



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS

DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA

(PROPAC)

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE PIMIENTO
(*Capsicum annuum* L.) cv ‘Cannon’ OBTENIDO MEDIANTE
BIOFERTILIZACIÓN”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta

I.B.Q. Jonathan Morales Guzmán

Dirigido por

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

C.U. Santiago de Querétaro, Querétaro, Diciembre 2013.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Evaluación de la producción y calidad de pimiento (*Capsicum annum* L.)
cv ‘Cannon’ obtenido mediante biofertilización”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.B.Q. Jonathan Morales Guzmán

Dirigido por:

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

SINODALES

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Presidente

Dr. Ramón Álar Martínez Peniche
Secretario

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Vocal

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Suplente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Suplente

M. en S. P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

El cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.) es uno de más importantes en el sector hortícola de México, ocupando el 2° lugar de producción a nivel mundial en 2011. El manejo cultural y el empleo de variedades selectas han demostrado aumentar la producción, así como el uso óptimo de productos químicos para que la planta pueda expresar todo su potencial genético. Investigaciones previas indican un aumento en los últimos años en el uso de fertilizantes de hasta 200 %, pues no son aplicados apropiadamente, generando un problema de contaminación. El uso de biofertilizantes constituye una alternativa para mejorar la absorción y disponibilidad de nutrientes, generando cultivos más saludables. En el presente proyecto se evaluó la aplicación de biofertilizantes con una cepa de *Bacillus* sp y el producto comercial Rhizobac Combi® sobre la producción de pimiento en invernadero. El análisis del contenido de vitamina C mostró en dos fechas de corte un aumento en su concentración con el tratamiento de Rhizobac Combi® de hasta 257.68 mg de A.A. /100 g de peso fresco, en comparación con la cepa de *Bacillus* sp. y el testigo (sin inocular), sin embargo para fenoles totales el tratamiento de *Bacillus* sp. presentó valores estadísticamente significativos en dos fechas de corte (4 de octubre y 15 de noviembre), mostrando la mayor concentración de 150.11 mg AGE/100 g de peso fresco, superior a los presentados por la cepa de *Bacillus* sp. para el color extractable (ASTA) el tratamiento de Rhizobac Combi® mostro diferencias significativas en dos fechas de corte correspondientes al 13 de agosto y 4 de octubre del 2012 (69.92 y 45.98 unidades ASTA), sin embargo en la fecha de corte del 15 de noviembre del 2012, el tratamiento con la cepa *Bacillus* sp. se muestra con la concentración más alta de 39.63 unidades ASTA en comparación con el control y el producto comercial de Rhizobac Combi®. Mientras que para las variables de calidad se encontraron diferencias significativa en el grosor de pared del pericarpio (mm) con el tratamiento de la cepa *Bacillus* sp. en la primera fecha de corte, sin embargo los valores que se presentan para el segundo y tercer corte, el tratamiento Rhizobac Combi® presenta valores superiores. Por otro lado también se muestran diferencias significativa con respecto al % de humedad durante la fecha de corte del 13 de agosto con *Bacillus* sp. y Rhizobac Combi® (93.18 y 93.32 %), observándose un comportamiento similar para la fecha del 4 de octubre también para ambos tratamientos con respecto al testigo. El uso de biofertilizantes mejora variables de calidad proporcionando pimientos con características interesantes para su comercialización.

Palabras clave: pimiento, inoculante microbiano, biofertilizante, fenoles totales, ASTA.

SUMMARY

Cultivation of pepper (*Capsicum annuum* L.) is one of most important in the horticultural sector in México, taking place on 2nd worldwide production in 2011. Cultural management and use of selected varieties have shown increased production and optimal use of chemicals for the plant to express their genetic potential. Previous research indicating an increase in recent years in the use of fertilizers up to 200 % since not properly applied, creating a pollution problem. The use of biofertilizers is an alternative to improve the absorption and availability of nutrients, resulting in healthier crops. In this project we evaluated the application of biofertilizers with a strain of *Bacillus sp.* and commercial product Rhizobac Combi® on greenhouse pepper production. The content analysis of vitamin C showed two court dates in their concentration increases with treatment Rhizobac Combi® up 257.68 mg AA / 100 g fresh weight , compared with the strain of *Bacillus sp.* and the control (uninoculated) , however for the treatment of total phenols *Bacillus sp.* statistically significant values presented two court dates (October 4 and November 15, 2012), showing the highest concentration of 150.11 mg AGE/100 g fresh weight than those presented by the strain of *Bacillus sp.* for extractable color (ASTA) the treatments Rhizobac Combi® showed significant differences on two court dates for the August 13 and October 4, 2012 (69.92 and 45.98 ASTA), however the cutoff date of November 15, 2012, treatment with *Bacillus sp.* shown with the highest concentration of 39.63 ASTA compared with the control and the commercial product Rhizobac Combi®. While for the quality variables are significant differences in the wall thickness of the pericarp (mm) treatment of strain *Bacillus sp.* on the first court date, however the values presented for the second and third cut, treatment Rhizobac Combi® presents higher values. On the other hand also shows significant differences with respect to the % humidity for the court date of August 13 with *Bacillus sp.* and Rhizobac Combi® (93.18 and 93.32 %) with similar behavior for the date of October 4 also for both treatments compared with the control. The use of biofertilizers providing improved quality variables peppers with interesting features for marketing.

Key words: pepper, microbial inoculant, biofertilizer, total phenols, ASTA.

Primero y antes que nada doy gracias a Dios por estar conmigo, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, sé que tiene siempre lo mejor para mí.

A mis papas Daniel y Consuelo:

A Papá Gracias por apoyarme sin condiciones ni medida, enseñarme, aconsejarme, creer en mí, aceptarme como soy y hacerme saber que nunca estaré solo, gracias por ser mi héroe Papá....Te quiero mucho.

A Mamá por todo su amor, apoyo en los momentos más difíciles, por sus palabras de aliento y consejo que me orientaron a tomar decisiones y poder seguir adelante, a mi guerrera inalcanzable...Te quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Al Programa de posgrado en alimentos del centro de la república (PROPAC) de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Al Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar por compartirme sus conocimientos, por ayudarme a crecer como persona y profesionalmente, por brindarme su apoyo durante la realización de este proyecto.

A mis sinodales Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche, Dra. Montserrat Hernández Iturriaga, Dra. Sofía María Arvizu Medrano y Dra. Silvia Lorena Amaya Llano, por apoyarme a través de la realización de mi proyecto y mi estancia en el PROPAC.

A Carmelita y Laurita por todas sus atenciones y ayuda.

A mis compañeros del PROPAC: Adriana, Emmanuel, Adriana de la Paz, Anabel, Andrea, Mireya, Omar, Mayra, Ana María, Diego, Gaby, Humberto, Raymundo, Karen, Daniela, en especial a Abraham, Eunice, Alejandra, Dalia, Alejandro, Nayeli y Gisela.

A mis Hermanos

Dany, Isra y Judith por apoyarme en mis proyectos y brindarme todo su amor, por todo esto les agradezco de corazón el que estén a mi lado.....los quiero mucho.

A mi cuñado Christian gracias por todo el apoyo que me brindas, sabes cuánto ha sido tan importante.....en verdad Gracias.

A mis sobrinas Camila y Constanza sus sonrisas y ocurrencias me hacen ver la vida de otra manera y sentirme afortunado...las quiero mucho.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Pág
Resumen.....	i
Summary.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice.....	vi
Índice de Tablas.....	xi
Índice de Figuras.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1. Pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	2
2.1.1. Antecedentes y origen.....	2
2.1.2. Perfil del mercado del pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	2
2.1.3. Botánica del pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	4
2.1.3.1. Taxonomía.....	4
2.1.3.2. Morfología.....	5
2.1.3.3. Características agronómicas del pimiento.....	7
2.1.3.4. Calidad poscosecha.....	8
2.1.3.5. Componentes de la calidad del pimiento.....	9

2.1.4. Prácticas culturales en el cultivo de pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	13
2.2. Fertilizantes.....	15
2.2.1. Fertilizantes químicos.....	15
2.2.2. Biofertilizantes.....	17
2.2.2.1. Antecedentes.....	17
2.2.2.2. Microbiología y agricultura.....	18
2.2.2.3. Interacciones planta-microorganismo en la rizosfera.....	19
2.2.2.4. Uso de biofertilizantes en la agricultura.....	22
2.2.2.5. Clasificación de los biofertilizantes.....	23
2.2.2.5.1. Inoculantes bacterianos.....	23
2.2.2.5.2. Inoculantes de micorrizas.....	23
2.2.2.5.3. Inoculantes compuestos.....	24
2.2.2.5.4. Inoculantes comerciales.....	25
2.2.2.5.5. Características físicas del inoculante	25
2.3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV).....	26
2.3.1. Algunos grupos taxonómicos.....	26
2.3.1.1. <i>Bacillus</i> spp.....	27
2.3.1.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	27
2.3.1.3. Actinomicetos.....	27
2.3.2. Interacción planta-bacteria.....	28

2.3.3. Mecanismos de BPCV para promover el crecimiento vegetal.....	29
2.3.4. Potencial agrícola de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal como biofertilizante.....	31
2.3.4.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno (N).....	31
2.3.4.2. Regulación de niveles de etileno.....	33
2.3.4.3. Síntesis de hormonas.....	34
2.3.4.4. Solubilización de nutrientes.....	34
2.3.4.5. Producción de compuestos volátiles.....	37
2.4. Control biológico.....	38
2.4.1. Antagonismo.....	38
2.4.2. Inducción de resistencia a patógenos.....	38
2.4.3. Competencia por espacio y nutrientes.....	39
III. JUSTIFICACIÓN.....	41
IV. OBJETIVOS.....	42
4.1. General.....	42
4.2. Específico.....	42
V. METODOLOGÍA.....	43
5.1. Sitio de estudio.....	43
5.2. Material biológico.....	43
5.2.1. Pimiento.....	43

5.2.2. Cepas bacterianas.....	43
5.3. Desarrollo del Experimento.....	43
5.3.1. Preparación de las cepas bacterianas para inoculación..	43
5.3.2. Inoculación de la semillas y plántulas de cepas bacterianas.....	44
5.3.3. Seguimiento de maduración y cosecha.....	45
5.3.3.1. Etapas de cosecha.....	45
5.4. Variables evaluadas.....	46
5.4.1. Agronómicas.....	46
5.4.2. Calidad del fruto.....	47
5.4.2.1. Color.....	47
5.4.2.2. Medición del grosor de la pared del fruto (pericarpio).....	47
5.4.2.3. Determinación del porcentaje de humedad.....	48
5.4.2.4. Determinación de acidez total titulable.....	48
5.4.2.5. Determinación de pH.....	49
5.4.2.6 Sólidos solubles totales (SST).....	49
5.4.2.7 Color extractable mediante índice ASTA.....	49
5.4.2.8 Determinación de macro y microelementos.....	50
5.4.2.9 Determinación de fenoles totales.....	51
5.4.2.10. Determinación de ácido ascórbico por HPLC.....	51

5.5. Análisis estadísticos.....	52
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
6.1. Evaluación de las variables agronómicas.....	53
6.2. Evaluación de las variables de calidad en pimiento.....	55
6.2.1. Color.....	55
6.2.2. pH, acidez titulable (AT) y sólidos solubles totales (SST)..	57
6.2.3. Grosor de pericarpio y humedad (%)......	57
6.2.4. Color extractable (ASTA), fenoles totales y ácido ascórbico.....	59
6.2.5. Determinación de macroelementos.....	65
6.2.6. Determinación de microelementos.....	65
VII. CONCLUSIONES.....	69
VIII. LITERATURA CITADA.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
2.1	Principales países productores de pimiento en el mundo	3
2.2	Clasificación taxonómica de pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.)	4
2.3	Composición nutrimental de pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.)	9
2.4	Mecanismos de BPCV para promover el crecimiento vegetal	32
5.1	Ficha técnica del biofertilizante comercial Rhizobac Combi®	44
6.1	Efecto de los inoculantes microbianos sobre las variables de producción en pimiento	54
6.2	Efecto de los inoculantes microbianos sobre parámetros de color “L”, “a y “b”” en pimiento	56
6.3	Efecto de los inoculantes microbianos sobre variables de calidad en pimiento	58
6.4	Efecto de los inoculantes microbianos sobre grosor de pares (mm) y humedad (%) en pimiento	60
6.5	Efecto de los inoculantes microbianos sobre color extractable (ASTA), fenoles totales y ácido ascórbico en pimiento	64
6.6	Efecto de los inoculantes microbianos sobre el contenido de macroelementos en el pericarpio de pimiento	66
6.7	Efecto de los inoculantes microbianos en el contenido de microelementos en el pericarpio de pimiento	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Planta de pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.)	5
2.2	Estructura interna del fruto de pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.)	6
2.3	Fruto de pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.)	7
2.4	Pimiento cultivado en invernadero	14
2.5	Partes de la zona de la rizósfera	20
2.6	Interacción planta-bacteria	29
2.7	Mecanismos para la promoción del crecimiento vegetal provocado por Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV)	31
2.8	Mecanismos de control biológico que ejercen las bacterias sobre las plantas	40
5.1	Inoculación en semilla y plántula con cepas bacterianas	45
5.2	Periodo de cosechas en el cultivo de pimiento	45
5.3	Selección de frutos para determinación de variables de calidad por cada tratamiento: a) Rhizobac combi®, b) <i>Bacillus</i> sp., c) Control	46
5.4	Escala Hunter Lab para determinación de los parámetros de color “L”, “a” y “b”	47
5.5	Medición del grosor de la pared del fruto de pimiento (pericarpio)	48

I. INTRODUCCIÓN

El pimiento posee un elevado valor nutritivo, principalmente por la presencia de las vitaminas A, C, E, minerales, fibra y una elevada cantidad de antioxidantes siendo una de las hortalizas con mayor contenido de vitamina C (Kothari y col., 2010). En México el pimiento se encuentra entre las principales hortalizas frescas de mayor producción. En 2011 ocupó el 2° lugar en la producción a nivel mundial exportándose principalmente a EE.UU, Canadá y la Unión Europea (FAO, 2011).

Durante su cultivo se emplean dosis de fertilización que oscilan entre 50 y 80 t/ha en un ciclo de cultivo completo, que corresponde de ocho a diez meses después del trasplante, dependiendo de la fertilidad del suelo (Reséndiz-Melgar y col., 2010).

En respuesta a la necesidad de generar cultivos con trazas mínimas o nulas de agroquímicos mediante tecnologías orgánicas, se ha implementado el uso de los inoculantes microbianos que promueven el crecimiento de las plantas, mejorando la disponibilidad de nutrientes. Dichos microorganismos son capaces de colonizar la raíz y/o rizosfera, generando plantas más sanas y de mayor calidad, constituyendo además una alternativa para optimizar el uso de fertilizantes químicos (Vessey, 2003).

El uso de inoculantes ha traído beneficios en cultivos como cereales, hortalizas y granos, debido a que los microorganismos empleados se caracterizan por producir metabolitos como el ácido indol-3-acético (AIA) (Barazani y Friedman, 1999), citoquininas, giberelinas (Ramos-Solano y col., 2008), fijación de Nitrógeno y tener una actividad sobre el control de enfermedades y patógenos (Harman, 2006) proporcionando un beneficio a la planta, reflejándose en su estado nutricional y de calidad, al observarse un aumento en la producción y rendimientos del mismo cultivo. Por lo que el objetivo de este trabajo es evaluar la aplicación de biofertilizantes en la producción y calidad del fruto del pimiento (*Capsicum annum* L.) cv. cannon.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Pimiento

2.1.1 Antecedentes y origen

El pimiento (*Capsicum annum* L.) es cultivado en centro y Sudamérica específicamente en la zona de Bolivia y Perú, donde se cultivan al menos otras cuatro especies (Pickersgill, 1989). Hace 6000 años, los pimientos rojos fueron utilizados en Sudamérica como especie para condimentar los alimentos suaves. En el siglo XVI ya se había difundido su cultivo en España desde donde se distribuyó al resto del continente Europeo (Abu-Zahra, 2012).

México es centro de origen, diversidad y domesticación del cultivo de chile, con gran variabilidad genética no explorada. Se ha registrado su domesticación en los estados de Tamaulipas, Puebla y Oaxaca por lo que el género *Capsicum* ha sido domesticado al menos en dos zonas diferentes: un tipo *Capsicum annum* en México y un tipo *Capsicum chinense* en la Amazonía (Pickersgill, 1989).

2.1.2 Perfil del mercado del pimiento (*Capsicum annum* L.)

El pimiento es la tercera solanácea más importante a nivel mundial después del tomate y la papa, las necesidades de producción y del mercado han contribuido al crecimiento e importancia de esta hortaliza.

La Unión Europea representa un mercado atractivo para el pimiento fresco mexicano debido a la demanda creciente del consumo de productos frescos libres de residuos químicos. Los principales países productores de pimiento entre el periodo de 2005-2009 fueron: China, México, Turquía, Indonesia y España, los cuales produjeron aproximadamente 1, 000,000 t (Tabla 2.1). Según la FAO en 2009, la producción de pimiento a nivel mundial en 2007 fue de 27 129 708 t. Nuestro país en 2010 exportó 99.4 % de la producción principalmente a EE.UU. y 0.6 % a Canadá (FAO, 2011).

En México la mayor parte de la producción de pimiento se destina a la exportación, tanto la que se genera a campo abierto como la de invernadero. El

cultivo de pimienta se encuentra entre las principales hortalizas de mayor producción, lo que representa un negocio en plena expansión con oportunidades y posibilidades de alta rentabilidad, pues se siembran aproximadamente 5,800 hectáreas en todo el país, con rendimientos a campo abierto que pueden llegar hasta 50 t·ha⁻¹·año⁻¹ (Reséndiz y col., 2010).

Tabla 2.1. Principales países productores de pimienta en el mundo.

País	Producción Anual (Toneladas)				
	2005	2006	2007	2008	2009
China	12,530,180	13,030,234	14,026,272	14,274,178	14,520,301
México	1,617,260	1,681,280	1,890,430	2,054,970	1,941,560
Turquía	1,829,000	1,842,180	1,759,220	1,796,180	1,837,000
Indonesia	1,058,020	1,185,060	1,128,790	1,092,120	1,100,000
España	1,060,360	1,147,770	1,057,530	918,140	1,011,700
EE.UU	959,070	998,210	906,140	909,810	926,680
Países Bajos	345,000	318,000	320,000	335,000	370,000

(FAOSTAT, 2013)

Los grandes productores de pimienta a campo abierto que se localizan principalmente en zonas desérticas en el norte (Sonora y Sinaloa) y centro del país, han tenido que detener su expansión debido a la escasez de agua lo que ha dado paso a la producción de pimienta en invernadero.

Se han identificado al menos 85 hectáreas que producen cerca de 15,000 toneladas de pimienta de exportación en estados como Nuevo León, Coahuila, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Puebla (De Santiago, 2009). El rendimiento que puede alcanzarse en invernaderos con tecnología intermedia es aproximadamente de 130 t·ha⁻¹; al usar tecnología mediana-alta se alcanzan hasta 180 t·ha⁻¹, y con alta tecnología se logran hasta 250 t·ha⁻¹ (Moreno-Pérez y col., 2011).

2.1.3 Botánica del Pimiento (*Capsicum annum* L.)

2.1.3.1 Taxonomía

El pimiento pertenece al género *Capsicum*, de la familia de las Solanáceas (Tabla 2.2). Las variedades cultivadas de la especie *Capsicum annum* L. pertenecen a varias subespecies o variedades botánicas, existen algunas de ellas con sabor picante.

Tabla 2.2 Clasificación taxonómica del pimiento (*Capsicum annum* L.)

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Solanales</i>
Familia	<i>Solanaceae</i>
Género	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>Capsicum annum</i> L.

El origen o domesticación de *Capsicum annum* L. es Mesoamérica, propiamente México y Guatemala (Pickersgill, 1971). México es el país que presenta la mayor variabilidad de formas cultivadas y silvestres, entre los que destacan: serrano, ancho, jalapeño, morrón, pasilla entre otros (Loaiza-Figueroa y col., 1989).

El género *Capsicum* se cultiva en las principales regiones tropicales, subtropicales y templadas de México. En los Estados de Puebla, Morelos y Querétaro se encuentra la mayor diversidad de chiles cultivados y silvestres, esta especie se cultiva de 2500 m.s.n.m. y sus frutos se encuentran en el mercado todo el año para consumo fresco, seco o industrializado (De Teodoro-Pardo y col., 2007).

2.1.3.2 Morfología

La planta del pimiento es un pequeño arbusto de crecimiento indeterminado, que tiene un tallo frágil, erecto y herbáceo, con ramas que se subdividen en dos partes, sus hojas son grandes y de color verde intenso brillante, con forma oblonga (más largas que anchas), lanceolada o globosa (Figura 2.1). El sistema radical inicia con numerosas raíces adventicias que horizontalmente pueden alcanzar una longitud comprendida entre 50 cm y 1 m. Las flores son de color blanco o blanco amarillentas (CEDEPAS-INCAGRO, 2003) y el fruto es una baya hueca que dependiendo de la posición del pedúnculo, erecto o abatido y del peso del fruto, va a desarrollarse total o parcialmente erguido o en péndulo (FAO, 2013).



Figura 2.1. Planta del pimiento (*Capsicum annum* L.)

Los frutos inclinados o péndulos están más abrigados por las hojas y protegidos contra el asoleamiento, además de que su recolección es mucho más fácil. El pedúnculo se prolonga en el interior del fruto a través de la placenta que sigue la forma del propio fruto.

Los pedúnculos de los tipos “pimentonero” son más finos que los de las variedades de frutos gruesos. El fruto es una baya hueca, semicartilaginosa, de tamaño variable, donde las semillas se encuentran en una placenta cónica de disposición central (Tamaro, 1974) (Figura 2.2). El grosor del pericarpio es una de las características importantes para la valoración de las variedades, de tal modo que el pimiento cultivado para consumo como verdura, debe tener un pericarpio carnoso, mientras que el pimiento deberá tenerlo bastante fino (CEDEPAS-INCAGRO, 2003).

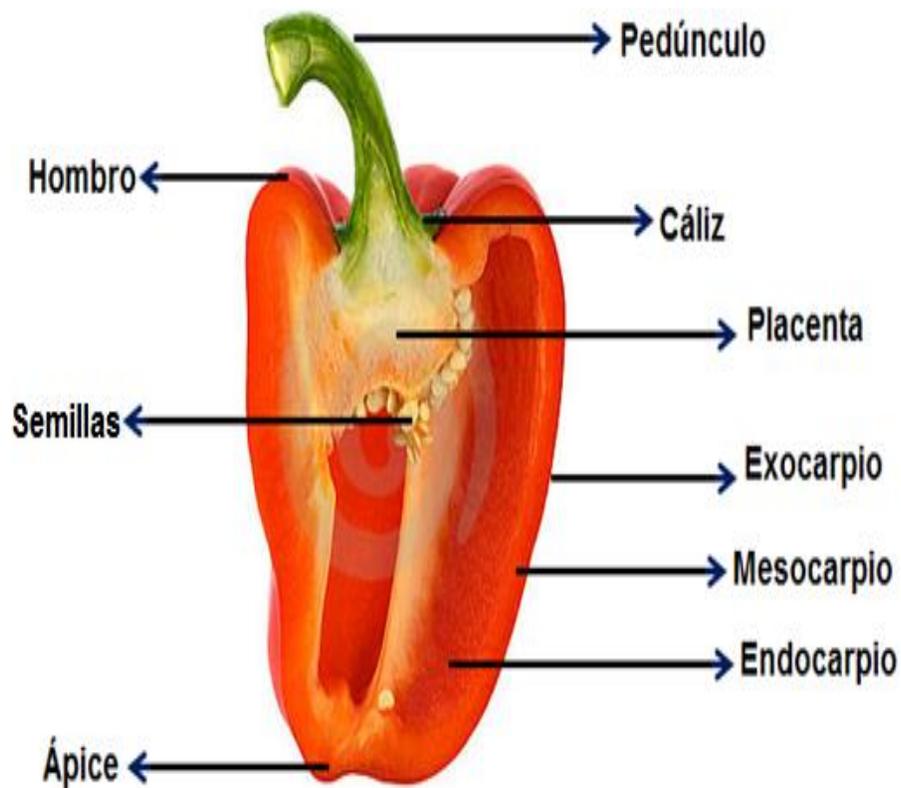


Figura 2.2 Estructura interna del fruto de pimiento (*Capsicum annuum* L.)

La forma del fruto depende del número de carpelos y de semillas. El fruto de los pimientos está formado normalmente por 2 ó 3 carpelos, mientras que los frutos cilíndricos o redondeados suelen tener 3 ó 4 y los frutos de forma de tomate, pueden incluso tener cinco carpelos (Figura 2.3).

Durante la cosecha los frutos son en su mayoría, recolectados y llevados al mercado cuando se encuentran en su madurez comercial (verdes), adquiriendo una

coloración amarilla o roja (dependiendo de la variedad) cuando se completa su madurez fisiológica (Del Castillo y col., 2004). Las variedades picantes contienen capsaicina, la cual en pimientos picantes alcanza su máxima concentración cuando el fruto llega a la maduración fisiológica (CEDEPAS-INCAGRO, 2003).



Figura 2.3. Fruto del pimiento (*Capsicum annuum* L.)

2.1.3.3 Características agronómicas del pimiento

El pimiento exige humedad, aireación y temperaturas específicas para lograr una eficiente germinación de las semillas, la cual se da entre 20 y 30 °C, las cuales aseguran un buen crecimiento vegetativo en los primeros estadios del desarrollo de la plántula y proporcionan un buen prendimiento de la planta después del trasplante.

En el desarrollo óptimo de la raíz la temperatura del suelo oscila entre los 22 a 24 °C (Nuez y col., 1996).

La aparición de la radícula evidencia la germinación de la semilla que se ve influenciada por factores como temperatura, agua, oxígeno y presencia de luz; el estado de plántula comprende el periodo desde la emergencia y alargamiento del hipocótilo hasta la caída de los cotiledones. En el caso del pimiento morrón, el estado de plántula queda delimitado entre los 35 y 40 días después de la siembra, tiempo requerido para ser trasplantada; donde otros criterios pueden ser considerados como lo son que las plántulas tengan de 12 a 15 cm de alto, con un tallo de 5 a 7 mm de grosor y entre cuatro a cinco hojas, lo que ocurre entre 18 y 28 días, aunque ese periodo depende de la temperatura ambiental, cantidad de reservas del embrión, capacidad fotosintética y de factores genéticos (Mundarain y col., 2005).

Las plantas de pimiento tienen crecimiento simpódico es decir cuando el tallo principal deja de crecer y continúa el crecimiento en las ramas laterales, repitiéndose el proceso y en cada bifurcación se producen flores, generalmente solitarias. Si la planta se deja crecer libremente, las primeras 6 a 12 flores amarran fruto, pero la demanda de nutrientes para su rápido crecimiento, ocasiona abortación de un alto porcentaje de flores generadas subsecuentemente. Una vez que estos frutos finalizan su crecimiento y son cosechados, continúa el crecimiento vegetativo y eventualmente, el amarre y el desarrollo de cuatro a ocho frutos más, que a su vez, ocasionarán el aborto de flores que se forman posteriormente. Entre la cosecha del primer y segundo flujo de frutos, puede haber un intervalo de dos meses lo que causa que en un ciclo de cultivo completo transcurran entre ocho y diez meses después del trasplante (Reséndiz-Melgar y col., 2010).

2.1.3.4 Calidad poscosecha

El pimiento posee un elevado valor nutritivo, ya que es fuente de vitamina A, B, C y E, minerales (Tabla 2.3), como molibdeno, manganeso, ácido fólico, potasio, fibra y una elevada cantidad de antioxidantes (Kothari y col., 2010).

Los colores amarillo, naranja y rojo de los pimientos proceden de pigmentos carotenoides producidos durante la maduración del fruto. La ingesta de estos

compuestos en los alimentos es un importante factor de protección de la salud al proporcionar un actividad antioxidante (Sun y col., 2007).

Tabla 2.3. Composición nutrimental del pimiento (*Capsicum Annum* L.)

Nutriente	*Cantidad Reportada	
	Variedad picante	Variedad dulce
Agua	87.74 g	92.19 g
Contenido Energético	40 Kcal	27 Kcal
Carbohidratos	9.46 g	6.43 g
Grasas	0.20 g	0.19 g
Proteínas	2 g	0.89 g
Fibra	1.5 g	2.0 g
Cenizas	0.6 g	0.3 g
Calcio	18 mg	9 mg
Potasio	340 mg	177 mg
Fosforo	46 mg	19 mg
Hierro	1.2 mg	0.46 mg
Vitamina A	10750 U.I.	5700 U.I.
Tiamina	0.09 mg	0.066 mg
Riboflavina	0.09 mg	0.030 mg
Niacina	0.95 mg	0.51 mg
Ácido Ascórbico	242.5 mg	190 mg

*Composición por 100 g de porción comestible (USDA, 2011).

En cuanto a los flavonoides, la mayoría de los estudios sobre pimientos se han concentrado en agliconas de quercetina y luteolina (Howard y col., 2000). El color verde de los pimientos es debido a la clorofila y los carotenoides típicos del cloroplasto. El color amarillo y naranja está formado por α y β caroteno, zeaxantina, la luteína y β -criptoxantina (Howard, 2001). Mientras que el color rojo es debido a la presencia de capsantina, capsorubina, y capsantina 5,6-epóxido (Sun y col., 2007).

2.1.3.5 Componentes de la calidad del pimiento

Los consumidores comienzan a demandar hortalizas de mayor calidad y a precios razonables. Dentro del concepto de calidad, se incluye la presentación del producto, la calidad gustativa, las formas, los colores, la ausencia de residuos de pesticidas y la producción no agresiva con el medio ambiente (Abbott, 1999).

Los múltiples usos del pimiento, permiten considerar un gran número de atributos como indicadores de su calidad. No obstante, en las normativas más utilizadas destacan el calibre, el color, la firmeza como indicadores de la madurez y las formas de transporte. Con los análisis de los parámetros de calidad de firmeza, grosor de la pared y contenido de sólidos solubles se pueden relacionar con el grado de aceptación por los consumidores (Sethu y col., 1996).

La **textura**, es un atributo de calidad importante para los consumidores (Sethu y col., 1996). Por lo que se puede definir a las propiedades texturales de un alimento como: al grupo de características físicas que son detectadas por la sensación de tacto, están relacionados con la deformación, la desintegración y el flujo del alimento bajo la aplicación de una fuerza, y se miden objetivamente por las funciones de fuerza, el tiempo y la distancia, además, establece que la textura se compone de varias propiedades, que implican una serie de parámetros. Estas propiedades pueden ser mecánicas (dureza, masticabilidad y viscosidad), geométricas (tamaño de partícula y la forma) o químicas (contenido de humedad y grasa) (Sams, 1999).

La **firmeza** es un indicador de calidad que está claramente relacionado con el tiempo de conservación de alimentos principalmente en frutas y hortalizas. Por esta razón, los valores elevados de firmeza son deseables para productos que tienen que viajar largas distancias antes de llegar a los consumidores (Urrestarazu y col., 2002). La pared externa de un pimiento cubre grandes espacios locales y con el apoyo de tres o cuatro paredes carpelares de todo el eje ecuatorial, el tejido placentario y las semillas se encuentran en el centro de la fruta y contribuyen poco al soporte de la pared (Showalter, 1973). Castro y col. (2011) muestran datos de firmeza en pimientos medidos sobre el epicarpio con valores de 0.86 y 0.339 Kg·F, respectivamente y que son menores a los que presentan Guerra y col. (2011) los

cuales se encuentran entre 3.5 a 3.9 Kg-F, que representa mayor grosor en la pared del fruto y por consecuencia una mayor resistencia a la deformación.

Una característica importante que refleja la calidad del pimiento son los **sólidos solubles totales (SST)** ya que presentan gran variación en función del cultivar, nutrición de la planta, conductividad eléctrica de la solución nutritiva, estrés hídrico, en otros (Urrestarazu y col., 2002). De la misma manera Castro y col. (2011) presentan datos de SST, con valores de 4.8 °Brix, mientras que Rao y col. (2011) presentan valores que van de 2.9 a 5.8 °Brix, y que se encuentran relacionados principalmente con los carbohidratos contenidos en el jugo obtenido del fruto, así como de minerales disueltos.

El **color** es la base para la clasificación de muchos productos en niveles de calidad comercial, pero la concentración de pigmentos u otros componentes específicos podrían significar un índice de mejor calidad (Lancaster y col., 1997).

El color se relaciona directamente con la percepción del consumidor mientras que la concentración del pigmento se atribuye a la madurez y la concentración de algunos otros componentes que se relaciona con el sabor. Cuando una fruta o verdura se expone a la luz, alrededor de 4 % de la luz incidente es reflejada en la superficie exterior, causando reflectancia especular o brillo, y el restante 96 % de la energía incidente se transmite a través de la superficie en la estructura celular del producto en el que se dispersa por las interfaces pequeñas en el tejido o es absorbida por los componentes celulares (Birth, 1976).

Una de las características que también provee de calidad al pimiento es el **grosor de la pared del fruto (pericarpio)**, ya que el pimiento de carne gruesa responde a los incrementos de radiación, mejorando su tamaño y peso del fruto en consecuencia el grosor de la pared de la hortaliza. Esta variable se encuentra determinada por la concentración del calcio, que es el nutriente de las plantas, frecuentemente asociado con el desarrollo del fruto en general, y la firmeza en particular. La influencia de calcio en una amplia gama de trastornos relacionados con la calidad de frutas y hortalizas está bien establecida (Shear, 1975). Belakbir y col. (1998) en su trabajo sobre el rendimiento y la calidad del pimiento encuentra

una correlación entre la firmeza del fruto y los niveles de concentración de calcio por lo que éste forma parte de la pared celular.

Para que los pimientos se consideren de calidad deben ser firmes, enteros y sanos, lo que significa que no presenten enfermedades, daños físicos, mecánicos, fisiológicos y fitopatológicos. Es por esto que también las enfermedades en poscosecha son un tema que confiere información relevante sobre el comportamiento del cultivo de pimiento.

Las **enfermedades en poscosecha** en frutas y hortalizas son de las principales causas de pérdidas en la producción de alimentos, Wilson y col. (1989) reportan que en EE.UU., estas pérdidas representan el 24% de la producción, sin embargo estos porcentajes pueden ser más altos en países en vías de desarrollo.

Estas pérdidas se han observado principalmente en el momento de la cosecha además que también se observan durante la comercialización del producto. Las principales enfermedades en poscosecha que dañan el cultivo de pimiento son: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Colletotrichum* spp., *Clavibacter michiganensis* pv. *Michiganensis*, *Bacillus polymyxa*, *Erwinia caratovora* pv. *Caratovora*, *Phythium debaryanum* Hese, *Fusarium* spp, *Botrytis cinérea*, *Phytophthora* spp., entre otros (Snowdon, 1990).

2.1.4 Prácticas culturales en el cultivo de pimiento (*Capsicum annum* L.)

El pimiento es uno de los principales chiles producidos en el país a campo abierto después del jalapeño y el serrano (SAGARPA, 2011). La producción de esta hortaliza en invernadero es una actividad relativamente reciente. Existen diferencias que influyen para que el rendimiento promedio producido en invernadero sea bajo, de alrededor de 71 t·ha⁻¹ (Grijalva y col., 2008). Con base en lo anterior, es necesario, contar con sistemas productivos adecuados a las condiciones del país y que sean factibles de ser usados por productores nacionales, mediante sistemas que reduzcan los costos de producción e incrementen el rendimiento.

Las prácticas culturales son importantes para un buen desarrollo y rendimiento del cultivo. En la **siembra**, la cual se realiza en semilleros, a una

profundidad de 2 a 3 mm, evitando que las semillas queden juntas. En el caso particular de los invernaderos el marco de plantación es de 1 m entre líneas y 0.5 entre plantas. La densidad de plantación es de 20 000 a 25 000 plantas/ha.

La **poda** se realiza con la finalidad de mejorar la calidad del cultivo específicamente bajo invernadero, se obtienen plantas equilibradas, vigorosas y aireadas, de esta manera los frutos no quedarán escondidos entre el follaje y a la vez están protegidos de insolaciones, el número de tallos con los que crecerá la planta que normalmente son dos o tres (FAO, 2013).

El pimiento cultivado en invernadero se caracteriza por ser de crecimiento semideterminado o indeterminado, con altura de planta superior a los 2 m (Jovicich y col., 2004). Se usan dos tipos de sistemas de poda en "V" u holandés y el sistema español (Figura 2.4). En gran parte de España, y en algunas empresas mexicanas, es utilizado el método "Holandés", en el cual se dirige la planta a dos o tres guías eliminando uno de las dos bifurcaciones en que se divide cada rama (Del Castillo y col., 2004), dando como resultado plantas a dos tallos de hasta alcanzar 2 a 3 m de altura, lográndose de 100 a 200 t-ha/año, con ciclos de cultivo de 9 a 11 meses (Nuez y col., 1996). Una característica del cultivo de pimiento son las fluctuaciones en la producción, donde se alterna un número alto de frutos con crecimiento lento o con el efecto contrario es decir con etapas de un bajo número de frutos con alto crecimiento (Marcelis y col., 2004).

El **tutorado** tiene la finalidad de mantener la planta erguida, debido a que los tallos de pimiento son quebradizos. Consiste en que cada uno de los tallos fueron dejados en la poda se sujeta el emparrillado con un hilo vertical que se va hilando a la planta conforme va creciendo. Con esto se mejora la aireación de la planta y favorece el aprovechamiento de la radiación y la realización de labores culturales como la recolección (FAO, 2013).

El **riego** en los cultivos de pimiento se realiza por goteo y está en función del estado fenológico de la planta, el caudal de riego así como del ambiente en que esta se desarrolla (tipo de suelo, condiciones climáticas, calidad de agua de riego, etc.). Tras el aislamiento de la planta se recomienda recortar los riegos, con el fin de potenciar el crecimiento del sistema radical. Un exceso de humedad durante la

primera floración provoca la caída de flores (FAO, 2013). En cultivo hidropónico, el riego está automatizado siendo el uso de canaletas de riego el de más demanda (Alarcón, 1997).



Figura 2.4. Pimiento cultivado en invernadero.

Por último es conveniente mencionar las necesidades nutrimentales del cultivo de pimiento suministrada mediante la **fertilización** en la cual se señalan dosis recomendadas para este cultivo en invernadero es de 250 ppm de Nitrógeno (N), 125 ppm de Fósforo (P), y 125 ppm de Potasio (K), tomando en cuenta que es necesario aplicar vía foliar Calcio (Ca) y Magnesio (Mg) en proporción 2:1 para prevenir las pudriciones en el fruto. Los fertilizantes más utilizados son los abonos simples en forma de sólidos solubles como el nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), nitrato de amonio (NH_4NO_3), nitrato de potasio (KNO_3), fosfato monopotásico (KH_2PO_4), fosfato monoamónico ($(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$), sulfato de potasio (K_2SO_4), sulfato de

magnesio ($MgSO_4$) y en forma líquida se usa el ácido fosfórico (H_3PO_4) y ácido nítrico (HNO_3).

Un factor a tomar en cuenta es el sustrato que debe ser homogéneo para no producir diferencias ni cambios bruscos de humedad, su disposición debe ser perfecta sin pendientes excesivas, y con la misma cantidad de volumen de sustrato para cada planta. Superando estos problemas el cultivo del pimiento tiene un buen comportamiento en hidroponía: mayor precocidad, producción y calidad de frutos (Alarcón, 1997).

La tecnología de producción en invernadero ha incrementado el rendimiento por unidad de superficie. Sin embargo, para maximizar la producción, se aplican altas cantidades de fertilizantes y productos químicos, los cuales, por falta de un esquema de irrigación, originan un uso inadecuado del agua y liberan nutrientes como nitratos y fosfatos a las aguas subterráneas (Klock-Moore y Broschat, 2001).

2.2 Fertilizantes

2.2.1 Fertilizantes químicos

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

Los fertilizantes químicos reponen los nutrientes removidos del suelo a través de la cosecha de los cultivos, posibilitan el uso de variedades de alto rendimiento y contribuyen de manera significativa a la productividad agrícola en suelos nutrimentalmente pobres, su aplicación en este tipo de suelos ha contribuido con alrededor de 30 a 50% al incremento en la productividad de los cultivos (Pelletier y col., 2011).

Sin embargo el consumo a nivel global de estos fertilizantes químicos se incrementa cada año. Los registros históricos muestran un aumento de 27.4

millones al final de los años 50's a 143 millones de toneladas al inicio de los 90's, cifra que representa un incremento en la tasa anual de consumo del 5.5%. Los principales países productores de fertilizantes son China (22.4 %), Estados Unidos (11.9 %), India (9.4 %), Canadá (8.7 %) y Rusia (8.6 %), y para el periodo 2002-2009 se muestra un incremento de casi 28 millones de toneladas, lo que representa un aumento de 20 % en el consumo de fertilizantes a nivel mundial en este periodo (Aguado-Santacruz y col., 2012).

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

Aunque en países desarrollados como Alemania e Inglaterra el consumo de fertilizantes fluctúa entre 2 y 4 toneladas por hectárea, el mayor consumo se observa en países agrícolamente más tecnificados. Los altos costos de los fertilizantes sintéticos provoca que, por ejemplo para el caso del cultivo de maíz, la aplicación de fertilizantes químicos represente el 30% de los costos de producción en sistemas de riego, y hasta el 60% en los sistemas de temporal. El cultivo de cereales aprovechan tan sólo el 50% o menos de las dosis químicas aplicadas, por ejemplo, en algunos países se han aplicado 250 veces más de fertilizantes químicos y 400 veces más de pesticidas de lo requerían los cultivos (Aguado-Santacruz y col., 2012).

El uso ineficiente de fertilizantes químicos puede ser atribuido a la volatilidad de ciertos componentes o al incorrecto estado del suelo. Por ejemplo el nitrógeno puede perderse del suelo por lixiviación de nitratos o a través de emisiones gaseosas hacia la atmósfera en la forma de amoníaco u óxido nítrico, estos eventos causan nitrificación del suelo y por lo tanto ser consideradas como fuentes potenciales de deterioro ambiental (Crewsa y Peoples, 2004).

La labranza continúa el uso de fertilizantes, pesticidas y otros agroquímicos, han contribuido al deterioro de la estructura y textura del suelo, a la reducción de las poblaciones de la microflora y la microfauna y a una inconsistencia en los

nutrientes del suelo. La aplicación de fertilizantes químicos comúnmente se ha llevado a cabo sin un conocimiento previo a las características del suelo, lo cual ha resultado en una pobre respuesta de los cultivos a la aplicación de estos productos (Aguado-Santacruz y col., 2012).

Entre las posibilidades tecnológicas para lograr optimizar los insumos químicos anteriormente mencionados destacan la aplicación de fertilizantes orgánicos (estiércoles, compostas y vermicompostas), así como la utilización de microorganismos que poseen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y reducir el uso de los fertilizantes sintéticos sin afectar la productividad de los cultivos, ya que son empleados para la fabricación de productos biológicos conocidos como biofertilizantes considerados como una de las contribuciones más importantes de la biotecnología y la microbiología a la agricultura moderna.

2.2.2 Biofertilizantes

2.2.2.1 Antecedentes.

Emplear microorganismos para mejorar la productividad de los cultivos no es actividad nueva, se remonta desde hace muchos siglos. Por experiencia, los agricultores determinaron de manera empírica que al mezclar suelo utilizado para cultivar leguminosas favorecían el desarrollo de otros cultivos mejorando los rendimientos. Al final del siglo XIX, la práctica de mezclar el suelo “inoculado naturalmente” se convirtió en un método recomendado en los EE.UU., (Smth, 1992).

Una década más tarde, se estableció la primera patente (“Nitragin”) y se registró para la inoculación de plantas con cepas de *Rhizobium* sp. (Bashan, 1998). Durante casi 100 años, los inoculantes de *Rhizobium* se han producido en todo el mundo, principalmente por pequeñas empresas. En Brasil se ha optado por evitar la fertilización química nitrogenada en cultivos de soya y utilizar solamente inoculos con cepas bacterianas de *Rhizobium* el cual favorecen la fijación biológica de nitrógeno (Bashan, 1998).

Los primeros trabajos de inoculación en semillas fueron realizados en Rusia en 1930, donde se utilizaron bacterias de la rizosfera, específicamente cepas de *Azotobacter* sp.

La tecnología de inocular plantas se produjo a finales de 1970 donde se encontró que una cepa de *Azospirillum sp.*, influyó directamente en el metabolismo de las plantas sin realizar el método de la mezcla de suelo de un cultivo de leguminosas (Bashan y Holguin, 1997), un segundo avance consistió en considerar cepas bacterianas que tenían una función de agentes de control biológico, principalmente los géneros *Pseudomonas fluorescens* y grupos de *P. putida*, comenzaron a ser intensamente investigados. En los últimos años, también se han evaluado otros géneros de bacterias, tales como *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Acetobacter* y *Azospirillum* (Bashan, 1998).

También a finales de la década de las 70s, Kloepper y col. (1978) fueron los pioneros en introducir el término Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) para referirse a las bacterias capaces de provocar un efecto benéfico en las plantas. Recientemente, la denominación se ha extendido a microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal para incluir hongos y cualquier organismo afín, ya para la década de los 80's el término "rizobacteria" ha sido aceptado para describir bacterias que se encuentran en la zona de la rizosfera (Vessey, 2003).

2.2.2.2. Microbiología y Agricultura

El conocimiento de los beneficios de los microorganismos en el desarrollo de las plantas se remonta a la edad media, en la Roma antigua. El proceso actual de producción de fertilizante nitrogenado se conoce como **Haber-Bosch** y se caracteriza por requerir altas cantidades de energía para lograr fijar en materiales inertes el nitrógeno. Se sabe que algunos microorganismos realizan el mismo proceso; en el caso del nitrógeno a través de las bacterias fijadoras de nitrógeno o mediante el transporte de Fósforo (P) y Potasio (K) con los hongos micorrízicos, pero en ambos casos, la energía utilizada deriva del proceso fotosintético de las plantas (Aguirre-Medina y col., 2009).

Agronómicamente, los microorganismos se encuentran relacionados por una relación simbiótica con las plantas, en condiciones naturales, se ha demostrado que la interdependencia planta-microorganismo ha contribuido al mantenimiento, funcionamiento y la estabilidad de los ecosistemas y como consecuencia en la

diversidad de las especies en las comunidades vegetales. Sin embargo en la actividad agrícola la interacción planta-microorganismo ha sido menospreciada y poco investigada. También en el contexto agronómico, la parte aérea de las plantas ha recibido más atención para su estudio en comparación con el sistema radical, aun cuando existe una estrecha interdependencia entre ambos órganos. El sistema radical ha sido llamado el componente olvidado, aunque para muchas plantas representa mucho más que la parte aérea (Aguirre-Medina y col., 2009).

2.2.2.3 Interacciones de las plantas y los microorganismos en la rizosfera

Una **relación simbiótica** se establece cuando dos organismos (en este caso una planta y una bacteria u hongo) establecen una interacción estrecha que a menudo es de largo plazo. Esta relación puede ser benéfica para ambos organismos (mutualismo) favorecer sólo a uno de ellos dañando al otro (parasitismo), o bien beneficiar a uno de ellos y no tener consecuencias para el otro (comensalismo). Las interacciones entre las plantas y los microorganismos benéficos ocurren principalmente en la porción del suelo que se encuentra en contacto con la raíz.

La **rizosfera** se define como el volumen de suelo asociado e influenciado por las raíces de las plantas (Moreno-Gómez y col., 2012) y que también se encuentra adherido a la raíz de la planta y que a menudo se extiende de uno a cinco milímetros de la superficie de las raíces (Figura 2.5). Se estima que la concentración de bacterias en la rizósfera es de 10 a 1000 veces mayor que en el suelo alejado de esta zona (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

La rizosfera también es el ambiente donde existe un flujo de compuestos orgánicos producto de la fotosíntesis que son exudados de la raíz (Berea y col., 2005), así como el hábitat ecológico en el cual los microorganismos están en contacto directo con la raíz de las plantas (Arshad y Frankenberger, 1998). Muchos de los aspectos importantes de las interacciones suelo-planta son mediados por los procesos de la rizosfera así como los efectos que ejercen las propiedades del suelo sobre las interacciones microorganismos-raíz, incluyendo, la disponibilidad de nutrimentos, colonización de la raíz por los microorganismos y descomposición de la materia orgánica (Cheng, 1999).

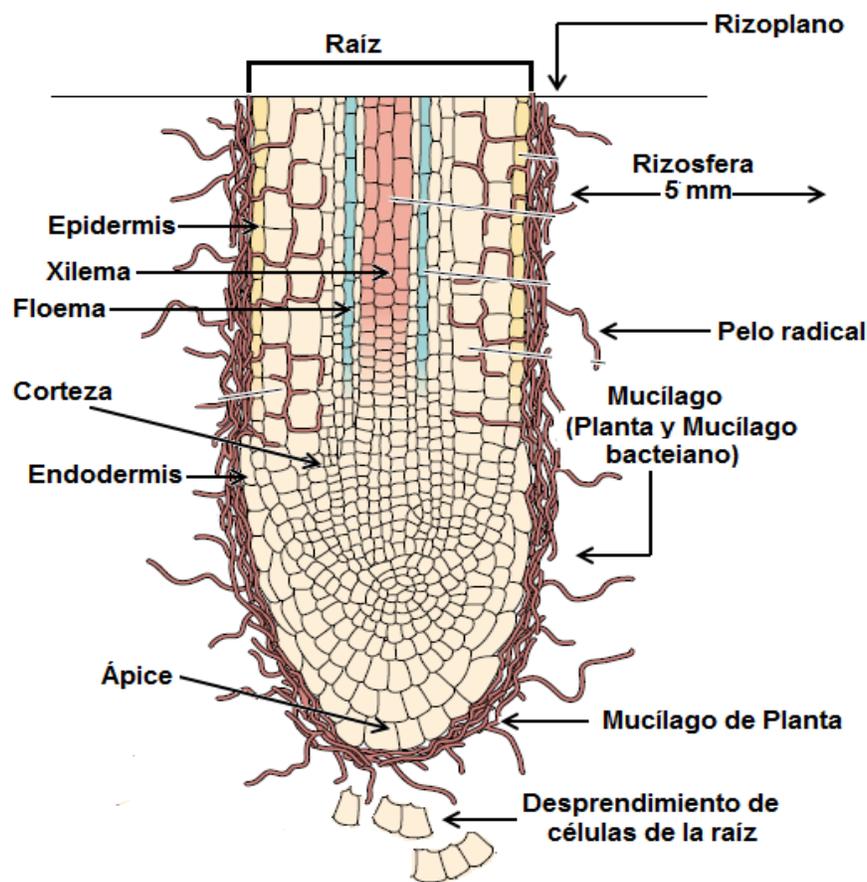


Figura 2.5 Partes de la zona de la rizósfera

En los microambientes de esta zona están asentadas poblaciones microbianas asociadas a la presencia de los exudados radicales y que participan en la formación de los agregados rizosféricos ricos en metabolitos microbianos principalmente del tipo aminoácidos, fitohormonas, minerales y polisacáridos entre otros (Reyes y col., 2008), disolución y mineralización de fosfatos, fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico y producción de sideróforos y antibióticos (Vessey, 2003).

Varios estudios se han centrado en la colonización de la rizosfera por bacterias benéficas, generalmente se encuentran densidades de población microbiana de aproximadamente 10^7 - 10^9 CFU g^{-1} de suelo (bacterias cultivables de la rizosfera), manteniéndose estable como microcolonias o biopelículas (Compant y col., 2010). Se estima que de un 2 a 5% de las bacterias presentes en la rizósfera

ejercen un efecto benéfico sobre el desarrollo y crecimiento de las plantas (Kloepper y Schroth, 1978). La mayoría de los organismos rizosféricos ocurren dentro de los 50 μm más cercanos a la superficie de las raíces; las poblaciones dentro de los primeros 10 μm pueden alcanzar 1.2×10^8 células cm^{-3} o 10^9 - 10^{12} células microbianas g^{-1} suelo (Gray y Smith, 2005).

Los microambientes que se crean a lo largo de la rizósfera provocan que la distribución de microorganismos no sea uniforme, por ejemplo, *Kluyvera ascorbata* coloniza los 2/3 superiores de la superficie de las raíces de canola, pero no habita en las puntas de las raíces (Moreno-Gómez, 2012), mientras que *Azospirillum* coloniza las zonas de elongación y formación de pelos radicales absorbentes de las plantas (Bashan y Holguin, 1997).

La colonización de las raíces es un proceso mediante el cual las bacterias sobreviven en la inoculación de semillas o en el suelo, se multiplican en la espermósfera en respuesta a los exudados de semillas ricas en carbohidratos y aminoácidos, se adhieren a la superficie de la raíz y colonizan el sistema de raíz en desarrollo. Por lo tanto las rizobacterias son eficientes competidores microbianos en la zona de las raíces que desplazan a los microorganismos nativos colonizando fácilmente las raíces (Kloepper y col., 1991). Sin embargo después de la colonización de la rizosfera algunos microorganismos pueden introducirse en las raíces (endófitos) y mantener poblaciones que van desde 10^5 - 10^7 CFU g^{-1} de peso fresco, así como también se ha reportado colonización bacteriana en vasos del xilema provocando una translocación de las mismas bacterias a las partes vegetativas de la planta con una densidad de población de 10^3 - 10^4 CFU g^{-1} de peso fresco encontrándose hasta en frutos, flores y semillas (Compant y col., 2010).

Dado que las plantas proporcionan un ambiente y los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos, y éstos, a su vez, proveen a las plantas de sustancias que promueven su crecimiento, las relaciones que se establecen entre los microorganismos benéficos y las plantas son de tipo mutualista. A este respecto es importante mencionar que algunos autores equiparan el término mutualismo con el de simbiosis (Moreno-Gómez, 2006).

2.2.2.4 Uso de Biofertilizantes en la Agricultura

Como se ha mencionado anteriormente el uso de microorganismos en la agricultura se ha estado practicando constantemente, además de que se ha intensificado la necesidad de conocer los mecanismos que son activados en la interacción bacteria-planta, así como formular fertilizantes que puedan ser empleados en la producción agrícola que mejoren la condición del suelo, al volver biodisponibles nutrientes como nitrógeno y fósforo. En la actualidad se utilizan diferentes microorganismos con funciones específicas en la agricultura para mejorar la productividad de las plantas. Esta nueva actitud ha favorecido el desarrollo de tecnologías de producción menos contaminantes como los son los biofertilizantes.

El término **biofertilizante** es ampliamente utilizado y hace referencia al "*inoculante biológico*". Por lo general, se refiere a formulaciones de microorganismo (s) vivos o latentes (bacterias u hongos, solos o combinados) y que son agregados a los cultivos agrícolas para estimular su crecimiento y productividad y que pueden ser un sustituto parcial o completo para la fertilización química (Aguado-Santacruz, 2012).

También son conocidos como bioinoculantes, inoculantes microbianos o inoculantes del suelo, son productos agrobiotecnológicos que contienen microorganismos. La razón de usar la palabra "fertilizante" es que en algunos países se facilita el registro para uso comercial (Bashan, 1998).

Los efectos deseados del inoculante en el crecimiento de plantas pueden incluir la fijación de nitrógeno, control biológico, mejora de la absorción de minerales, y los efectos nutricionales u hormonales de las plantas, mientras que productos orgánicos como estiércol, residuos de cosechas, composta y vermicomposta que también son agregados al suelo para favorecer su nutrición no son considerados como biofertilizantes sino como **fertilizantes orgánicos** (Aguado-Santacruz, 2012).

Los biofertilizantes constituyen una alternativa viable para reducir costos de producción y el impacto ambiental asociado a la fertilización química. Esta tecnología permite incrementar el valor agregado y rendimiento de los cultivos de 17 a 50 %, mejorando la fertilidad del suelo y reduciendo las poblaciones de microorganismos nocivos para los cultivos. Dentro del contexto de agricultura

sustentable, la inoculación de plantas con microorganismos que disminuye la incidencia de enfermedades y disminuyen la dependencia de agroquímicos es una alternativa biotecnológica real y particularmente atractiva para incrementar la productividad de los cultivos (Moreno-Gómez, 2012). Shahroona y col. (2006), muestra que en un estudio realizado en un cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.), se obtuvo un rendimiento del 75% en la densidad de planta, esto en comparación con la que se obtuvo al aplicar la cantidad recomendada de fertilizante NPK.

2.2.2.5 Clasificación de los biofertilizantes

Los biofertilizantes pueden ser clasificados conforme al tipo de microorganismos empleados en su formulación y que a su vez mantienen un mecanismo de acción específico.

2.2.2.5.1 Inoculantes bacterianos

Las rizobacterias comúnmente aplicadas para la formulación de inoculantes bacterianos en la agricultura incluyen: bacterias fijadoras de nitrógeno y bacterias solubilizadoras de fosfatos. Estas bacterias al estar en contacto con el microambiente de la rizosfera emplean complejos enzimáticos y estos a su vez producen compuestos que son asimilables para las plantas, además estas bacterias pueden ser de vida libre o pueden formar simbiosis estrictas. En adición a su efecto benéfico sobre la asimilación de nutrientes, algunas bacterias promotoras de crecimiento pueden funcionar además como agentes de control biológico eficientes contra diversos organismos patogénicos. Por ejemplo, además de su reconocida capacidad de producción de sideróforos, *Pseudomonas fluorescens* sintetiza un potente antibiótico llamado 2,4 diacetilfloroglucinol que contribuye a mejorar su actividad antagónica contra el agente causal de la pudrición blanda de la papa (Aguado-Santacruz, 2012).

2.2.2.5.2 Inoculantes de micorrizas

Para los inoculantes producidos a partir de micorrizas, se ha desarrollado una investigación mucha más intensa específicamente sobre las micorrizas, esto debido

a los beneficios que aporta en la nutrición de las plantas. Las micorrizas se dividen en ectomicorrizas y endomicorrizas de acuerdo a la interacción que tienen con la planta. Las endomicorrizas conforman el grupo de micorrizas más difundido en el planeta y está dividido en varios subtipos, de los cuales el más representativo e importante es el arbuscular. Las hifas de las micorrizas arbusculares se extienden ampliamente en el suelo y funcionan como una extensión de las raíces de la planta incrementando la capacidad de absorción de agua y nutrientes del suelo como los son fósforo y minerales (Abbott y Robson, 1984).

El biofertilizante ya formulado consiste básicamente en suelo impregnado con propágulos de una especie o ecotipo determinado de hongo (esporas, micelio, raíces con vesículas y arbusculos). Comúnmente, la calidad de un biofertilizante micorrízico se determina por su contenido de esporas, las cuales también sirven para realizar estudios taxonómicos de los hongos, el hongo más utilizado para la formulación de biofertilizantes es *Trichoderma* sp. (Harman, 2006).

2.2.2.5.3 Inoculantes compuestos

Dentro de la formulación de biofertilizantes también se tienen consideradas mezclas de microorganismos pues se ha evidenciado por experimentos de campo que existe un sinergismo en la promoción del crecimiento de las plantas al emplear dos o más microorganismos promotores del crecimiento. Sin embargo, la formulación de este tipo de biofertilizantes para que sean efectivos en campo requiere la realización de minuciosos estudios para conocer y entender los requerimientos nutricionales y ambientales de cada uno de los microorganismos a emplear y los resultados de su interacción en términos fisiológicos y ecológicos para que sean compatibles y con actividad sinérgica en cuanto a sus efectos sobre las variables agrónomicamente importantes de los cultivos, en campo o invernadero.

Desde hace varios años el empleo de bacterias y hongos solubilizadores de fósforo ha sido una práctica agrícola común. Asimismo se ha encontrado que la combinación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal y micorrizas arbusculares puede ser útil para incrementar el crecimiento en trigo en suelos de baja fertilidad (Galal y col., 2003).

2.2.2.5.4 Inoculantes comerciales

Los biofertilizantes más comercializados en la actualidad, son inocuos para el hombre y el ambiente, y la mayor respuesta agronómica se ha encontrado en suelos de baja fertilidad. Son más económicos y de fácil transportación, en comparación con los fertilizantes de origen químico sintético que utilizan los productores. Existen diversas presentaciones para su comercialización. Los más comunes son los que se aplican a la familia y van impregnados en turba (materia orgánica de líquenes), pero también pueden distribuirse en suelo molido, medios de agar, caldos nutritivos, liofilizados, o en medios de aceite.

2.2.2.5.5 Características físicas del inoculante

Un componente importante de la formulación de los biofertilizantes es el llamado vehículo de suministro de los microorganismos el cual puede ser una suspensión o polvo y debe de tener la capacidad de mantener la cantidad adecuada de células viables en buen estado fisiológico en el momento de su aplicación (Travors y col., 1992). Los inoculantes comerciales se pueden encontrar en cuatro formas básicas:

Polvos.- Esta forma se utiliza como un recubrimiento de semillas, antes de ser sembradas. Cuanto más pequeño es el tamaño de partícula, mejor es el biofertilizante pues este se adherirá con mayor facilidad a la semilla. Los tamaños estándar varían desde 0.075-0.25 mm y la cantidad de inoculante utilizado es de 200 a 300 g/ha. Estos biofertilizantes son las más comunes, tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo (Tang y Yang, 1997).

Lodos.- Este biofertilizante se basa en la mezcla de inoculantes en polvo con una suspensión en un líquido (normalmente agua). La suspensión se aplica directamente sobre el surco o de forma alternativa las semillas se sumergen en la suspensión justo antes de la siembra.

Granulados.- Estos biofertilizantes se aplican directamente al surco con las semillas. El tamaño de la partícula varía de 0.35-1.18 mm, donde se llega a utilizar una proporción de 5 a 30 Kg/ha.

Líquidos.- Estos biofertilizantes son formulaciones líquidas, principalmente en agua, pero también en aceites minerales u orgánicos. Las semillas se sumergen ya sea en el inoculante antes de la siembra o con un aspersor y se aplica de manera uniforme sobre las semillas, después del secado las semillas se siembran. (Smith, 1995). Esta presentación de biofertilizante puede funcionar como agente de control biológico sobre enfermedades de la hoja, el biofertilizante se puede diluir en agua y se asperja para una mejor cobertura de las hojas (Daayf y col., 1995), posteriormente la suspensión se puede volver a asperjar directamente en el surco o sobre las semillas antes de la siembra.

2.3. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

2.3.1. Algunos grupos taxonómicos

Actualmente se ha implementado el uso de los microorganismos benéficos del suelo, que pueden promover el crecimiento de las plantas. Esta actividad de promoción de crecimiento se refleja en diversas variables agronómicas, como el incremento de la germinación, emergencia, establecimiento o vigor de las plántulas, proliferación del sistema radical, incremento en la biomasa de las plantas, rendimientos finales de los cultivos, no menos importantes son las actividades que ejercen estos microorganismos sobre el desarrollo de las plantas adelantando los tiempos de floración en plantas ornamentales o bien mejorando la calidad de los frutos en cuanto a su tamaño o propiedades organolépticas.

Las cepas bacterianas más empleadas para inoculantes, se encuentran dentro de los generos: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* como asociaciones simbióticas o de vida libre como *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* (Loredo-Osti y col., 2004). Estos últimos están asociados a las partículas del suelo generando interacciones con las raíces de las plantas, en la zona de la rizosfera (Peña y Reyes, 2008). A continuación se describe brevemente algunos de estas bacterias empleadas en el presente trabajo.

2.3.1.1. *Bacillus* spp.

Estos microorganismos se caracterizan por ser bacterias Gram positivas con forma bacilar, aerobias estrictos o anaerobias facultativas que en condiciones estresantes forman una endoespora central, que deforma la estructura de la célula.

Esta forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos comunes. Esta bacteria es capaz de generar un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos, en donde se encuentran la producción de sustancias antibióticas, producción de lipopéptidos que actúan como biosurfactantes, solubilización de fosfatos y reducción de enfermedades en las plantas (Kokalis-Burelle y col., 2006).

2.3.1.2. *Pseudomonas fluorescens*

Esta bacteria es un cocobacilo Gram negativo, que se encuentra como saprófito en el suelo. Abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las mismas, pero no establecen una relación simbiótica con la planta. Entre sus mecanismos de acción se encuentran el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta, la solubilización de fosfatos, la producción de reguladores del crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos, dado fundamentalmente por la producción de sideróforos, la antibiosis y la inducción de resistencia a la planta, mediante la producción de ácido salicílico, el cual actúa como una molécula de señalización que activa la resistencia sistémica inducida (RSI) que es muy similar al sistema inmunológico en el ser humano (Zhang y col., 2007).

2.3.1.3. *Actinomicetos*

Los actinomicetos son microorganismos ubicuos y se encuentran sobre la gran mayoría de sustratos naturales. Entre las propiedades más comunes de estos bacilos Gram positivos, se encuentra la tendencia a formar ramificaciones cortas; son quimio-organotrofos, aerobios, mesófilicos y crecen óptimamente en pH cercano a la neutralidad. Numerosos estudios demuestran la importancia de los actinomicetos sobre todo de *Streptomyces* sp., como controlador de hongos

fitopatógenos del suelo y promoción de crecimiento en plantas; por este motivo, los métodos comúnmente utilizados para el aislamiento y recuento de cepas de *actinomicetos* provenientes de suelo o rizosfera utilizados para biocontrol o promoción de crecimiento en plantas, tratan exclusivamente con aquellos adecuados para las especies de *Streptomyces* (Ortas y col., 2011).

2.3.2. Interacción planta-bacteria

Las bacterias que habitan en la rizósfera son conocidas comúnmente como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV), Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) o bien PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), por sus siglas en inglés.

Para que las BPCV puedan tener un efecto benéfico sobre el crecimiento de plantas a través de una mejora de la situación de los nutrientes de su huésped, es evidente que tiene que ser una relación íntima entre el BPCV y la planta huésped. Sin embargo, la interacción entre el BPCV y la planta huésped puede variar dependiendo de dónde y cómo la BPCV coloniza la planta huésped (Figura 2.6).

Las interacciones entre las BPCV y sus hospederos las plantas se pueden clasificar de dos formas de acuerdo a su complejidad: rizosférico y endofítico (Vessey, 2003). En las interacciones rizosféricas, las BPCV pueden colonizar la superficie de la raíz o los espacios intercelulares, incluso superficiales (aunque esta última situación a menudo puede implicar capas de células muertas) (McCulley, 2001).

En muchas interacciones rizosféricas, las BPCV en realidad se adhieren a la superficie de la planta (Andrews y Harris, 2000). La colonización de las superficies radiculares por BPCV no es uniforme. En las interacciones endofíticas se sabe que las BPCV se encuentran dentro de los espacios apoplásticos de las planta huésped.

La simbiosis mejor caracterizada está relacionada con la colonización de las plantas hospederas como lo son las legumbre.

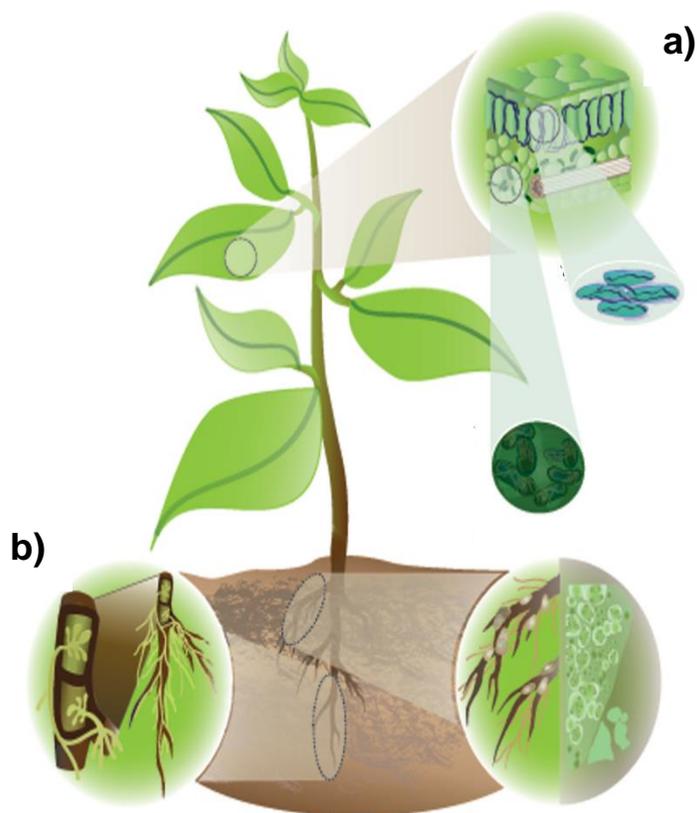


Figura 2.6. Interacción planta-bacteria. **a)** Forma de interacción endofítica que incluye hongos y bacterias. **b)** Forma de interacción rizosférico (McCulley, 2001).

La quimioatracción, infección de la microsimbionte, el desarrollo de nódulos en la raíz que albergan a la bacteria es un proceso complejo. Algunas especies de BPCV endofíticos se sabe que tienen actividades de celulasa y pectinasa (Kovtunovych y col., 1999) y estas actividades intervienen en el proceso de la infección, sin embargo en gran medida las capas de lignina de las células constituyen otra barrera para las bacterias. Dependiendo de la planta huésped y el endófito, los biofertilizantes BPCV se pueden encontrar en todas las partes de plantas, semillas, raíces, tallos, hojas, frutas (McCulley, 2001).

2.3.3. Mecanismos de BPCV para promover el crecimiento vegetal.

Dentro de los mecanismos para la promoción del crecimiento vegetal encontramos dos tipos, mecanismos directos e indirectos.

Los **mecanismos directos** son aquellos en donde los microorganismos actúan sobre la planta. Dentro de estos encontramos la producción de promotores de crecimiento vegetal (también llamados fitohormonas), como auxina, giberelinas y citoquininas. La producción de estos metabolitos, también generan una mejor regulación de estomas, lo que evita su deterioro el cual está asociado al marchitamiento en la planta. Ocasionalmente también un desarrollo radical más ramificado jugando un papel fundamental en la absorción del agua y en el mejoramiento de la nutrición al aumentar su acceso a los nutrientes en el suelo (Kloeper y col., 1991). Adicionalmente, las BPCV pueden promover el crecimiento vegetal mejorando la disponibilidad de nutrientes en el suelo mediante solubilización de fósforo, fijación de nitrógenos y producción de sideróforos (Figura 2.7). Igualmente se ha demostrado que las rizobacterias ayudan a disminuir la resistencia a la conductividad hidráulica, lo cual le da a las plantas una mayor tolerancia a periodos de sequía (Vesey, 2003).

Los **mecanismos indirectos** son aquellos en donde el microorganismo es capaz de inhibir diferentes patógenos que interfieren con el desarrollo de la planta. Fitopatógenos como hongos y bacterias son neutralizados por diversos mecanismos, como competencia por espacio o nutrientes, o también producción de metabolitos antibióticos, secreción de diversas enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de los patógenos (Reyes y col., 2008). También se ha evidenciado la producción de sideróforos los cuales se definen como moléculas pequeñas con cadenas laterales y grupos funcionales que les proporcionan alta afinidad para captar y concentrar iones férricos. Estas moléculas son producidas típicamente por bacterias, hongos y plantas monocotiledóneas en respuesta al estrés por concentraciones limitantes de hierro en el ambiente (Pérez y col., 2007).

Debido a que la biodisponibilidad de hierro es limitada en el suelo, la producción de sideróforos juega un papel importante en la competencia por este recurso, ya que, en general, los sideróforos producidos por bacterias tienen una

mayor afinidad a este elemento que los producidos por hongos, limitando así a posibles patógenos (Compant y col., 2005).

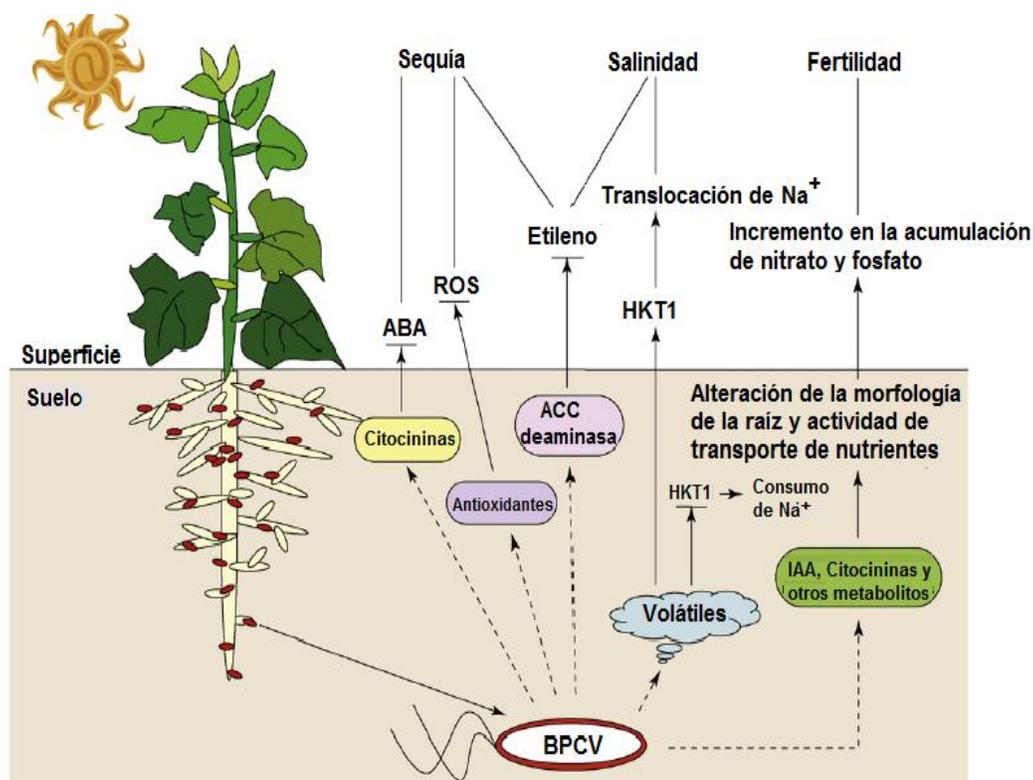


Figura 2.7. Mecanismos para la promoción del crecimiento vegetal provocado por las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) (Compant y col., 2005).

2.3.4. Potencial Agrícola de las Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal como biofertilizantes.

2.3.4.1. Bacterias fijadoras de Nitrógeno.

Algunas de las bacterias son versátiles y pueden presentar varios mecanismos para promover el crecimiento de las plantas (Tabla 2.4). La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es la reducción enzimática de nitrógeno atmosférico (N₂) a amonio (NH₄). Este proceso es exclusivo de algunas bacterias denominadas bacterias diazotróficas (Sessitsch y col., 2002).

Tabla 2.4. Mecanismos de BPCV para promover el crecimiento vegetal

Factor producido	*BPCV	Cultivo
Ácido Indalacetico (IAA)	<i>Aeromonas veronii</i>	Arroz
	<i>Agrobacterium</i> sp.	Lechuga
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Trigo
	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Rábano
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Rábano
Citoquininas	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Trigo
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Soya
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Lechuga
Giberelinas	<i>Bacillus</i> sp.	Trigo
ACC deaminasa	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Soya
Fijación de N₂	<i>Pseudomonas syringae</i>	Alfalfa
	<i>Azospirillum</i> sp.	Maíz
	<i>Azotobacter</i> sp.	Trigo
Biocontrol contra enfermedades y patógenos	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Tomate
	<i>Bacillus</i> sp.	Calabacita
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Chile
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Pimiento
	<i>Bacillus cereus</i> MJ-1	Chile
	<i>Azospirillum ipoferum</i>	Chícharo

*Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (Vessey, 2003).

En algunas plantas este proceso reductivo se lleva a cabo en estructuras especializadas (como los nódulos radicales de las leguminosas). La FBN es una opción importante para la recuperación de la fertilidad del suelo, en especial ahora cuando la aplicación de fertilizantes es un procedimiento caro que, además pueden incrementar la contaminación (Zahran, 1999).

Las BPCV más estudiadas y explotadas son los rizobios (incluyendo *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*) por su capacidad para fijar N₂ en leguminosas sus hospederos (Vessey, 2003).

El proceso de reducción de N₂ a NH₄⁺ está catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa, que consta de dos proteínas distintas llamadas dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa, las cuales son metaloenzimas. Ambos componentes tienen hierro y la dinitrogenasa también contiene molibdeno (Zahran, 2001). En la dinitrogenasa, el hierro y el molibdeno (Mo) forman parte de un cofactor conocido como *FeMo-Co*, el cual es el centro donde ocurre la reducción real del N₂.

Lo anterior explica el requerimiento de molibdeno (Mo) para la fijación biológica de nitrógeno. En el proceso de fijación de nitrógeno, la planta demanda energía, ya que la reducción del N₂ por la nitrogenasa es acompañada por la reducción del H⁺. La eficiencia en la incorporación de N durante el crecimiento, así como la cantidad de carbono usado por cada grupo bacteriano en el proceso de fijación, varía de acuerdo con el tipo de organismo (Zahran, 2001).

2.3.4.2. Regulación de niveles de etileno

El etileno es una hormona vegetal que puede inhibir el desarrollo de la raíz por tanto limitar la capacidad de las plantas de absorber nutrientes y agua. En las plantas superiores, la enzima S-adenosil-L-metionina (SAM) sintasa cataliza la conversión de metionina a SAM. En respuesta a distintos tipos de estrés que incluyen lesiones, estrés por agua (anegamiento y sequía), salinidad, herbicidas, entre otros, la enzima ACC sintasa cataliza la conversión de SAM en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) precursor inmediato de etileno.

Posteriormente, la enzima ACC oxidasa cataliza la conversión de ACC a etileno, dióxido de carbono y cianuro de hidrógeno (John, 1991). Este aumento en los niveles de etileno provoca un retraso en crecimiento de raíz. Algunos microorganismos por ejemplo algunas especies de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, poseen una enzima llamada ACC desaminasa que hidroliza el ácido 1-

aminociclopropano-1-carboxílico, precursor inmediato del etileno, para formar amoniaco y α -cetobutirato y con esto impedir la formación de etileno.

Consecuentemente, cuando la actividad de la ACC desaminasa incrementa, los niveles de etileno en la planta disminuyen y el desarrollo de la raíz aumenta visiblemente (Patten y Glick, 2002).

2.3.4.3. Síntesis de hormonas

Las hormonas son compuestos naturales que en bajas concentraciones son capaces de afectar procesos morfológicos y fisiológicos fundamentales de las plantas. La producción de sustancias promotoras del crecimiento (auxinas, giberelinas y citocininas) ha sido uno de los principales mecanismos de acción directa empleados para explicar la estimulación de crecimiento por la aplicación de biofertilizantes (Patten y Glick, 1996). La producción de ácido indol acético (AIA) es uno de los sistemas de promoción de crecimiento más extendido dentro de las bacterias, particularmente Gram negativas. El precursor de esta hormona, el aminoácido triptófano, es uno de los compuestos mayormente abundantes en los exudados radicales (Kamilova y col., 2006).

2.3.4.4. Solubilización de nutrimentos

Como ya se ha mencionado anteriormente las BPCV pueden favorecer el desarrollo de los cultivos debido a su capacidad de fijar N_2 o bien por la producción de hormonas que ocasionan cambios en la morfología de la raíz que inducen a una mayor adquisición de nutrimentos. En relación con las BPCV sobre los nutrimentos los efectos son favorables, debido a que algunas de ellas tienen la capacidad de producir moléculas conocidas como **sideróforos** (principalmente péptidos no ribosomales) también llamados “portadores o acarreadores de hierro” son moléculas de bajo peso molecular de 0.5 a 1.0 kDa (Hu y col., 2011), solubles en soluciones acuosas a pH neutro que son sintetizados por bacterias, principalmente Gram negativas, hongos, levaduras y algunas plantas (fitosideróforos), particularmente gramíneas y que actúan como agentes quelantes específicos de Fe^{+3} , también conocidos como ligandos (Aguado-Santacruz, 2012).

La reacción de un ion metálico divalente o trivalente con un ligando forma un quelato. Un quelato es el producto soluble formado cuando ciertos átomos de un ligando orgánico donan electrones al catión. Los grupos carboxilo y los átomos de nitrógeno cargados negativamente poseen electrones que pueden ser compartidos de esta manera. A pH neutro, la disponibilidad de hierro en suelo es muy limitada para las plantas debido a la baja solubilidad de las fases minerales (como los óxidos de hierro) con las que se asocia este elemento (Rakumar y col., 2010).

Los sideróforos disuelven estas fases minerales formando complejos solubles de hierro que pueden ser introducidos en las células vegetales mediante mecanismo de transporte activo. Bajo condiciones anóxicas (con poco oxígeno), el hierro se encuentra por lo general en un estado de oxidación Fe^{+2} (ión ferroso) que es soluble. Sin embargo, bajo condiciones óxicas (con una alta concentración de oxígeno), el hierro se encuentra como ión férrico Fe^{+3} que es capaz de formar diversos minerales insolubles (Crowley, 2006). La producción de sideróforos se ha asociado con diversas bacterias de vida libre, en especial del grupo de las *Pseudomonas fluorescens* que produce un sideróforo peptídico de alta afinidad por el hierro llamado pioverdina, enterobactina y bacillibactina de *Bacillus subtilis*, ferrioxamina B de *Streptomyces pilosus*, ferricromo de *Ustilago sphaerogena*, micobactina de *Mycobacterium* sp. (Crosa y col., 2004).

Por otro lado el **fósforo (P)** es el segundo nutriente mineral de importancia después del nitrógeno que limita el crecimiento de las plantas terrestres, pues es un componente primordial de moléculas fundamentales para los seres vivos tales como ARN, ADN, AMP, ADP, ATP y fosfolípidos. La deficiencia de fósforo ocasiona una reducción del crecimiento de las plantas, alteración de las hojas a un verde azulado y la producción de frutos pequeños y ácidos. Irónicamente, los suelos pueden tener grandes reservas de fósforo total, pero las cantidades disponibles para las plantas es por lo general una pequeña proporción de éste (Goldstein y col., 2003). La baja disponibilidad de P para las plantas se debe a que la gran mayoría de éste nutriente se encuentran en formas insolubles, y las plantas sólo pueden absorber P en dos

formas solubles, la monobásicos (H_2PO_4^-) y el dibásicos (HPO_4^{2-}) (Aguado-Santacruz, 2012).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos son comunes en la rizosfera en conjunto con la secreción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, los cuales quelan los cationes unidos al fosfato a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo, favorecen de esta forma la conversión en formas solubles, además en adición algunas bacterias producen fosfatasas como la fitasa, que hidrolizan las formas orgánicas de los compuestos de fosfato y estar disponibles para las plantas, lo anterior se realiza a través del proceso conocido como solubilización de fosfato mineral. La solubilización de P en la rizosfera es el forma común de acción implicados en las BPCV que aumentan la disponibilidad de nutrientes de las plantas hospederas (Goldstein y col., 2003). Algunas de las bacterias que solubilizan fosfato mediante producción de ácidos orgánicos incluyen géneros *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* (Aguado-Santacruz, 2012).

El **azufre (S)** es el cuarto elemento más importante para el crecimiento de las plantas después del nitrógeno, fósforo y potasio. La importancia del azufre es igual a la del nitrógeno en términos de síntesis de proteínas, mientras que en términos de asimilación por los cultivos es mayor a la del fósforo (Vidyalakshmi y Sridar, 2007).

La fuente original de azufre en la tierra se encontraba en rocas ígneas, principalmente en pirita ígnea (FeS_2). La transferencia de azufre entre las fuentes orgánica e inorgánica dentro del ciclo del azufre es causada enteramente por la actividad de la biota del suelo, particularmente por la biomasa microbiana, la cual posee el potencial más grande para la mineralización y la subsecuente transformación del estado de oxidación del azufre. El sulfato es la principal forma de azufre asimilada por las plantas, por lo que se requiere que este elemento sea convertido en esta sal para que los cultivos lo puedan asimilar. La oxidación del azufre que conlleva a la formación de sulfato es el proceso más importante del ciclo del azufre que incrementa la fertilidad del suelo. Adicionalmente, la acidificación del

suelo resultante de este proceso de oxidación ayuda a solubilizar los nutrientes y mejorar la fertilidad de los suelos con problemas de alcalinidad (Wainwright, 1984).

Los microorganismos oxidantes del azufre son primordialmente bacterias Gram negativas de los géneros *Thiobacillus*, *Thiomicrospira* y *Thiosphaera*, aunque algunas bacterias heterótrofas como *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas* también pueden exhibir crecimiento quimiolitotrófico en compuestos de azufre inorgánico. Los procariontes aeróbicos oxidantes de azufre pertenecen a los géneros *Acidianus*, *Acidithiobacillus*, *Aquaspirillum*, *Aquifex*, *Bacillus*, *Beggiatoa*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Starkeya*, *Sulfolobus*, *Thermithiobacillus*, *Thiobacillus* y *Xanthobacter* y son principalmente mesófilos (Vidyalakshmi y Sridar, 2007).

2.3.4.5. Producción de compuestos volátiles

Como es bien conocido los compuestos volátiles se evaporan rápidamente a temperatura y presión normales. Algunas cepas de rizobacterias pertenecientes a *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Enterobacter cloacae* promueven el crecimiento de las plantas liberando compuestos volátiles (Ryu y col., 2003). La promoción de crecimiento por compuestos volátiles es uno de los mecanismos más recientemente estudiados.

La acetoina (3-hidroxi-2 butanona) y el 2,3 butanodiol son compuestos volátiles producidos por *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* que promueven el crecimiento *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*. Algunos de estos compuestos actúan regulando la síntesis de auxinas y expansión celular, aunque también se ha propuesto un papel en la inducción de resistencia sistémica y antibiosis.

Ciertamente esta área del conocimiento requiere más investigación a fin de identificar nuevos compuestos y dilucidar nuevas vías de señalización involucradas en las interacciones de las plantas con los microorganismos promotores de crecimiento (Aguado-Santacruz, 2012).

2.4. Control biológico

2.4.1. Antagonismo

El antagonismo está relacionado con la síntesis de antibióticos o antibiosis (Figura 2.8a) ha sido referida en diversos microorganismos promotores del crecimiento vegetal y es el mecanismo más comúnmente asociado con la capacidad de un biofertilizante para inhibir fitopatógenos (Lugtenberg y Kamilova, 2009). La habilidad de algunas bacterias de suprimir hongos patógenos depende de su habilidad de producir antibióticos como pioluteorina, pirronitrina, ácido fenacin-1-carboxílico y 2,4-diacetilfloroglucinol (Picard, 2000). Otros compuestos liberados por las bacterias a través de los cuales son capaces de inhibir el crecimiento de fitopatógenos es la producción de cianuro de hidrógeno (HCN) y/o enzimas líticas, que incluyen quitinasa, -1,3 glucanasa, proteasas y lipasas (Arora y col., 2007). Aún y cuando las actividades pectinolíticas se asocian comúnmente con bacterias patogénicas, algunas especies de bacterias no patogénicas como *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia* son también capaces de degradar pectinas. En términos generales las enzimas pectinolíticas juegan un papel fundamental en la invasión de las raíces por las bacterias (Aguado-Santacruz, 2012).

2.4.2. Inducción de resistencia a patógenos

La investigación sobre los beneficios de los inoculantes microbianos se extiende más allá de sus capacidades para mejorar la nutrición vegetal, ya que los inoculantes microbianos pueden ser inductores de los procesos de resistencia sistémica adquirida (RSA) (Figura 2.8b) de las plantas a diferentes agentes fitopatógenos como *Blumeria graminis*, *Gaeumannomyces graminis*, *Pseudomonas syringae* y *Fusarium culmorum* (Lugtenberg y Kamilova, 2009). En las plantas, la RSA es una respuesta de resistencia globalizada de la planta que ocurre después de que es expuesta al contacto con un patógeno o un producto derivado de éste.

En un sentido amplio, la resistencia sistémica adquirida de las plantas es equivalente a las respuestas del sistema inmune de los animales al ataque de patógenos.

Después de una exposición temprana y localizada a ciertos organismos infecciosos, la RSA activa los mecanismos de resistencia a nivel de planta contra una amplia variedad de patógenos, además de aquellos que la indujeron, razón por la cual se le refiere como una respuesta de amplio espectro.

A fin de potenciar la RSA de las plantas, la formulación de los biofertilizantes ha considerado la inclusión de productos tales como quitina o quitosán (o quitosano) (Ramos-Solano y col., 2008).

2.4.3 Competencia por espacio y nutrientes

Para poder ejercer su efecto benéfico sobre las plantas los microorganismos promotores de crecimiento deben ser capaces de competir contra otros microorganismos presentes en la rizósfera por los nutrientes secretados mediante la raíz y por los espacios físicos disponibles en la misma (Figura 2.8c). Solamente una pequeña parte de la superficie radical está cubierta por bacterias. Los sitios predilectos para el crecimiento bacteriano son las uniones de entre las células epidérmicas y los puntos del origen de las raíces laterales. Una vez que los microorganismos del suelo colonizan las raíces de las plantas ocupan los espacios intracelulares y consumen nutrientes que de otra manera podrían ser aprovechados por agentes fitopatógenos (Kloepper y col., 1978).

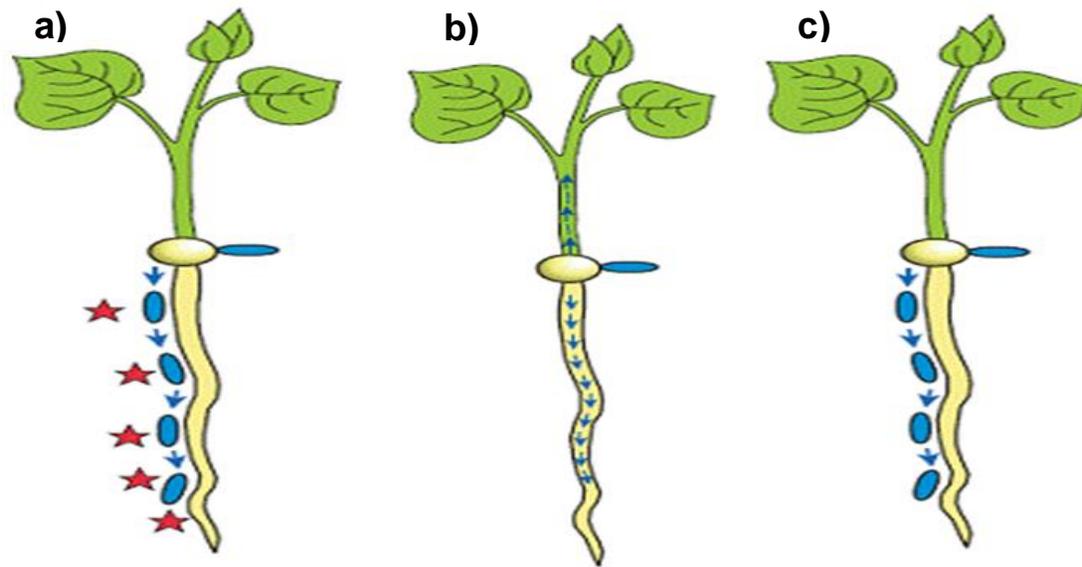


Figura 2.8. Mecanismos de control biológico que ejercen las bacterias sobre las plantas. **(a)** Antibiosis, **(b)** La resistencia sistémica inducida (ISR), **(c)** La competencia por los nutrientes y nichos (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

III. JUSTIFICACIÓN

En respuesta a la necesidad de generar cultivos con trazas mínimas o nulas de agroquímicos que no afecten la salud humana se ha venido implementado el uso de tecnologías orgánicas. Una de las alternativas para optimizar la aplicación de fertilizantes químicos es el empleo de biofertilizantes de origen microbiano conocidos como promotores del crecimiento vegetal, los cuales al ser aplicados a las semillas, al suelo o a las plantas, colonizan la raíz y/o rizósfera promoviendo su crecimiento, por un incremento en la absorción y disponibilidad de nutrientes mejorando el estatus nutricional de las plantas. Algunos mecanismos bioquímicos identificados en los microorganismos incluyen: la fijación biológica de N_2 , la producción de ácido indolacético (hormona del crecimiento vegetal), la solubilización de fosfatos insolubles y la actividad ACC deaminasa entre otros. El efecto de los biofertilizantes en el cultivo de hortalizas ha sido ampliamente documentado en cultivos como papa, cebolla y tomate. Las necesidades actuales de mejorar el rendimiento y calidad de las plantas en el sector hortícola se han incrementado específicamente sobre el cultivo del pimiento, debido a sus múltiples usos y por un gran número de atributos que son indicadores de su calidad. Por lo anterior el objetivo de este trabajo es evaluar la aplicación de inoculantes bacterianos en cultivos de pimiento sobre variables de calidad y producción.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto de la aplicación de dos biofertilizantes de origen bacteriano (*Bacillus sp.* y Rhizobac combi®) en la producción y calidad del fruto del pimiento (*Capsicum annuum* L.) cv cannon.

Objetivos específicos:

1.- Evaluar el efecto de los biofertilizantes sobre las variables agronómicas del cultivo de pimiento como son: frutos/planta y rendimiento (g de fruto/m²), peso promedio del fruto (g), y número de frutos por planta durante la etapa de cosecha.

2.- Evaluar el efecto de los biofertilizantes sobre los parámetros de calidad nutrimental de frutos de pimiento como lo son: parámetros de color, pH, acidez titulable (AT), sólidos solubles totales (SST), grosor de pericarpio, humedad (%), color extractable (ASTA), fenoles totales, vitamina C, macro y micro elementos durante la etapa de cosecha.

V. METODOLOGÍA

5.1. Sitio experimental

El presente trabajo se realizó en invernaderos del rancho “San Isidro” el cual se dedica a la producción de pimiento y se encuentra ubicado en el municipio de Tecozautla en el estado de Hidalgo, ubicado al norte 21°24', al sur 19°36' de latitud norte; al este 97°58', al oeste 99°53' a una altura de 1700 msnm.

5.2. Material biológico

5.2.1 Pimiento

El pimiento que se utilizó en este trabajo es del cultivar “cannon”, de la empresa Zeraim Gedera® el cual presenta un fruto definido tipo “bloque”, color rojo y con pesos promedio de 250-350 gr.

5.2.2. Cepas bacterianas

La cepa de *Bacillus* sp, la cual ha sido caracterizada como promotora del crecimiento vegetal, al reportar diversas propiedades bioquímicas como actividad ACC deaminasa, fijación biológica de nitrógeno (FBN), producción de ácido indolacético AIA y solubilización de fosfatos (Luna-Martínez y col., 2013). El biofertilizante de la marca comercial Rhizobac Combi® y su constitución se presenta en la tabla 5.1.

5.3. Desarrollo del experimento

5.3.1. Preparación de las cepas bacterianas para inoculación

La cepa de *Bacillus* sp se cultivó en caldo nutritivo, posteriormente se puso en agitación constante a 180 rpm por 16 h a 30 °C, después los cultivos fueron centrifugados a 3400 rpm por 15 min para obtener las pastillas celulares. La concentración celular fue ajustada a 10^7 UFC/mL (Luna-Martínez y col., 2013).

Para el biofertilizante comercial Rhizobac Combi® se preparó de acuerdo a las indicaciones que presenta en la etiqueta donde se obtiene una densidad final del orden de 1×10^7 UFC/mL. Este biofertilizante contiene varias cepas de *Bacillus* (*subtilis*, *B. megatherium* y *B. Cereus var. mycoides*) y una cepa de *pseudomonas*

(*Pseudomonas fluorescens*), también caracterizadas bioquímicamente como promotoras del crecimiento vegetal.

Tabla 5.1 Ficha técnica del biofertilizante comercial Rhizobac combi®

Características	
Físicas	
Olor	Característico
Forma	Polvo
Color	Café
Inflamable	No
Corrosividad	No se considera corrosivo
Químicas	
pH	5.5-6.0 (10 g en 100 mL agua)
Densidad relativa	Aparente 0.3-0.5 g/cm ³
Solubilidad en agua	400 g/L
Incompatibilidad	No mezclar con agentes oxidantes fuertes
Generales	
Almacenamiento	No exponer a temperaturas mayores a 40°C
Especificaciones	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ; <i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> ; <i>B. megaterium</i> y <i>B. subtilis</i> .	1 x 10 ⁹ UFC/g
Carbono Orgánico Oxidable Total	21.0 % p/p

5.3.2. Inoculación de las semillas y plántulas con cepas bacterianas

Se utilizaron semillas de pimiento por cada tratamiento (siendo los tratamientos la cepa de *Bacillus* sp, el biofertilizante comercial Rhizobac combi® y un tercer tratamiento como testigo) y se inocularon con las suspensiones celulares; se empleó un testigo sin inocular (Luna-Martínez y col., 2013).

Se realizaron 5 inoculaciones en la base de la altura del tallo con las suspensiones celulares, cada 4 semanas (Figura 5.1). Una vez obtenida la plántula fue trasplantada a suelo y se realizaron prácticas culturales evaluando en cada ciclo de cosecha las variables relacionadas con la producción y calidad del pimiento.

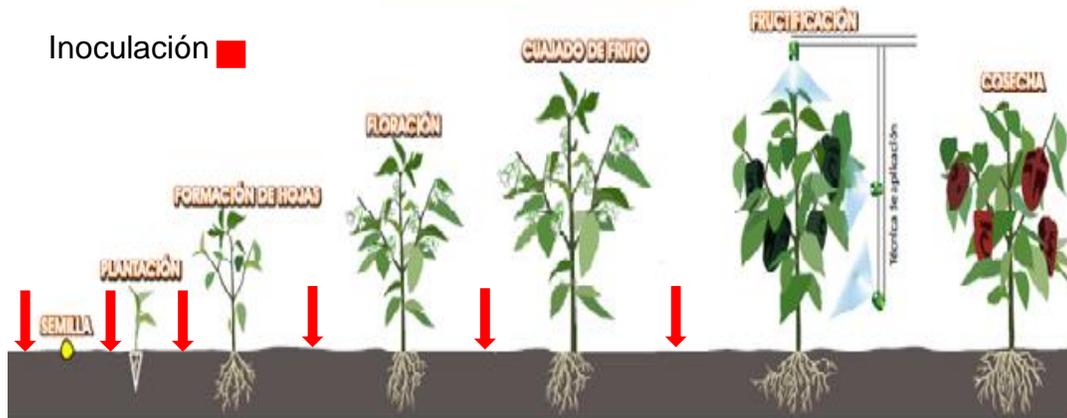


Figura 5.1. Inoculación en semilla y plántula con cepas bacterianas.

5.3.3. Seguimiento de maduración y cosecha

5.3.3.1. Etapas de cosecha

Se realizaron tres periodos de cosechas (13 de Agosto, 4 de octubre y 15 de Noviembre del año 2012) de acuerdo con la cinética de producción del cultivo (Figura 5.2).

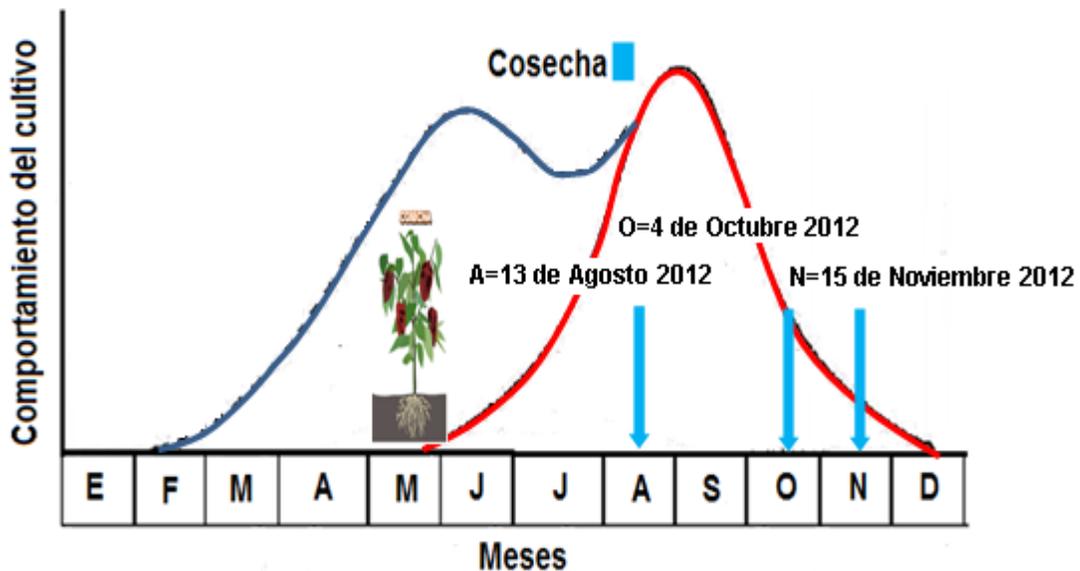


Figura 5.2. Periodo de cosechas en el cultivo de pimiento.

Una vez comenzada la fecha de fructificación (después de 60 días de haberse realizado el primer corte de cosecha), para la selección del fruto cosechado se consideró que tuviera el 80 % de madurez (condición en la etapa de la cosecha y madurez del fruto para mantener su calidad óptima) así como uniformidad en el tamaño, forma y color, libres de daños mecánicos, plagas y enfermedades, posteriormente se evaluaron las variables de calidad y producción (Figura 5.3).

5.4. Variables evaluadas

5.4.1. Agronómicas

Se determinó la producción a través del rendimiento, registrando el número de frutos/planta, peso promedio del fruto (g) y g/m^2 (Abu-Zahra, 2012). Cabe mencionar que el cultivar cannon genera frutos de pimiento color rojo tipo bloque.

Los resultados se compararon con el testigo (sin inocular), esto se realizó sobre 40 plantas por tratamiento, seleccionadas completamente al azar.



Figura 5.3. Frutos para determinación de variables de calidad por cada tratamiento: a) Rhizobac combi®, b) *Bacillus* sp., c) Control.

5.4.2. Calidad del fruto

5.4.2.1. Color

Se determinaron las coordenadas de color “L”, “a” y “b” con ayuda de un colorímetro HunterLab con iluminante A, en 3 puntos equidistantes del fruto entre el cáliz y el pedúnculo (zona ecuatorial). Se utilizaron cinco frutos por cada tratamiento y se reportaron el promedio de las lecturas (Hernández-Fuentes y col., 2010). La coordenada “L” representa la diferencia ente la luminosidad (“L”=100) y la oscuridad (“L”=0), “a” representa la diferencia entre el verde (“-a”) y el rojo (“+a”), y “b” representa la diferencia entre el amarillo (“+b”) y el azul (“-b”) (Francis, 1980) (Figura 5.4).

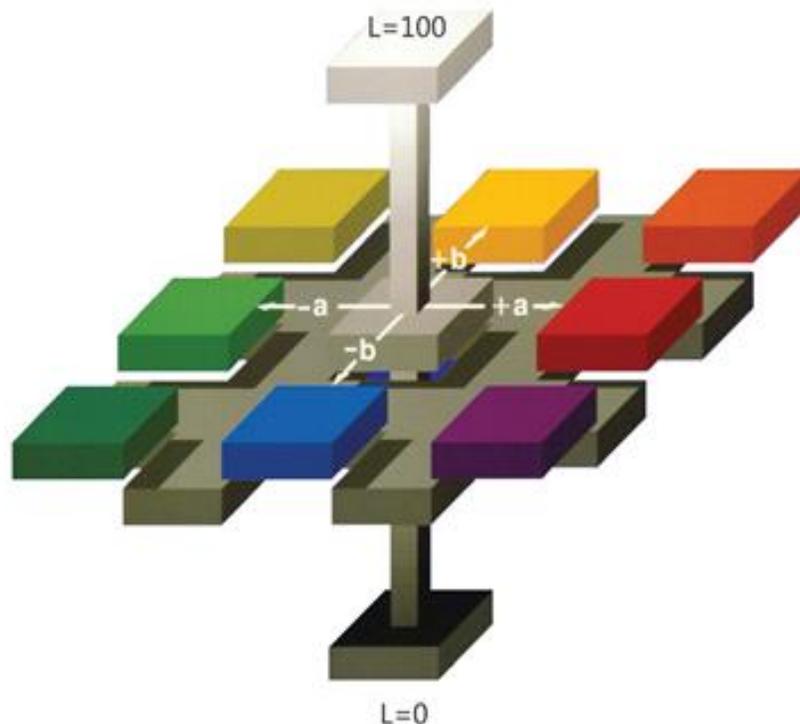


Figura 5.4. Escala Hunter Lab para la determinación de los parámetros de color “L”, “a” y “b”.

5.4.2.2 Medición del grosor de la pared del fruto (pericarpio)

El grosor de la pared (mm) se determinó con un vernier digital, para lo cual fue necesario cortar el pimiento en forma ecuatorial, se seleccionó una mitad del

pimiento y se tomó la medida del grosor en la parte interna cercana a los lóculos de cada pimiento (Figura 5.5), esto se realizó para 5 frutos (Urrestarazu y col., 2002).



Figura 5.5. Medición del grosor de la pared del fruto de pimiento (pericarpio).

5.4.2.3. Determinación del porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad se determinó con el método descrito por la AOAC. Donde se pesaron 10 g de muestra y se colocaron en charolas de aluminio (previamente puestas en peso constate) a una temperatura de 105 °C dentro de una estufa a durante 4 horas. El porcentaje de humedad se determinó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(P - P1)}{P2} \times 100$$

Dónde:

P = peso del recipiente con muestra húmeda (g).

P1 = peso del recipiente con muestra seca (g).

P2 = peso de la muestra (g).

5.4.2.4. Determinación de acidez total titulable

La acidez titulable se determinó de la siguiente forma: se pesaron 10 g de muestra fresca y se homogenizaron posteriormente. Se tomó una alícuota de 5 mL y se agregaron 45 mL de agua destilada, se agitó durante 5 minutos. A continuación se realizó una titulación con hidróxido de sodio 0.1 N hasta alcanzar un pH de 8.2. Los resultados se expresaran (% de ácido cítrico/100 g de fruto fresco) se realizaron para cinco frutos y por triplicado (AOAC, 1994). El porcentaje de ácido cítrico se determinó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Ácido cítrico} = \frac{(\text{Vol de NaOH}) \times N(\text{NaOH}) \times (\text{Factor de meq de ácido cítrico})}{\text{mL de muestra}} \times 100$$

Dónde:

Vol de NaOH = cantidad de mL de NaOH gastados en la titulación.

N = Normalidad de NaOH empleada.

Factor de meq. = 0.064 (ácido cítrico).

mL de muestra = cantidad de muestra empleada en mL.

5.4.2.5. Determinación de pH

Para la determinación del pH se utilizó un potenciómetro calibrado previamente con soluciones amortiguadoras de pH 7.0 y 4.0. Se pesaron 10 g de muestra fresca homogenizada y se añadieron 100 mL de agua destilada, se realizó una agitación mecánica para homogenizar la mezcla posteriormente se filtró y se realizó la lectura de pH, el procedimiento se realizó para cinco frutos y por triplicado (AOAC, 1994).

5.4.2.6. Sólidos Solubles Totales (SST)

El contenido de SST del fruto del pimiento se determinó mediante el uso de un refractómetro digital marca ATAGO, donde la lectura se realizó en forma directa como se describe en el método de la AOAC, (1994).

5.4.2.7. Color extractable mediante índice ASTA

El color extractable se determinó siguiendo la metodología propuesta por la Asociación Americana de Comercio de Especias (ASTA, 1995) con algunas modificaciones, el cual está basado en una técnica espectrofotométrica del color a 460 nm en un extracto de acetona. Se pesaron 0,01 g de muestra y se colocaron en un matraz aforado de 10 mL posteriormente se agregaron 5 mL acetona y se dejó en agitación a 180 rpm durante 16 horas a una temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se terminó de colocar el volumen faltante de acetona para terminar de aforar. Posteriormente se tomó una alícuota y se midió la absorbancia utilizando un espectrofotómetro (Vega-Gálvez y col., 2008). El valor de color ASTA se calculó mediante la ecuación 3:

$$colorASTA = \frac{(A)(16.4)(I_f)}{W_{reh}}$$

Dónde:

A= absorbancia del extracto de acetona 460 nm.

I_f= factor de corrección (a partir de una solución patrón de (K₂Cr₂O₇)).

W_{reh}= peso de la muestra (g).

5.4.2.8. Determinación de macro y microelementos

La determinación de macro y microelementos se realizó en 50 gr de tejido vegetal del fruto de pimiento. La muestra se colocó en una estufa a 105 °C durante 24 horas, posteriormente se molió, hasta tener un tamaño de partícula de malla 60. Después se realizó una digestión húmeda del material seco con una mezcla de ácidos perclórico y nítrico como lo describe Alcántar y Sandoval (1999). En los extractos obtenidos se realizó la determinación de la concentración de micro y macroelementos usando un equipo de espectroscopia absorción atómica (AA).

5.4.2.9. Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó por espectrofotometría mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Se pesaron 10 gr de muestra, se colocaron en un tubo eppendorf de 50 mL y se agregaron 25 mL de metanol, posteriormente se homogenizó en vortex por 5 minutos y después se centrifugó a 3400 rpm por 15 minutos. El extracto se filtró y se colocó en un matraz aforado de 100 mL donde se completó con metanol hasta el aforo.

En un tubo de ensaye se colocaron 200 μ L del extracto metanólico y se agregaron 800 μ L de agua más 2.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu al 10 % y se dejó reaccionar durante 6 minutos posteriormente se agregaron 2 mL de la solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7.5 % y se dejó reposar por 90 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 765 nm en un espectrofotómetro UV-visible. La determinación se realizó por triplicado y el contenido de fenoles totales se expresaron como mg GAE/100 gr en peso fresca. Para determinar las concentraciones de fenoles totales se elaboró una curva patrón de ácido gálico.

5.4.2.10. Determinación de ácido ascórbico por HPLC

Para la determinación de ácido ascórbico se pesaron 10 g de muestra, se cortaron en trozos pequeños y se homogeneizaron con 10 ml de ácido metafosfórico al 3 %, se realizaron dos extracciones adicionales con 10 mL del ácido metafosfórico, posteriormente se mezcló con vortex durante 5 minutos y se centrifugó por 20 minutos a 3400 rpm. El extracto obtenido se filtró con gasa y se colectó el sobrenadante en un matraz aforado de 100 mL completando el aforo con ácido metafosfórico que se utilizó para las extracciones, se tomaron 5 mL y se llevó a un volumen de 50 mL. Se tomaron alícuotas para la cuantificación de ácido ascórbico por HPLC. Cada alícuota con el extracto de ácido ascórbico se filtró mediante una membrana de 0,22 μ m antes de la inyección en la columna cromatográfica. Para el análisis se utilizó un equipo de HPLC equipado con una columna Zorbax SB-C18 (4.6 X 250 mm) con un tamaño de partícula de 5 μ m. La fase móvil consistió en agua destilada acidificada (0,1% de ácido fosfórico)

(disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) (en la relación de 97:3 v/v), el flujo fue de 0.8 ml/min. El L-ácido ascórbico se detectó a 254 nm mediante UV-Visible y se confirmó con un estándar de ácido ascórbico (Zhang y Hamauzu, 2003).

5.5 Análisis estadísticos

El diseño experimental fue completamente aleatorio y consistió de tres tratamientos y cada fecha de corte representa una réplica. Los tratamientos correspondieron a la inoculación de la cepa *Bacillus sp.* y el producto comercial Rhizobac Combi®, más un testigo sin inocular. Para la variable respuesta de rendimiento (variables agronómicas) la unidad experimental estuvo constituida por 200 plantas, de las cuales 40 constituyeron la parcela útil. Con respecto a cada variable respuesta relacionada con la calidad del fruto se evaluó sobre cinco frutos y por triplicado. Los datos obtenidos fueron sujetos a análisis de varianza y prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) mediante el programa jmp.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación de las variables agrónomicas

En la tabla 6.1 se muestra el número de frutos por planta obtenido para los tratamientos. La aplicación de Rhizobac Combi® y *Bacillus* sp., muestran los valores superiores durante las tres fechas de corte, cabe resaltar que los frutos que se obtuvieron fueron en la condición del 80 % de madurez, la cual coincide con su comercialización. En lo que se refiere al rendimiento se puede observar nuevamente una diferencia significativa entre los tratamientos, específicamente con Rhizobac Combi que mostró los valores superiores en las tres fechas de corte en comparación con el testigo. De la misma manera se tienen valores positivos para el tratamiento con *Bacillus* sp.. En cuanto a lo que se refiere al peso promedio de frutos (g), se puede observar un efecto positivo con el tratamiento *Bacillus* sp. con respecto al testigo, en el primer corte (13 de agosto). Sin embargo para los dos fechas de corte, 4 de octubre y 15 de noviembre solo se observa una diferencia significativa del testigo con el tratamiento de Rhizobac Combi. En todos los casos el testigo (sin inocular) presenta los valores más bajos en el pesos promedio de fruto (g).

Las variaciones en cada fecha de corte aunque no es constante puede deberse a las diferentes etapas en las que el cultivo presenta durante su crecimiento y desarrollo. La actividad fotosintética es un proceso fisiológico vital de las plantas que está estrechamente relacionado con la producción agronómica (Sánchez-Chávez y col., 2011), así como que existen situaciones de estrés que pueden provocar el aborto de flores y frutos en el cultivo del pimiento, como cambios de luz, temperatura, déficit de presión de vapor o competencia por asimilados y relaciones de dominancia entre frutos debido a efectos hormonales; estos factores no necesariamente actúan por separado sino que pueden actuar conjuntamente y en poco tiempo provocar la disminución en el número de frutos (Reséndiz-Melgar y col., 2010).

Tabla 6.1. Efecto de los Inoculantes microbianos sobre las variables de producción en pimiento

Fecha de corte/ Tratamiento	Frutos/Planta	Rendimiento (g de fruto/m ²)	Peso promedio de fruto (g)
13 de Agosto 2012			
<i>Bacillus sp.</i>	1.40 a ¹	422.90 b	252.67 a
Rhizobac Combi	1.42 a	573.00 a	237.15 b
Testigo	0.95 b	237.15 c	228.75 b
4 de Octubre 2012			
<i>Bacillus sp.</i>	1.27 a	338.53 b	235.55 ab
Rhizobac Combi	1.20 a	433.50 a	243.02 a
Testigo	0.75 a	276.70 c	219.60 b
15 de Noviembre 2012			
<i>Bacillus sp.</i>	1.64 b	365.01 b	239.69 b
Rhizobac Combi	2.03 a	413.64 a	251.78 a
Testigo	0.92 c	251.78 c	224.30 b

¹Medias (n=5) con letras iguales dentro de cada columna y para cada fecha de corte no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

6.2 Evaluación de las variables de calidad en el fruto

6.2.1. Color

Los resultados obtenidos para las variables de calidad en el fruto de pimiento se presentan en la tabla 6.2, donde se observa que no existe una diferencia significativa para las coordenadas de color “L”, “a”, “b” en cada una de las fechas de los cortes que se realizaron para los tratamientos con respecto al testigo (sin inocular). Aunque los valores de la coordenada “a” determina los colores rojos en la escala HunterLab presenta una disminución su valor durante el segundo corte, presentando así pimientos menos rojos y por consiguiente esto puede afectar la calidad visual del mismo. En cuanto a los sólidos solubles totales (Brix) no existe diferencia significativa dentro de los tratamientos, sin embargo en el segundo corte perteneciente al 4 de octubre del 2012 se observa que los valores disminuyen, ya para los últimos cortes estos tienden a aumentar, debido también al desarrollo de la planta los cuales generalmente no son constantes. Además de que el color representativo en el pericarpio es consecuencia de los pigmentos como carotenoides que se desarrollan en cloroplasto y cromoplastos, así como los pigmentos obtenidos por compuestos fenólicos como antocianinas, flavonoles y proantocianinas en la vacuola. La expresión de los pigmentos está influenciados por factores físicos tal como la cera de la cutícula, pelos epidérmicos, así como la forma y orientación de las células en la epidermis y sub-epidermis. Los pigmentos y la topografía superficial del fruto, absorben y refractan selectivamente la luz visible incidente, para producir un espectro característico del fruto en particular o la piel la hortaliza (Lancaster y col., 1997).

Los procesos bioquímicos de cada fruto, son un factor importante que deben tomarse en cuenta, pues es donde el cambio de un fruto de color verde por efecto de la clorofila, el valor del parámetro “b” puede ir cambiando por efectos de que los carotenoides pueden estar enmascarando la clorofila. Estudios relacionados con el uso de los parámetros “L”, “a”, “b”, han tratado de correlacionar el valor del color con respecto a la concentración del pigmento, sin embargo no todos los trabajos presentan una correlación directa entre el valor de estos parámetros con respecto a la concentración del pigmento (Knee, 1980).

Tabla 6.2. Efecto de los Inoculantes microbianos sobre parámetros de color “L”, “a” y “b” en pimiento

Fecha de corte	Tratamiento	Color		
		L*	a*	b*
13 de Agosto 2012	<i>Bacillus sp.</i>	24.47 a ¹	29.62 a	23.75 a
	Rhizobac Combi	22.60 b	31.34 a	23.78 a
	Testigo	23.24 ab	31.19 a	24.45 b
4 de Octubre 2012	<i>Bacillus sp.</i>	22.96 a	23.34 a	18.47 ab
	Rhizobac Combi	25.26 a	26.12 a	18.12 b
	Testigo	24.58 a	25.44 a	21.34 a
15 de Noviembre 2012	<i>Bacillus sp.</i>	24.47 a	29.62 a	23.75 a
	Rhizobac Combi	22.60 b	31.34 a	23.78 a
	Testigo	23.24 ab	31.19 a	24.45 a

¹Medias (n=5) con letras iguales dentro de cada columna y para cada fecha de corte no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

6.2.2. pH, acidez titulable (AT) y sólidos solubles totales (SST)

En cuanto a los sólidos solubles totales (Brix) se puede observar en la tabla 6.3 que de igual manera no existe diferencia significativa dentro de los tratamientos, sin embargo en el segundo corte perteneciente al 4 de octubre del 2012 se observa que los valores disminuye y se mantienen constantes, ya para el último corte estos vuelve a aumentar, posiblemente esto sea debido al comportamiento de la producción y del momento del desarrollo de la planta.

Por otro lado se puede observar que el pH se comporta de acuerdo a la variación de la acidez titulable, ya que aumenta cuando la acidez desciende y viceversa, lo cual ha sido reportado para algunos frutos y en general este comportamiento se observó en los frutos de pimiento morrón, específicamente para este estudio los valores no presentan una diferencia significativa entre los tratamientos. La disminución o aumento en pH de los frutos, se atribuye al menor o mayor contenido de ácidos orgánicos presentes en forma ionizada en el tejido vegetal (Hernández-Fuentes y col., 2010).

6.2.3. Grosor de pericarpio y humedad (%)

Los valores referentes al grosor del pericarpio (mm) se muestra en la tabla 6.4 y se puede observar una diferencia significativa entre los tratamientos y el testigo (sin inocular), principalmente con Rhizobac Combi, el cual en todas las fechas de corte mantiene los valores con un mayor calibre en el pericarpio del pimiento, por lo que esto puede contribuir a tener frutos con un mayor peso, incrementando el rendimiento en cada cosecha. De igual manera los frutos obtenidos con los inoculantes de *Bacillus* sp. mostraron este mismo efecto.

La variable de humedad (%) que se muestra en la tabla 6.4 se observa que los tratamientos mantienen un ligero aumento en esta variable con respecto al testigo (sin inocular), por lo que el fruto presenta un mayor contenido de agua dentro de sus tejidos lo cual puede proporcionar una mayor frescura traduciéndose en productos de mayor calidad visual. En relación con el desarrollo de la raíz, el éxito en el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, depende de sus

Tabla 6.3. Efecto de los Inoculantes microbianos sobre las variables de calidad pimiento

Fecha de corte	Tratamiento	SST (Brix)	pH	AT (%)
13 de Agosto 2012	<i>Bacillus sp.</i>	6.03 a ¹	4.72 b	2.38 a
	Rhizobac Combi	7.02 b	4.82 a	2.29 b
	Testigo	7.05 b	4.82 a	2.22 b
4 de Octubre 2012	<i>Bacillus sp.</i>	6.63 a	4.97 b	1.57 a
	Rhizobac Combi	6.75 a	5.1 ab	1.45 a
	Testigo	6.87 a	5.06 a	1.45 a
15 de Noviembre 2012	<i>Bacillus sp.</i>	7.01 a	4.81 b	2.25 a
	Rhizobac Combi	6.68 b	4.86 a	2.07 b
	Testigo	6.43 b	4.81 b	1.95 b

¹Medias (n=5) con letras iguales dentro de cada columna y para cada fecha de corte no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).
SST= Sólidos solubles totales; AT= Acidez titulable

establecimiento y persistencia a lo largo de la estación de crecimiento de la misma raíz, pues al obtener un buen desarrollo el sistema radical, existe un mejor flujo de compuestos orgánicos producto de la fotosíntesis (Barea y col., 2005), Patten y Glick (2002) reportan que las concentraciones bajas de AIA producido por bacterias pueden estimular la elongación de la raíz, mientras que los altos niveles de AIA estimulan la formación de raíces laterales y adventicias, además de que muchos aspectos importantes de las interacciones suelo-planta son mediados por los procesos de la rizosfera, incluyendo la adquisición de nutrimentos para la planta, la colonización de raíces por los microorganismos y la descomposición de la materia orgánica (Cheng, 1999) así como el suministro de agua a la planta y que posiblemente se reduce el estrés por sequía.

6.2.4 Color extractable (ASTA), fenoles totales y ácido ascórbico

En la tabla 6.5 se muestra los resultados obtenidos para los metabolitos que se determinaron en el fruto de pimiento. El color extractable en unidades ASTA proporciona información de la presencia cualitativa de componentes que producen coloración (Méndez-Trujillo y col., 2005)., se observan un efecto positivo de los tratamientos, principalmente de Rhizobac combi® con respecto al testigo (sin inocular) con valores superiores durante los tres fechas de corte que se realizaron, de la misma forma se puede observar para el tratamiento con *Bacillus* sp que las diferencias con el testigo fueron a partir de la segunda fecha de corte.

Resultados similares son reportados por Gómez-Ladrón de Guevara y col., 1996; Gómez y col., 1997; Krajayklang y col., 2000, al determinar unidades en ASTA en pimiento para la producción de la especia paprika.

El valor del color en unidades ASTA se debe principalmente a la alta concentración de pigmentos que se encuentran en el pimiento rojo, como lo son carotenos (β -Caroteno, α -Caroteno) y xantofilas (capsantina, capsorrubina, zeaxantina y violaxantina) (Vega-Gálvez y col., 2008). Algunos de ellos con una actividad como provitamina A (β -Caroteno, α -Caroteno, β -Criptoxantina), y algunos actúan como antioxidantes. El carotenoide predominante en el pimiento es la capsantina, exclusivo para las especies de *Capsicum* (Vracar y col., 2007).

Tabla 6.4. Efecto de los Inoculantes microbianos sobre grosor de pared (mm) y humedad (%) en pimiento

Fecha de corte	Tratamiento	Grosor Pared (mm)	Humedad (%)
13 de Agosto 2012	<i>Bacillus sp.</i>	8.81 a ¹	93.18 a
	Rhizobac Combi	8.09 b	93.32 a
	Testigo	7.64 b	91.38 b
4 de Octubre 2012	<i>Bacillus sp.</i>	7.52 b	93.53 a
	Rhizobac Combi	8.27 a	93.52 a
	Testigo	6.79 c	91.94 b
15 de Noviembre 2012	<i>Bacillus sp.</i>	9.03 b	91.87 a
	Rhizobac Combi	9.53 a	91.93 a
	Testigo	7.98 c	92.66 a

¹Medias (n=5) con letras iguales dentro de cada columna y para cada fecha de corte no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05)

Además también se puede observar una disminución de los valores de unidades ASTA que se presentan en la tercer fecha de corte puede deberse a una continua degradación de los carotenoides amarillos y rojos debido a su oxidación por el oxígeno libre. Al mismo tiempo, este oxígeno se ve influido por factores externos principalmente como son temperatura, humedad, luz o de naturaleza química como la presencia de iones metálicos, enzimas, peróxidos. De igual forma otro de las posibles motivos de esta inconsistencia de los valores de las unidades ASTA entre cada fecha de corte puede ser debido a los diferentes etapas de madurez en las que se encuentra el fruto en la planta durante la temporada de cultivo. En este sentido así como por los diferentes tratamientos pre y post-cosecha también puede aumentar el número de frutos rojos maduros, induciendo la maduración del mismo (Krajayklang y col., 2000). Sin embargo, Yodpetch (1997), indicó que el color extractable en chile cayenne (*Capsicum annum* L.) puede verse afectado por la cantidad de fertilizante empleado (15-15-15 Kg-ha⁻¹) en la cual el fósforo (P) y el potasio (K) han tenido influencia positiva sobre la producción de oleorresina, mientras que el nitrógeno tenía una influencia opuesta, Márkus y col., (1999) también resaltan la importancia de las diferentes etapas de maduración del fruto, la concentración de carotenoides y compuestos antioxidantes influenciados por las condiciones climáticas en las que se realiza la temporada de producción. Estos autores reportan que en uno de sus experimentos obtuvieron frutos con mayor contenido de β -caroteno en condiciones con clima frio, pero menos di-ésteres de xantofilas en comparación de con los obtenidos en una temporada con clima seco y cálido.

La tabla 6.5 también muestra una diferencia significativa entre los tratamientos específicamente en la primera fecha el inoculante comercial Rhizobac combi[®] presenta los valores con las mayores concentraciones de fenoles totales (mg AGE/100 g peso fresco) con respecto al testigo (sin inocular), en cambio se observa para las dos siguientes fechas de corte (4 de octubre y 15 de noviembre) es el tratamiento de *Bacillus sp.*, el cual muestra los valores superiores en la concentración de fenoles totales en comparación con el inoculante comercial Rhizobac combi[®] y el testigo. Resultados similares son reportados por

Ghasemnezhad y col. (2011) y también por Ruangviriyachai y col. (2012). Estos autores señalan que de acuerdo a lo reportado que el contenido de fenoles totales son debido al estado de maduración del pimiento (Howard y col., 2000), así como por el cultivar (Gnayfeed y col., 2001). Se ha reportado una fuerte relación del contenido de fenoles totales y actividad antioxidante en frutas y hortalizas frescas (Barbagallo y col., 2012). Sin embargo, también el contenido de fenoles totales forman parte de un sistema de señales que son activadas por las diferentes condiciones de estrés a las que la planta ha sido expuesta, como los son ataque de patógenos, irradiación UV, lesiones, deficiencias de nutrientes, la temperatura y el tratamiento herbicida a menudo aumentan la acumulación de estos metabolitos (Solecka, 1997). Dixon y Paiva (1995), también mencionan los diferentes tipos de compuestos fenólicos que son inducidos en las plantas por diversos tipos de estrés bióticos y abióticos, donde uno de ellos es el estrés nutricional ocasionado por deficiencia de fósforo. Otro tipo de estrés nutricional que provocan el aumento de las concentraciones de fenilpropanoides en las raíces así como en los exudados de raíz es la baja concentración de nitrógeno, con lo que se tendrá la generación de flavonoides e isoflavonoides, importantes quimio-atrayentes por ejemplo para bacterias fijadoras de nitrógeno (Wojtaszek y col., 1993).

Los bajos niveles de hierro pueden causar aumento de la liberación de los ácidos fenólicos para ayudar a solubilizar los nutrientes como el fósforo y hierro para facilitar su absorción. Graham (1990), en un estudio sobre distribución flavonoides y isoflavonoides en tejidos de plántulas de soya, semillas y exudados de las raíces, menciona el potencial de los flavonoides e isoflavonoides en la quimioatracción de *Bradyrhizobium japonicum* que infecta las raíces de la planta (pelos radicales emergentes) así como en la inducción de genes para la formación de nódulos en la raíz.

Con respecto al ácido ascórbico (Tabla 6.5), también se observa que existe un efecto positivo en la concentración de ácido ascórbico (mg de A.A./100 g MF) obtenida por la aplicación de los tratamientos, donde para la fecha de corte del 4 de octubre el tratamiento de *Bacillus sp.* muestra una concentración superior al inoculante comercial Rhizobac combi® y al testigo. Sin embargo para la fecha de

corte del 15 de noviembre es el inoculante comercial es el que presenta una concentración de 257.68 mg de A.A./100 g m.f., en comparación con 80.16 mg de A.A./100 g m.f del testigo, el tratamiento con *Bacillus sp.* también se mostró superior a este. Se ha reportado que en la fase de maduración se puede inducir el contenido de ácido ascórbico hasta 30% en el pimiento rojo en comparación con un pimiento verde (Ghasemnezhad, 2011). Matsufuji y col. (2007) y Deepa y col. (2006) reportan valores inferiores en comparación con los obtenidos en este trabajo. También Deepa y col. (2006) concluyen que la concentración de ácido ascórbico depende de factores como el cultivar, condiciones climáticas así como condiciones de pre y post-cosecha que pueden afectar la composición química de los alimentos vegetales. Es también conocido que el ácido ascórbico funciona como un quelante de iones de metales pesados, reacciona con el oxígeno y otros radicales libres suprimiendo la peroxidación (Navarro y col., 2006).

También como ya se mencionó, la producción de algunos metabolitos secundarios en las plantas es provocada por algún tipo de estrés a las cuales son sometidas las plantas, la producción de ácido ascórbico no es la excepción.

Se ha demostrado que al encontrarse en un estrés por contaminantes (metales pesados, ozono, dióxido de azufre) y por ambientes extremos (radiación UV-B), donde actúan al menos en parte al causar daño oxidativo, la presencia del ascorbato y el ciclo ascorbato-glutati6n se encuentran presentes en el metabolismo de la planta como parte de la defensa contra estos daños (Smirnoff, 1996). Por ejemplo Schützendbübel y Polle (2001), al analizar la respuesta de las plantas expuestas al estrés abiótico (estrés oxidativo) inducido por metales pesados como el cadmio (Cd) y en presencia de micorrizas, concluyen que a pesar de los cambios en las condiciones de la rizosfera los cuales fueron percibidos por la raíz, la respuesta al estrés fue estabilizada por la generaci6n de compuestos fen6licos. Actualmente se ha prestado una atenci6n considerable a los microorganismos de la rizosfera que pueden activar la resistencia sist6mica inducida (RIS) en las plantas y se ha observado una capacidad de defensa contra pat6genos manteniendo a la planta en un estado saludable y por consiguiente cultivos sanos (Patel y Saraf, 2013).

Tabla 6.5. Efecto de los Inoculantes microbianos sobre color extractable (ASTA), fenoles totales y ácido ascórbico en pimiento

Fecha de corte	Tratamiento	Color Extractable (ASTA)	Fenoles Totales (mg AGE/ 100 g m.f. ²)	Ácido Ascórbico (mg de A.A./ 100 g m.f. ²)
13 de Agosto 2012				
	<i>Bacillus sp.</i>	46.86 b ¹	93.81 b	----
	Rhizobac Combi	69.92 a	109.43 a	----
	Testigo	51.39 b	88.503 c	----
4 de Octubre 2012				
	<i>Bacillus sp.</i>	35.3 b	150.11 a	175.94 a
	Rhizobac Combi	45.98 a	134.18 b	155.08 b
	Testigo	27.21 c	109.86 c	136.57 b
15 de Noviembre 2012				
	<i>Bacillus sp.</i>	39.63 a	105.11 a	135.17 a
	Rhizobac Combi	31.49 b	98.49 b	257.68 b
	Testigo	25.64 c	91.98 c	80.16 c

¹Medias (n=5) con letras iguales dentro de cada columna y para cada fecha de corte no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

6.2.5. Determinación de macronutrientes

En lo que respecta a los macronutrientes que se presentan en la tabla 6.6 se observa que para la fecha de corte de 4 de octubre no existen diferencias significativas entre los tratamientos *Bacillus sp.* y Rhizobac combi® con respecto al testigo. Mientras que para la segunda fecha que corresponden al 15 de noviembre existe un efecto positivo en las concentraciones de potasio (K), principalmente con el tratamiento de *Bacillus sp.*, con respecto al testigo. Sin embargo también se puede observar que existe un aumento en la concentración de nitrógeno total (NT) fósforo (P) y potasio (K), entre las dos fechas de corte, específicamente con Rhizobac Combi®.

6.2.6. Determinación de micronutrientes

Los micronutrientes que se muestran en la tabla 6.7 se tiene diferencia significativa en el tratamiento con Rhizobac combi en los elementos de hierro (Fe) y de boro (B), esto para la fecha de corte de 4 de octubre. Mientras que para la fecha de corte del 15 de noviembre solamente se tiene un efecto positivo para el elemento cobre (Cu) para el inoculante comercial Rhizobac Combi®.

La capacidad de las plantas para responder adecuadamente a la disponibilidad de nutrientes es fundamental para su adaptación al medio ambiente.

Nutrientes tales como nitrato, fosfato, sulfato y hierro actúan como señales que pueden ser percibidas. Los procesos de desarrollo importante, tales como la formación de raíces de pelo, crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales, son particularmente sensibles a los cambios en la concentración interna y externa de nutrientes (Marschner y col., 1987).

Los nutrientes del suelo son elementos críticos para el crecimiento de las plantas y la productividad. La biodisponibilidad de los nutrientes en la solución del suelo puede determinar el crecimiento de la raíz, la proliferación de la raíz y las respuestas funcionales específicas que dependen del estado de los nutrientes que prevalece de la planta. Nitrógeno (N), fósforo (P), hierro (Fe) y azufre (S) se encuentran entre los nutrientes que han sido reportados para alterar los procesos de desarrollo de raíz post-embrionarias.

Tabla 6.6. Efecto de los Inoculantes microbianos sobre el contenido de macronutrientes en el pericarpio de pimiento

Fecha de corte	Tratamiento	Nitrógeno Total*	Fósforo*	Potasio*	Calcio*	Magnesio*	Azufre*
4 de Octubre 2012	<i>Bacillus sp.</i>	87.71 a ¹	20.04 b	118.09 b	9.05 b	9.70 b	13.15 a
	Rhizobac Combi	93.63 a	19.63 b	130.73 ab	11.01 b	10.14 ab	10.79 b
	Testigo	95.36 a	21.49 a	152.58 a	14.51 a	12.63 a	11.01 b
15 de Noviembre 2012	<i>Bacillus sp.</i>	119.24 a	26.56 a	171.81 a	9.48 b	11.92 a	13.82 a
	Rhizobac Combi	117.28 ab	24.21 a	163.55 a	11.3 ab	12.37 a	12.64 a
	Testigo	106.85 b	23.96 a	148.41 b	12.23 a	12.71 a	11.98 a

¹Medias (n=5) con letras iguales dentro de cada columna y para cada fecha de corte no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

*mg / 100 g de muestra seca

Tabla 6.7. Efecto de los Inoculantes microbianos sobre el contenido de microelementos en el pericarpio de pimiento

Fecha de corte	Tratamiento	Hierro*	Zinc*	Manganeso*	Cobre*	Boro*
4 de Octubre 2012	<i>Bacillus sp.</i>	74.77 a ¹	15.90 b	13.50 a	6.51 a	5.70 b
	Rhizobac Combi	75.50 a	19.17 a	13.47 a	6.07 a	10.20 a
	Testigo	70.47 b	14.02 b	12.36 a	6.85 a	7.07 ab
15 de Noviembre 2012	<i>Bacillus sp.</i>	69.00 a	13.00 a	10.43 a	5.20 a	6.41 a
	Rhizobac Combi	59.53 a	11.97 a	12.03 b	3.50 b	5.82 a
	Testigo	66.10 a	12.07 a	12.33 b	4.31 a	5.58 a

¹Medias (n=5) con letras iguales dentro de cada columna y para cada fecha de corte no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

*mg / 100 g de muestra seca

La disponibilidad de nutrientes en la rizosfera depende de muchos aspectos relacionados con el suelo (López-Bucio y col., 2003). Los factores de gran importancia para nutrición mineral de las plantas dependen de los cambios inducidos por la raíz., específicamente en el la zona de la rizosfera. Los cambios inducidos por la raíz son el pH de la rizosfera, el potencial redox y cantidad y composición de exudados de la raíz los cuales son principalmente compuestos orgánicos de bajo peso molecular que movilizan nutrientes minerales poco solubles, ya sea directamente o indirectamente, proporcionando sustratos energéticos para la microflora de la rizosfera. Los cambios inducidos por la raíz son componentes importantes para la adaptación de las plantas a las condiciones químicas del suelo, el uso eficiente de los nutrientes y de los fertilizantes (Marschner y col., 1987).

VII CONCLUSIONES.

La inoculación con *Bacillus sp.* y el producto comercial Rhizobac Combi® mejoran las variables relacionadas con el rendimiento del pimiento tales como frutos por planta, peso promedio de fruto (g) y g de fruto por m².

Se observó un efecto positivo con la cepa de *Bacillus sp.* y el producto comercial Rhizobac combi® en los valores obtenidos de las variables grosor de pared de fruto (mm) y metabolitos secundarios como color extractable (unidades ASTA), fenoles totales (mg AGE/100 g m.f.), ácido ascórbico (mg de a.a. /100 g m.f.).

Por otro lado en cuanto a los resultados obtenidos sobre la concentración de micro y macro-elementos se observa diferencias significativas solamente en los elementos potasio (K), fósforo (P), hierro (Fe), boro (B), cobre (Cu) y Nitrógeno total (NT).

El uso y aplicación de las bacterias caracterizadas como promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), aplicadas como biofertilizantes ofrecen beneficios de producción, rendimiento y calidad en el cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.).

El efecto observado de cada tratamiento como la cepa bacteriana *Bacillus sp* y el producto comercial Rhizobac combi® es de acuerdo a sus propiedades bioquímicas y fisiológicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal, por lo que su aplicación en otros cultivos de hortalizas pueden presentar efectos significativos en variables agronómicas y de calidad del fruto.

VIII. LITERATURA CITADA

- A.O.A.C.** 1994. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemist (15th Ed.) Washington, USA.
- Abbott L.;** Robson A. 1984. The effect of VA mycorrhizae on plant growth. *In:* VA Mycorrhizae. Powell C. and Bagyaraj, D. Ed. CRC Press, FL.
- Abu-Zahra T.** 2012. Vegetative, flowering and yield of sweet pepper as influenced by agricultural practices. *Middle-East Journal of Scientific Research.* 11:1220-1225.
- Aguado-Santacruz G.A.** 2012. Uso de Microorganismos como Biofertilizantes. *In:* Aguado-Santacruz, G.A. (ed.). Introducción al uso y manejo de los biofertilizantes en la agricultura. INIFAP/SAGARPA. México, pp 35-78.
- Aguado-Santacruz G.A.;** Rascón-Cruz Q.; Luna-Balbarena A. 2012. Impacto Económico y Ambiental del Empleo de Fertilizantes Químicos. *In:* Aguado-Santacruz, G.A. (ed.). Introducción al uso y manejo de los biofertilizantes en la agricultura. INIFAP/SAGARPA. México, pp 1-22.
- Aguirre-Medina J.F.;** Irizar-Garza M. B.; Duran-Pardo A.; Grajeda-Cabrera O. A.; Peña-del Rio M. A.; Loredó-Ostí C.; Gutiérrez-Baeza A. 2009. Los biofertilizantes microbianos: una alternativa para la agricultura en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo experimental Rosario Izapa, Chiapas, México 86 p.
- Alarcón V. A. L.** 1997. Fertirrigación del pimiento dulce en invernadero. www.horticom.com/tematicas/pimientos/pdf/capitulo5.pdf (Consultado 15 febrero 2013).
- Alcántar G. G.;** Sandoval M. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación especial Ed. 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Chapingo, México. 156 p.

- Andrews** J. H.; Harris R. F. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Reviews Phytopathology*. 38:145–180.
- Arora** N.K.; Kim M.J; Kang S.C.; Maheshwari K.D. 2007. Role of chitinase and β -1, 3-glucanase activities produces by fluorescent pseudomonad and in vitro inhibition of *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*. *Canada Journal Microbiology*. 53:207-212.
- Arshad** M.; Frankenberger W.T.1998. Microbial production of plant hormones. *Plant and soil*. 133: 1-8.
- ASTA**. (1995). ASTA, Extractable colour in capsicums and their oleoresins. Analytical method 20.1, Official analytical method of the American spice trade association. Englewood, Cliffs, NJ, USA: American Spice Trade Association.
- Barazani** O.; Friedman J. 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria. *Journal Chemical Ecology*. 25: 2397-2406.
- Barbagallo** R. N.; Chisari M.; Patané C. 2012. Polyphenol oxidase, total phenolics and ascorbic acid changes during storage of minimally processed ‘California Wonder’ and ‘Quadrato d’Asti’ sweet peppers. *LWT. Food Science and Technology*. 3: 1-5.
- Bashan** Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*. 16: 729-770.
- Bashan** Y.; Holguin G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canada Journal Microbiology*. 43:103-121.
- Belakbir** A.; Ruiz J. M.; Romero L. 1998. Yield and Fruit quality of pepper (*Capsicum annum* L.) in response to bioregulators. *HortScience*. 33:85-87.
- Berea** J. M.; Pozo M. J.; Azcón R.; Azcón-Aguilar C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 56:1761–1778.

- Birth G. S.** 1976. How light interacts with foods. In: Gaffney, J.J. Jr. (Ed.), *Quality Detection in Foods*. American Society for Agricultural Engineering, St. Joseph, MI, pp. 6–11.
- Castro S. M.; Saraiva J. A.; Domínguez F. M.; Delgadillo I.** 2011. Effect of mild pressure treatments and thermal blanching on yellow bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *LWT - Food Science and Technology*. 44:363-369.
- CEDEPAS-INCAGRO.** 2003. "Cultivo de pimientos y ajíes". Manual del productor. Guía didáctica Volumen: 1-004.
- Cheng W.** 1999. Rhizosphere feedbacks in elevated CO₂. *Tree Physiology*. *Heron Publishing*. 19: 313—320.
- Compant S.; Duffy B.; Jerzy N.; Clement C.; Barka E.A.** 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of Action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:4951–4959.
- Crewsa T. E.; Peoples M. B.** 2004. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 102: 279-297.
- Crosa J. H.; Mey A.R.; Shelley M.P.** 2004. Iron transport in bacteria. American Society for Microbiology. Ed. ASM Press. 1752 N St. N.W. Washington DC 20036-2904.
- Crowley D.** 2006. "Microbial siderophores in the plant rhizosphere". *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*, Chapter 8, pag. 169–198. Springer. Printed in the Netherlands.
- Daayf F.; Schmitt A.; Baurger R. R.** 1995. The effects of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber. *American Phytopathological Society*. 79:577-580.

- De Santiago** J. 2009. Dinámico crecimiento. Desarrollo y rentabilidad de proyectos de pimientos en invernadero. Revista Productores de Hortalizas. México y Centroamérica <http://www.hortalizas.com/pdh/?storyid=1723> (Consultado 25 abril 2013)
- De Teodoro-Pardo** C. V.; García-Velázquez A.; Corona-Torres T. 2007. Polimorfismo cromosómico en *Capsicum annuum* L. (Solanacea) en recolectas de Puebla, Morelos y Querétaro, México. Revista Agrociencia. 41:873-881.
- Deepaa** N.; Kaura C.; Singhb B.; Kapoor H. C. 2006. Antioxidant activity in some red sweet pepper cultivars. Journal of Food Composition and Analysis. 19: 572–578.
- Del Castillo** J. A.; Uríbarri A.; Sádaba S.; Aguado G.; Sanz De Galdeano J. 2004. Guía de cultivo del pimiento en invernadero. <http://www.navarraagraria.com/n144/arpimin.pdf> (Consultado 25 febrero 2013).
- Del Castillo** J.A.; Uríbarri A.; Sádaba S.; Aguado G.; Sanz De Galdeano J., 2004."Guía del cultivo del pimiento en Invernadero". ITG Agrícola-Navarra Agraria.
- Dixon** R.; Paiva N. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell. 7:1085–1097.
- FAO** (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2011. Estadísticas de países productores y comercializadores de productos agrícola. FAOSTAT. Informe Estadístico. (Consultado el 01 de enero 2013).
- FIRA**. 2010. El Mercado de los Fertilizantes en México: Situación Actual y Perspectivas 2009. Nota de Análisis. Dirección de Análisis Económico y Sectorial, México.

- Francis F.J. 1980.** Color quality evaluation of horticultural crops. HortScience. 15:58–59.
- Galal Y. G. M.; El-Ghandour I. A.; Osman M. E.; Raouf A. M. N. 2003.** The effect of inoculation by *mycorrhizae* and *rhizobium* on the growth and yield of wheat in relation to nitrogen and phosphorus fertilization as assessed by ¹⁵N techniques. Symbiosis. 34:171-183.
- Ghasemnezhad M.; Sherafati M.; Payvast G. A. 2011.** Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annuum*) fruits at two different harvest times. Journal of functional foods. 3: 44-49.
- Gnayfeed M. H.; Daood H. G.; Biacs P. A.; Alcaraz C. F. 2001.** Content of bioactive compounds in pungent spice red pepper (paprika) as affected by ripening and genotype. Journal of the Science of Food and Agriculture. 81, 1580-1585.
- Goldstein A.; Lester T.; Brown J. 2003.** Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. Biochimica and Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics 1647:266-271.
- Gómez R.; Varón R.; Pardo J. E.1997.** Color loss in paprika from variety Numex conquistador peppers grown in field and greenhouse. Journal of Food Quality. 21: 411-419.
- Gómez-Ladrón de Guevara R.; Pardo-González J. E.1996.** Evolution of Color during the Ripening of Selected Varieties of Paprika Pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of. Agricultural and Food Chemistry.44: 2049-2052.
- Graham T. L.1990.** Flavonoid and Isoflavonoid Distribution in Developing Soybean Seedling Tissues and in Seed and Root Exudates. Plant Physiology.95: 594-603.

- Gray E. J.; Smith D. L.** 2005. Intracellular and extracellular PGPR. *Soil Biology and Biochemistry*.37:395-412.
- Grijalva C. R. L.; Macías, D. R.; Robles, C. F.** 2008. Productividad y calidad de variedades y densidades de chile (bell pepper) bajo condiciones de invernadero en el noroeste de Sonora. *Biotecnia*. 10:3-10.
- Guerra M.; Magdaleno R.; Casquero P. A.** 2011. Effect of site and storage conditions on quality of industrial fresh pepper. *Scientia Horticulturae*. 130:141–145.
- Harman G. E.** 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96:190-194.
- Hernández-Fuentes A. D.; Campos Montiel R.; Pinedo-Espinoza J. M.** Comportamiento poscosecha de pimiento morron (*Capsicum annum* L.) var. california por efecto de la fertilización química y aplicación de lombrihumus. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 11:82-91.
- Howard L. R.; Talcott S. T.; Brenes C. H.; Villalon B.** 2000. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:1713-1720.
- Hu Q. P.; Xu J. G.** 2011. A simple double-layered chrome azurol S agar (SD-CAS A) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent *Bacillus* *African Journal of Microbiology Research*. 5:4321-4327.
- John P.** 1991. How plant molecular biologists revealed a surprising relationship between two enzymes, which took an enzyme out of a membrane where it was not located, and put it into the soluble phase where it could be studied. *Plant Molecular Biology Reporter*.9:192-194.

- Jovicich** E.; Cantliffe D. J.; Stoffella P. J. 2004. Fruit yield and quality of greenhouse-grown bell pepper as influenced by density, container and trellis system. *Hort-Technology*. 14:507-513.
- Kamilova** F.; Kravchenko L. V.; Shaposhnikov A. I.; Azarova T.; Makarova N.; Lugtenberg B. 2006. Organic acids, sugars and L-tryptophan in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.19:250-256.
- Klock-Moore** K. A.; T. K. Broschat. 2001. Effect of four growing substrates on growth of ornamental plants in two irrigation system. *Hort-Technology*. 11:456-460.
- Kloepper** J. W.; Schroth, M. N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria in radish. *In: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA, Angers, France.
- Kloepper** J. W.; Zablutowicz M. R.; Tipping M. E.; Lifshitz R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: Keister DL, Cregan PB, eds. *The rhizosphere and plant growth*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 315–326.
- Knee** M. 1980. Methods of measuring Green color and chlorophyll content of Apple fruit. *Journal of Food Technology*. 15:493-500.
- Kokalis-Burelle** N.; Kloepper J. W.; Reddy M. S. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*. 3: 91–100.
- Kothari** S. L.; Joshi A.; Ochoa-Alejo N. 2010. Chilli peppers: A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*. 28: 35-48.

- Kovtunovych G.**; Lar O.; Kamalova S.; Kordyum V.; Kleiner D.; Kozyrovska N. 1999. Correlation between pectate lyase activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* penetrate into plant tissues. *Plant Soil*. 215: 1–6.
- Krajayklang M.**; Klieber A.; Dry P. R. 2000. Colour at harvest and post-harvest behaviour influence paprika and chilli spice quality. *Postharvest Biology and Technology*. 20: 269–278.
- Lancaster J. E.**; Lister C. E.; Reay P. F.; Triggs C. M. 1997. Influence of pigment composition on skin color in a wide range of fruit and vegetables. *Journal of the American Society Horticultural Science*. 122: 594-598.
- Loaiza-Figueroa F.**; Ritland K.; Laborde J.; Tanksley S. 1989. Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (*Solanaceae*) in México. *Plant Systematics and Evolution*. 165: 159-188.
- López-Bucio J.**; Cruz-Ramírez A.; Herrera-Estrella L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 280–287.
- Loredo-Osti, C.**; López-Reyes L.; Espinosa-Victoria D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *TERRA Latinoamericana*. 22: 225-239.
- Lugtenberg B.**; Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review Microbiology*. 63: 541-556.
- Luna-Martínez L.**; Martínez-Peniche R. A.; Hernández-Iturriaga M.; Arvizu-Medrano S.M.; Pacheco Aguilar J.R. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36: 63-69.
- Marcelis L. F. M.**; Heuvelink E.; Hofman-Eijer L. R.; Bakker J. D.; Xue L. B. 2004. Flower and fruit abortion in sweet pepper in relation to source and sink strength. *Journal of Experimental Botany*. 55: 2261-2268.

- Márkus F.**; Daood H. G.; Kapitány J.; Biach P. A.1999. Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 47: 100-107.
- Marschner H.**; Römheld V.; Cakmak I. 1987. Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere. *Journal of Plant Nutrition*. 10:1175-1184.
- Matsufuji H.**; Ishikawa K.; Nunomura O.; Makoto C.; Takeda M.2007. Anti-oxidant content of different coloured sweet peppers, white, green, yellow, orange and red (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Food Science and Technology* . 42:1482–1488.
- McCully M. E.** 2001. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28: 983–990.
- Méndez-Trujillo V.**; González-Mendoza D.; Gutiérrez- Miceli F.A.2005.Contenido de carotenoides y color extractable de nuevos cultivares en chile pimienta. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 11: 215-218.
- Moreno-Gómez B.** 2012. La Rizósfera y las Relaciones entre las Plantas y los Microorganismos. In: Aguado-Santacruz, G.A. (ed.). *Introducción al uso y manejo de los biofertilizantes en la agricultura*. INIFAP/SAGARPA. México, pp 23-33.
- Moreno-Pérez E.C.**; Mora-Aguilar R.; Sánchez-del Castillo F.; García-Pérez V. 2011. Fenología y rendimiento de híbridos de pimienta morrón (*Capsicum annuum* L.) cultivados en hidroponía. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 2: 5-18
- Mundarain S.**; Coa M.; Cañizares A. 2005. Fenología del crecimiento y desarrollo de plántulas de ají dulce (*Capsicum frutescens* L.). *Revista UDO Agrícola*. 5: 62-67.

- Navarro** J. M.; Flores P.; Garrido C.; Martínez V. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*. 96: 66–73.
- Nuez** V. F.; Gil O. R.; Costa J. G. 1996. *El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajíes*. Ediciones Mundi-Prensa. 1996. Madrid, España. 607p.
- Ortas** I.; Sari N. C.; Akpinar A.; Yetisir H. 2011. Screening mycorrhiza species for plant growth, P and Zn uptake in pepper seedling grown under greenhouse conditions *Scientia Horticulturae*. 128: 92–98.
- Patel** D.; Saraf M. 2013. Influence of soil ameliorants and microflora on induction of antioxidant enzymes and growth promotion of *Jatropha curcas* L. under saline condition. *European Journal of Soil Biology*. 55: 47-54.
- Patten** L. C.; Glick B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida*, Indole Acetic Acid in development of the host plant root system. *Applied Environmental Microbiology*. 68: 3795-3801.
- Pelletier** N.; Audsley E.; Brodt S.; Garnett, T.; Henriksson P.; Kendall A.; Kramer K.J.; Murphy D.; Nemecek T.; Troell M. 2011. Energy intensity of agriculture and food systems. *Annual Review Environment and Resources*. 36: 223-246.
- Peña** H. B.; Reyes I. 2008. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia*. AUG 2008, Vol. 32 N° 8.
- Pérez** S.; Cabirol N.; George R.; Zamudio L.S.; Fernández, F.J. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*. 70:127–131.
- Picard** C.; Di Cello F.; Ventura M.; Fani R.; Guckert, A. 2000. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 948-955.

- Pickersgill B.** 1971. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (Genus *Capsicum*). *Evolution*. 25: 683-691.
- Pickersgill B.** 1989. Cytological and genetical evidence on the domestication and diffusion of crops within the Americas. In: "Harris, D.R. Hillman, G. C. (Eds.) for agings and farming: the evolution on plant explotation. Unwin Hyman, London": 426-439.
- Rajkumar M.; Noriharu A.; Prasad M. N.; Freitas H.** 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*. 28: 142-149.
- Ramos-Solano B.; Barriuso-Maicas J.; Pereyra M. T.; Domenech J., Gutiérrez-Mañero F. J.** 2008. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *The American Phytopathological Society*. 98: 451-457.
- Rao R. T. V.; Gol B. N.; Shah K.K.** 2011. Effect of postharvest treatments and storage temperatures on the quality and shelf life of sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *Scientia Horticulturae*. 132: 18–26.
- Reséndiz-Melgar R. C.; Moreno-Pérez E.; Sánchez-Del Castillo F.; Rodríguez-Pérez J. E.; Peña-Lomelí A.** 2010. Variedades de pimiento morrón manejadas con despunte temprano en dos densidades de población. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 16: 223-229.
- Reyes I.; Alvarez L.; El-Ayoubi H.; Valery A.** 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*. 20: 37-48.
- Richardson A. E.** 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal Plant Physiology*. 28: 897–906.

- Ruangviriyachai** C.; Arnnok P.; Mahachai R.; Techawongstien S.; Chanthai, S. 2012. Determination of total phenolics and anthocyanin contents in the pericarp of hot chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). International Food Research Journal. 19: 235-243.
- Ryu** C.M.; Farag M.A.; Hu, C.H.; Reddy, M.S.; Wei, H.X.; Paré P.W.; Kloepper J.W. 2003 Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 100:4927-4932.
- SAGARPA**. 2011. Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. Plan rector nacional sistema producto chile.
- Sams** C. E. 1999. Preharvest factors affecting postharvest texture. Postharvest Biology and Technology. 15: 249–254.
- Sánchez-Chávez** E.; Barrera-Tovar R.; Muñoz-Márquez E.; Ojeda-Barrios D. L.; Anchondo-Nájera A. 2011. Efecto del ácido salicílico sobre biomasa, actividad fotosintética, contenido nutricional y productividad del chile jalapeño. Revista Chapingo serie horticultura.17: 63-68.
- Schützendbübel** A.; Polle A. 2001. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. Journal of Experimental Botany. 53: 1351-1365.
- Sessitsch** A.; Howieson J. G.; Perret X.; Antoun H.; Martínez-Romero E. 2002. Advances in Rhizobium Research. Critical Reviews in Plant Sciences. 21: 323-378.
- Sethu** K. M. P.; Prabha T. N.; Tharanathan R. N. 1996. Postharvest biochemical changes associated with the softening phenomenon in *Capsicum annuum* fruits. Phytochemistry. 42: 961–966.
- Shaharoon** B.; Arshad M.; Zahir Z. A. 2006. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)-deaminase rhizobacteria extenuates ACC-induced classical triple

- response in etiolated pea seedlings *Pakistan Journal of Botany*. 38: 1491-1499.
- Shear** C. B. 1975. Calcium-related disorders of fruits and vegetables. *HortScience*. 10: 361–365.
- Showlter** R. K. 1973. Factors affecting pepper firmness. Florida state horticultural society. *Hnabling and processing section*. 1: 309-382.
- Singleton** V. L.; Rossi J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents," *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
- Smirnoff** N. 1996. The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. *Annals of Botany*. 78: 661-669.
- Smith** R. S. 1992. Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal Microbiology*. 38: 485-492.
- Smith** R. S. 1995. Inoculant formulations and applications to meet changing needs Zn Nitrogen fixation: fundamentals and applications, I. A. Tiionovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov and W.E. Newton (eds), pp. 653-657, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Snowdon** A. L. 1990. A color atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Wolfe Scientific, London. 2: 54-91.
- Solecka** D. 1997. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiologiae Plantarum*. 19: 257-268.
- Tamaro** D. 1974. *Manual de Horticultura*. Séptima edición. Editorial Gustavo Gill. Barcelona, España.
- Tang** W. H.; Yang H. 1997. Research and application of biocontrol of plant diseases and PGPR in China. In *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-present status and future prospects*, A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N.

Kondo and S. Akino (eds.), pp. 4-9, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

Trevors J. T.; Van J. D.; Lee H.; Overbeek L S. 1992. Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil. *Microbial Releases*. 1: 61-69.

Urrestarazu M.; Castillo J. E.; Salas M. C. 2002. "Técnicas culturales y calidad del pimiento". Departamento de producción Vegetal-Universidad de Almería. Horticultura, S.L.

Vega-Gálvez R.; Lemus-Mondaca C.; Bilbao-Sainz P.; Fito A. A. 2008. Effect of air drying temperature on the quality of rehydrated dried red bell pepper (var. Lamuyo). *Journal of Food Engineering*. 85: 42–50.

Vessey J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571–586.

Vidyalakshmi R.; Sridar R. 2007. Isolation and characterization of sulphur oxidizing bacteria. *Journal Culture Collections*. 5: 73-77.

Vracar L. O.; Tepic A. N.; Vujcic B. L.; Šolaja S. 2007. Influence of the heat treatment on the colour of ground pepper (*Capsicum annuum*). 2007. *APTEFF*. 38: 53-58.

Wainwright M. 1984. Sulphur oxidation in soils. *Advances in Agronomy*. 37: 350-392.

Wojtaszek P.; Stobiecki M.; Gulewicz K. 1993. Role of Nitrogen and Plant Growth Regulators in the Exudation and Accumulation of Isoflavonoids by Roots of Intact White (Lupin (*Lupinus albus* L.) Plants. *Journal Plant Physiology*. 142: 689-694.

Yodpetch C. 1997. Study on the optimum fertilizer rates on yield and quality of three long cayenne peppers (*Capsicum annuum* L.). *Kasetsart Journal of Natural Science*. 32: 37-45.

- Zahran** H. H. 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 9: 143–153.
- Zahran** H.H. 1999. Rhizobium–legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63: 968–989.
- Zhang** D.; Hamauzu Y. 2003. Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers. *Food, Agriculture and Environment*. 1: 22-27.
- Zhang** H.; Kim M. S.; Krishnamachari V.; Payton P.; Sun Y.; Grimson M.; Farag M. A.; Ryu C. M.; Allen R.; Melo I. S.; Pare P. W. 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *The Planta Cell*. 226: 839-851.