mixto en un cultivo de cristantero (*Chrysanthemum morifolium* var. Regal Suerte). Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
- SAVÉ, R.; VENDRELL, M. & OLIVELLA, C. 2001. Determinación de ácido abscísico, ácido indolacético, zeatina y ribósido de zeatina en hojas desarrolladas de *Gerbera jamesonii* cv Bolus y su variación con la edad. Universidad de la Rioja Investigación agraria. Producción y protección vegetales. Vol. 16 (3): 333-342.
- SCHUSTER, J. 2000. Diseases in *Chrysanthemum* sp. University of Illinois. p. 22-39.
- SERVICIO NACIONAL DE APRENDIZAJE (SENA). 2004. Guía de Buenas Prácticas Agrícolas para la producción de productos agrícolas limpios en la Sabana de Bogotá. Componente 7: Sello de Calidad y Buenas Prácticas Agrícolas. Bogotá D.C. pp. 14-42.
- SOMERS, E.; PTACEK, D.; GYSEGOM, P.; SRINIVASAN, M. & VANDERLEYDEN, J. 2005. *Azospirillum brasilense* Produces the Auxin-Like Phenylacetic Acid by Using the Key Enzyme for Indole-3-Acetic Acid Biosíntesis. Appl. Envir. Microbiol. 2005 71: 1803-1810.
- STACE, C. 2003. Plant taxonomy and biosistematics. Quinta edición. Cambridge University Press. pp 163.
- STRÖM, K. 2005. Fungal Inhibitory Lactic Acid Bacteria.Characterization and Application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393. Tesis de doctorado. Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas. Estocolmo, Suecia. Pp.8-13.
- SURICO, G. & IACOBELLIS, N. 1992. Phytohormones and olive knot disease: molecular signals in plant microbe communications. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 209-227.

- SYLVIA, D.M. 1998. Principles and applications of soil microbiology. Ed. Prentice Hall Inc. New Jersey, USA. p. 259-264, 297, 370, 378, 404-406, 428-429.
- TABACCHIONI, S.; BEVIVINO, A.; CHIARINI, L.; VISCA, P. & DEL GALLO, M. 1993. Characteristics of two rhizosphere isolates of *Pseudomonas cepacia* and their potential plant-growth-promoting activity. *Microb. Releases* 2:161–168.
- TAHMATSIDOU, V.; O'SULLIVAN, J.; CASSELLS, A.; VOYIATZIS, D. & PAROUSSI, G. 2006. Comparison of AMF and PGPR inoculants for the suppression of *Verticillium* wilt of strawberry (*Fragaria ananassa* cv. Selva). *Applied Soil Ecology*. Vol: 32 (3): 316-324.
- VANDEPUTTE, O.; ÖDEN, S.; MOL, A.; VEREECKE, D.; GOETHALS, K.; EL JAZIRI, M. & PRENSEN, E. 2005. Biosynthesis of Auxin by the Gram-Positive Phytopathogen *Rhodococcus fascians* Is Controlled by Compounds Specific to Infected Plant Tissues. *Appl. Envir. Microbiol.* 2005 71: 1169-1177.
- VASANTHAKUMAR, A. & McMANUS, P. 2004. Indole-3-Acetic Acid-Producing bacteria associated with cranberry ítem gall. *Phytopathology*. 94: 1164-1171.
- VIDIALE, H. 1983. Producción de Flores y Plantas Ornamentales. Madrid, Mundi-Prensa 260 pp 42-69.
- WILLIAMS, P. & DE MALLORCA, M. 2001. Abscisic acid and gibberellin-like substances in roots and root nodules of *Glycine max*. *Plant and Soil*. 65: 1573-5036.
- WINDER, R. ET AL. 2003. Bioinoculants in Agriculture: new perspectives and applications. *Bioc Sci Tech* p. 155-169.
- WINDSOR, R. & ASHFORD, W. 2006. *Salmonella* infection in the African elephant and the black rhinoceros. *Tropical Animal Health and Production*. Vol 4 (4): 214-219.
- WONG, T.; PEI, H.; BANCROFT, K. & CHILDERS, G. 1995. Diauxic Growth of *Azotobacter vinelandii* on Galactose and Glucose: Regulation of Glucose Transport by Another Hexose. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 61 (2) 430-433.
- WRIGHT, A.; SAMPSON, M.; NEUFFER, M.; MICHALCZUK, L.; SLOVIN, J. & COHEN, J. 1991. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize *orange*

pericarp, a tryptophan auxotroph. *Science* 254: 998-1000.

- ZAKHAROVA, E.; SHCHERBAKOV, A.; BRUDNIK, V.; SKRIPKO, N.; BULKHIN, N. & IGNATOV, V. 1999. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: Insights from quantum chemistry. *Eur. J. Biochem.* 259, 572-576.
- ZHANG, H., FU, C. ZHENG X. HE1, D., SHAN, L. Y ZHAN, X. 2004. Effects of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner in combination with sodium bicarbonate on biocontrol of postharvest green mold decay of citrus fruit. *Botanical Bulletin of Academia Sinica.* 45: 159-164.
- ZIMMER, W.; APARICIO, C. & ELMERICH, C. 1991. Relationship between tryptophan biosynthesis and indole-3-acetic acid production in *Azospirillum*: identification of a *trpGDC* cluster. *Mol. Gen. Genet.* 229: 41-51.

ANEXOS

Anexo 1. Medios de Cultivo

MEDIO YMA (Scharlau®)

KH ₂ PO ₄ (Erba)	0.8g/L
K ₂ HPO ₄ (Merck)	0.2g/L
MgSO ₄ . 7H ₂ O (Erba)	0.2g/L
NaCl (Erba)	0.1g/L
CaCl ₂	0.1g/L
Manitol	10g/L
Extracto de levadura	1g/L
Agar-Agar (BBL)	15g/L

pH final 6.5

AGAR NUTRITIVO (Scharlau®)

Extracto de carne	1g/L
Extracto de levadura	2g/L
Peptona	5g/L
Cloruro de sodio	5g/L
Agar-agar	15g/L

pH final 7.2

MEDIO SMRS1 (López et al., 2006)

Glucosa (Erba)	10g/L
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (Erba)	5g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Mallinckrout)	0.5g/L
KCl	0.2g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O (Erba)	0.3g/L
MnSO ₄	0.004g/L
FeSO ₄	0.002g/L
NaCl (Erba)	20g/L
Extracto de levadura (Difco)	0.5g/L
Púrpura de bromocresol	0.1g/L

pH final 7.2

MEDIO ASHBY-MANITOL (Fenglerowa, 1965)

Manitol	5g/L
Fosfato dipotásico	0.2g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O (Erba)	0.2g/L
NaCl (Erba)	0.2g/L
Sulfato de calcio	0.1g/L
Carbonato de calcio	0.1g/L

pH final 7.2

MEDIO EXTRACTO DE MALTA (Scharlau®)

Extracto de malta	20.0g/L
Peptona	5.0g/L
Agar-Agar	15.0g/L

pH final 7.2

MEDIO MRS (Merck®)

Peptona de caseína	10.0g/L.
Extracto de carne	8.0g/L
Extracto de levadura	4.0g/L
D(+)-glucosa	20.0g/L
Fosfato hidrógeno dipotásico	2.0g/L
Tween® 80	1.0g/L
Citrato hidrógeno de diamonio	2.0g/L
Acetato de sodio	5.0g/L
Sulfato de magnesio	0.2g/L
Sulfato de manganeso	0.04g/L
Agar-agar	14.0g/L

pH final 7.2

AGAR PDA (Scharlau®)

Extracto de papa	500ml/l
D (+) glucosa	10.0g/l
Agar-agar	17.0g/l

pH final 7.2

CALDO TRIPTICASA SOYA (Merck®)

<i>Peptona de caseína</i>	17.0g/L
<i>Peptona de soya</i>	3.0g/L
<i>Glucosa</i>	2.5g/L
<i>Cloruro de sodio</i>	5.0g/L
<i>Fosfato hidrógeno dipotásico</i>	2.5g/L

pH final 7.2

MEDIO KING B (King et al., 1954)

Peptona proteosa #3	5g/L
Glicerina/glicerol	0.2g/L
Fosfato tri-potasio tri-hidratado	0.2g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2g/L
Agar-agar	0.1g/L

pH final 7.2

Anexo 2. Reactivo de von Urk Salkowski (Modificación realizada por Bric *et al.*, 1991 de la composición original realizada por Salkowski 1889)

Reactivo de Salkowski

4 ml de Reactivo + 1 ml de muestra

H ₂ SO ₄ Concentrado	150mL
Agua destilada	250mL
FeCl ₃ 0.5M en H ₂ O destilada	7.5mL

Reactivo de Salkowski, composición original

2 ml de Reactivo + 1 ml de muestra

HClO ₄ Concentrado	142mL
Agua destilada	250mL
FeCl ₃ 0.5M en H ₂ O destilada	7.5mL

Anexo 3. Lectura de absorbancia a 530 nm comparativa de dos curvas de calibración de AIA evaluadas con dos preparaciones del reactivo de Salkowski. Cada lectura corresponde a un promedio de 3 repeticiones.

Concentración AIA (ug/ml)	R. Salkowski original (HClO ₄ 37% p/v)	R. Salkowski modificado (H ₂ SO ₄ 35% p/v)
0	0	0
5	0,095	0,153
10	0,191	0,345
15	0,284	0,52
20	0,367	0,688
25	0,441	0,853
30	0,527	0,992

Para estas lecturas se determinó la ecuación de la recta y el valor de R² para cada una de las curvas. Fueron los siguientes:

- Curva reactivo de Salkowski preparación original (Salkowski, 1889)

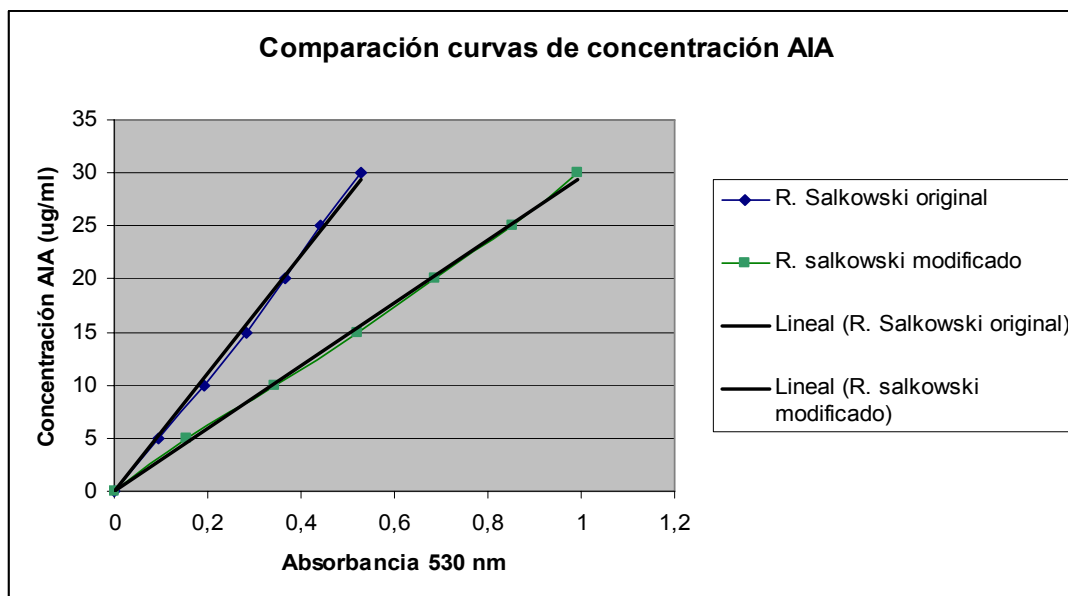
$$Y = 0.0337x + 0.0017$$

$$r^2 = 0.9985$$

- Curva reactivo de Salkowski preparación modificada (Bric *et al.*, 1991)

$$Y = 0.0175x + 0.0098$$

$$r^2 = 0.998$$



Anexo 4. Resultados de absorbancia y concentración obtenidos en 7 mediciones, cada una con 3 repeticiones, para evaluar la concentración de AIA (530 nm) en inóculos individuales y un cultivo mixto de microorganismos aislados del bioinoculante.

Microorganismo	Medición	Día						
		0	1	2	3	4	5	6
<i>C. laurentii</i>	Absorbancia	0,000	0,017	0,035	0,065	0,080	0,065	0,070
	Concentración	0,384	1,296	2,209	3,805	4,595	3,805	4,068
<i>A. hydrophyla</i>	Absorbancia	0,000	0,028	0,040	0,065	0,066	0,048	0,104
	Concentración	0,384	1,875	2,463	3,805	3,858	2,911	5,832
<i>B. cepacia</i>	Absorbancia	0,000	0,000	0,090	0,067	0,274	0,124	0,124
	Concentración	0,384	0,384	5,121	3,893	14,823	6,893	6,893
<i>L. paracasei</i>	Absorbancia	0,000	0,028	0,039	0,065	0,063	0,040	0,000
	Concentración	0,384	1,840	2,419	3,805	3,674	2,489	0,384
Cultivo mixto	Absorbancia	0,000	0,000	0,001	0,040	0,077	0,093	0,000
	Concentración	0,384	0,384	0,454	2,507	4,419	5,296	0,384
Microagro	Absorbancia	0,000	0,008	0,025	0,041	0,012	0,008	0,001
	Concentración	0,384	0,805	1,700	2,542	1,016	0,805	0,437
Control Positivo	Absorbancia	0,000	0,059	0,137	0,080	0,341	0,217	0,117
<i>A. vinelandii</i>	Concentración	0,384	3,507	7,595	4,612	18,332	11,823	6,560
Control Negativo	Absorbancia	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	0,078
<i>S. enteriditis</i>	Concentración	0,384	0,384	0,384	0,384	0,384	1,911	4,489

Resultados de análisis de estadística lineal realizada sobre los datos obtenidos

Microorganismo	Medición	Media	Desv. Estándar	Grupos
<i>C. laurentii</i>	Absorbancia	0,0474	0,0303	
	Concentración	2,8805	1,5944	a
<i>A. hydrophyla</i>	Absorbancia	0,0500	0,0327	
	Concentración	3,0183	1,7226	a
<i>B. cepacia</i>	Absorbancia	0,0969	0,0937	
	Concentración	5,4845	4,9306	b
<i>L. paracasei</i>	Absorbancia	0,0334	0,0264	
	Concentración	2,1424	1,3893	a
Cultivo mixto	Absorbancia	0,0302	0,0404	
	Concentración	1,9757	2,1289	c
Microagro	Absorbancia	0,0136	0,0147	
	Concentración	1,0985	0,7716	c
Control Positivo	Absorbancia	0,1360	0,1129	
<i>A. vineladii</i>	Concentración	7,5446	5,9415	b
Control Negativo	Absorbancia	0,0153	0,0297	
<i>S. enteriditis</i>	Concentración	1,1887	1,5627	d
Blanco	Absorbancia	0,0000	0,0000	
	Concentración	0,3842	0,0000	

Comparación de rangos de medias

Hay 3 grupos en los cuales las medias no son significativamente diferentes una de otra.

Nivel de rechazo 0.050

Valor crítico z 2.64

Valores críticos varían entre las comparaciones de medias

Anexo 5. Análisis estadístico

DETERMINACION DE AIA

ALTURA

1. Probar normalidad con el test de **Shapiro-Wilk**

H₀ = Todos los tratamientos se comportan normalmente

H_i = Los tratamientos no se comportan normalmente

TEST DE NORMALIDAD SHAPIRO-WILK

Variable	N	W	P
Día 12(control)	70	0.8963	0.0000
Día 12(Tto 1)	63	0.9577	0.0296
Día 12(Tto 2)	63	0.9547	0.0211
Día 12(Tto 3)	63	0.9446	0.0068

Conclusión: Todos los datos no se distribuyen normalmente porque $p < 0.05$

2. Probar si hay diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de altura de los esquejes en la medición final del enraizamiento en los tratamientos.

Ho: $\mu_C = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

Hi: al menos un par es diferente

Se rechaza Ho si el valor de p es menor a 0.05

Análisis de Varianza de una vía no paramétrico Kruskal-wallis

Variable	Media	Muestra	Rango	Tamaño
Día 12(control)			151.5	70
Día 12(Tto 1)			178.3	63
Día 12(Tto 2)			104.7	63
Día 12(Tto 3)			83.1	63
TOTAL			130.0	259

STADISTICO KRUSKAL-WALLIS	63.8913
VALOR-P, USANDO APROXIMACION CHI-CUADRADO	0.0000

AOV Paramétrico aplicado a los rangos

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	357990	119330	27.98	0.0000
Within	255	1087615	4265.16		
Total	258	1445605			

Número total de valores que fueron unidos 238

Max. Dif. permitida entre uniones 0.00001

Casos incluidos 259 Casos omitidos 25

Conclusión: Existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de altura de los esquejes en al medición final del enraizamiento en los tratamientos ($p < 0.001$)

Para saber cual o cuales tratamientos están ejerciendo la diferencia se realiza el test de diferencia de medias.

Comparación de rangos de medias

Variable	Mean Rank	Homogeneous Groups
T31	178.25	+
T3C	151.53	+
T32	104.74	.. +
T33	83.087	.. +

Hay 2 grupos en los cuales las medias no son significativamente diferentes una de otra.

Nivel de rechazo 0.050

Valor crítico z 2.64

Valores críticos de las diferencias varían entre las comparaciones debido a tamaños de muestras diferentes

PESO FRESCO

1. Probar normalidad con el test de **Shapiro-Wilk**

H_0 = Todos los tratamientos se comportan normalmente

H_i = Los tratamientos no se comportan normalmente

TEST DE NORMALIDAD SHAPIRO-WILK

Variable	N	W	P
Día 12(control)	30	0.9392	0.0867
Día 12(Tto 1)	23	0.9884	0.9924
Día 12(Tto 2)	27	0.9627	0.4259
Día 12(Tto 3)	24	0.9664	0.5805

Conclusión: Todos los datos se distribuyen normalmente porque $p > 0.05$

2. Probar si hay diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de peso fresco de los esquejes en la medición final del enraizamiento en los tratamientos.

Ho: $\mu_C = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

Hi: al menos un par es diferente

Se rechaza Ho si el valor de p es menor a 0.05

Análisis de Varianza de una vía no paramétrico Kruskal-wallis

Variable	Media Muestra	Rango	Tamaño
Día 12(control)		35.1	30
Día 12(Tto 1)		52.3	23
Día 12(Tto 2)		69.3	27
Día 12(Tto 3)		55.6	24
TOTAL		52.5	104

ESTADISTICO KRUSKAL-WALLIS 18.7602
VALOR-P, USANDO APROXIMACION CHI-CUADRADO 0.0003

AOV Paramétrico aplicado a los rangos

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	17011.8	5670.60	7.42	0.0002
Within	100	76388.7	763.887		
Total	103	93400.5			

Número total de valores unidos 95

Max. Diff. permitida entre uniones 0.00001

Casos incluidos 104 casos omitidos 180

Conclusión: Existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de peso fresco de los esquejes en la medición final del enraizamiento en los tratamientos ($p < 0.0001$)

Para saber cual o cuales tratamientos están ejerciendo la diferencia se realiza el test de diferencia de medias.

Comparación de los rangos medios

Variable	Mean Rank	Homogeneous Groups
T32	3.5074	+
T33	3.1625	+
T31	3.0739	++
T3C	2.6533	..+

Hay 2 grupos en los cuales no son significativamente diferentes entre uno de otro.

Valor t crítico 2.692 Nivel de rechazo 0.050

Errores standard y valores críticos de las diferencias varían entre las comparaciones debido a los tamaños muestrales.

PESO SECO

1. Probar normalidad con el test de **Shapiro-Wilk**

H₀ = Todos los tratamientos se comportan normalmente

H_i = Los tratamientos no se comportan normalmente

TEST DE NORMALIDAD SHAPIRO-WILK

Variable	N	W	P
Día 12 (control)	50	0.5909	0.0000
Día 12 (Tto 1)	45	0.5925	0.0000
Día 12 (Tto 2)	45	0.6803	0.0000
Día 12 (Tto 3)	45	0.6634	0.0000

Conclusión: Todos los datos se distribuyen normalmente porque $p > 0.05$

2. Probar si hay diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de peso seco de los esquejes en la medición final del enraizamiento en los tratamientos.

H₀: $\mu_C = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

H_i: al menos un par es diferente

Se rechaza H₀ si el valor de p es menor a 0.05

Análisis de Varianza de una vía no paramétrico Kruskal-wallis

Variable	Mean	Sample Rank	Size
Día 12 (control)		89.8	50
Día 12 (Tto 1)		90.6	45
Día 12 (Tto 2)		96.0	45
Día 12 (Tto 3)		96.0	45
TOTAL		93.0	185

Estadístico Kruskal-wallis 0.7721
Valor-p, usando aproximación chi-cuadrado 0.8561

AOV Paramétrico aplicado a los rangos

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	1583.41	527.804	0.25	0.8583
Within	181	375781	2076.14		
Total	184	377364			

Número total de valores que fueron unidos 185

Max. Dif. Permitida entre uniones 0.00001

Casos incluidos 185 Casos omitidos 111

Conclusión: No existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de peso seco de los esquejes en al medición final del enraizamiento en los tratamientos ($p > 0.05$)

Para saber cual o cuales tratamientos están ejerciendo la diferencia se realiza el test de diferencia de medias.

Comparación de rangos medios

Variable	Mean Rank	Homogeneous Groups
Día 12 (Tto 3)	96.022	+
Día 12 (Tto 2)	95.956	+
Día 12 (Tto 1)	90.622	+
Día 12 (control)	89.760	+

No hay diferencias entre los pares de medias.

Nivel de rechazo 0.050

Valor crítico z 2.64

Valores críticos varían entre las comparaciones de medias

PESO SECO RADICULAR

1. Probar normalidad con el test de **Shapiro-Wilk**

H₀ = Todos los tratamientos se comportan normalmente

H_i = Los tratamientos no se comportan normalmente

TEST DE NORMALIDAD SHAPIRO-WILK

Variable	N	W	P
Día 12 (control)	50	0.7322	0.0000
Día 12 (Tto 1)	50	0.7953	0.0000
Día 12 (Tto 2)	50	0.8290	0.0000
Día 12 (Tto 3)	50	0.7771	0.0000

Conclusión: Todos los datos no se distribuyen normalmente porque $p < 0.05$

2. Probar si hay diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de peso seco radicular de los esquejes en la medición final del enraizamiento en los tratamientos.

H₀: $\mu_C = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

H_i: al menos un par es diferente

Se rechaza H₀ si el valor de p es menor a 0.05

Análisis de Varianza de una vía no paramétrico Kruskal-wallis

Variable	Mean	Sample Rank	Size
Día 12 (control)	101.1	50	50
Día 12 (Tto 1)	106.5	50	50
Día 12 (Tto 2)	99.1	50	50
Día 12 (Tto 3)	95.3	50	50
TOTAL	100.5	200	

Estadístico Kruskal-wallis 1.1907

Valor-p, usando aproximación chi-cuadrado 0.7552

AOV Paramétrico aplicado a los rangos

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	3263.53	1087.84	0.39	0.7580
Within	196	542162	2766.13		
Total	199	545426			

Número total de valores unidos 199
 Max. Dif. Permitida entre uniones 0.00001
 Casos incluidos 200 Casos omitidos 0

Conclusión: No existe diferencia estadísticamente significativa en los valores medios de peso seco radicular de los esquejes en al medición final del enraizamiento en los tratamientos ($p > 0.05$)

Para saber cual o cuales tratamientos están ejerciendo la diferencia se realiza el test de diferencia de medias.

Comparación de rangos medios

Variable	Mean	Homogeneous Rank	Groups
Día 12 (Tto 1)	106.53		+
Día 12 (control)	101.06		+
Día 12 (Tto 2)	99.060		+
Día 12 (Tto 3)	95.350		+

No hay diferencias significativas entre las medias.

Nivel de rechazo 0.050
 Valor crítico z 2.64
 Valor crítico de comparación 30.540

Test de Correlación de Pearson

PRODUCCIÓN AIA – BIOMASA

CORRELACION (PEARSON)

	AIA
BIOMASA	0.4019

CASOS INCLUIDOS 60 CASOS OMITIDOS 12

TRATAMIENTO 1

CORRELACION (PEARSON)

	ALTU	MORT	PFRES	PSEC
MORT	0.2691			
PFRES	0.1824	0.1529		
PSEC	-0.2682	-0.0702	0.0581	

PSER -0.4335 0.1179 -0.0372 0.0178

CASOS INCLUIDOS 23 CASOS OMITIDOS 48

TRATAMIENTO 2

CORRELACION (PEARSON)

	ALTU	MORT	PSEC	PSER
Mort	0.5628			
Psec	0.2316	0.6005		
PseR	-0.4726	-0.0170	0.2817	
Pfres	-0.0442	0.3008	0.2601	0.5579

CASOS INCLUIDOS 9 CASOS OMITIDOS 61

TRATAMIENTO 3

CORRELACION (PEARSON)

	ALTU	MORT	PFRES	PSEC
MORT	-0.1928			
PFRES	0.5243	0.1098		
PSEC	0.1397	-0.2366	0.1089	
PSER	0.1941	-0.4685	0.0232	0.0588

CASOS INCLUIDOS 9 CASOS OMITIDOS 54

CONTROL

CORRELACION (PEARSON)

	ALTU	MORT	PFRES	PSEC
MORT	0.3819			
PFRES	-0.1494	-0.0893		
PSEC	-0.2508	-0.2913	-0.1242	
PSER	-0.1471	-0.0666	-0.0425	0.0429

CASOS INCLUIDOS 30 CASOS OMITIDOS 40